



KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

KLINIKA – VÝZKUM – INFORMACE
PŮVODNÍ PRÁCE – PŘEHLEDY – KAZUISTIKY

Interdisciplinární časopis
pro klinickou a laboratorní
medicínu, vydávaný pod
záštitou

Společnosti infekčního
lékařství

Společnosti pro
lékařskou mikrobiologii

a Společnosti pro
epidemiologii
a mikrobiologii

České lékařské společnosti
Jana Evangelisty Purkyně

Rezistence bakteriálních agens izolovaných z dolních cest dýchacích pacientů v intenzivní péči a jejich klonalita v pocovidovém období	4
Faktory virulence <i>Pseudomonas aeruginosa</i> jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů	11
Mikrobiologické metody identifikace původců infekcí krevního řečiště se zaměřením na T2Bacteria Panel	20
Případ botulismu v ČR a současné možnosti detekce neurotoxinu <i>Clostridium botulinum</i>	26

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

Interdisciplinární časopis vydávaný pod záštitou
Společnosti infekčního lékařství, Společnosti pro lékařskou mikrobiologii
a Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

REDAKČNÍ RADA

Šéfredaktor

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci

Zástupci šéfredaktora

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Klinika infekčních nemocí LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
Státní veterinární ústav, Olomouc

Redakční rada

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Centrum očkování a cestovní medicíny, Hradec Králové
Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Odd. klinické mikrobiologie Thomayerova nemocnice, Praha
MUDr. Pavel Dlouhý
Infekční oddělení a AIDS centrum,
Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem
Doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D.
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci
Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Klinika infekčních chorob, LF MU a FN Brno
Doc. RNDr. Dittmar Chmelář, Ph.D.
NRL pro anaerobní bakterie, LF Ostravské Univerzity
Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK v Praze
Prof. MUDr. Daniela Kotulová, Ph.D.
Čestná členka Slovenskej spoločnosti klinickej
mikrobiologie, SLS
Doc. MUDr. Lenka Krávková, CSc.
Klinika dětských infekčních nemocí, LF MU a FN Brno
MUDr. Pavla Křížová, CSc.
Státní zdravotní ústav, Praha
MUDr. Roman Kula, CSc.
Anesteziologicko-resuscitační klinika, FN Ostrava
MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, Praha
Doc. MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Infekční klinika 1. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava
MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Odd. lék. mikrobiol. a imunol. Oblast. nemocnice Trutnov
Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.
Klinika pro infekční choroby, LF UPJŠ, Košice
Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Infekční klinika 1. LF, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Ústav farmakologie, FN a LF UP v Olomouci
MUDr. Eva Žampachová
Centrální laboratoře, laboratoř virologie, Nemocnice
České Budějovice, a. s.

OBSAH

ÚVODNÍK

M. Kolář

3

PŮVODNÍ PRÁCE

Rezistence bakteriálních agens izolovaných z dolních cest dýchacích pacientů v intenzivní péči a jejich klonalita v pocovidovém období

*V. Pudová, K. Hricová, K. Fišerová, M. Htoutou Sedláková,
L. Doubravská, M. Kolář*

4

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa* jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů

K. Nováková, M. Kolář

11

Mikrobiologické metody identifikace původců infekcí krevního řečiště se zaměřením na T2Bacteria Panel

L. Cíchová, M. Antušková, O. Džupová

20

Případ botulismu v ČR a současné možnosti detekce neurotoxinu *Clostridium botulinum*

*J. Dresler, K. Matušková, Z. Kalaninová, P. Pompach,
M. Volný, P. Novák, A. Burantová, M. Holub*

26

ZPRÁVA

Vzpomínka na bývalého primáře infekčního oddělení docenta Poljaka

L. Rožnovský

29

INFORMACE

Obsah 28. ročníku

30

Rejstřík 28. ročníku

31



VYDAVATEL

a adresa redakce:

TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov
Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563
redakce@trios.cz, http://kml.trios.cz
Redakce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Inzerce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Sazba: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4
Tisk: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.
Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

Časopis je indexován a excerptován v databázích Medline/Index Medicus,
Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

Vychází 4x ročně, roční předplatné 575,- Kč.

Povoleno Ministerstvem kultury ČR pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-264X

Podávání novinových zásilek povolila Česká pošta, s. p., odštěpný závod Praha, čj. nov. 5449/95 ze dne 7. 12. 1995. Vydavatel nese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků nebo inzerce. Současně si vyhrazuje právo na drobné stylistické úpravy článků. Žádná část tohoto časopisu nesmí být bez předchozího písemného souhlasu vlastníka autorských práv kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem (ať mechanickým, nebo elektronickým – včetně pořizování fotokopii, nahrávek či informačních databází).



CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Interdisciplinary journal published under the auspices
of the Societies for Clinical Microbiology, for Epidemiology and Microbiology and for Infectious Diseases,
Members of the Czech Medical Association of Jan Evangelista Purkyně

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Editors

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Department of Infectious Diseases, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
State Veterinary Institute, Olomouc

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Dept. Infect. Dis. 3rd Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Vaccination Centre and Travel Medicine, Hradec Králové

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Thomayer Univ. Hospital,
Prague

MUDr. Pavel Dlouhý
Department of Infectious Diseases and AIDS Centre,
Masaryk Hospital in Ústí nad Labem

Doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D.
Dept. Infect. Dis. 3rd Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine,
Masaryk University and University Hospital in Brno

Doc. RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.
Dpt. of Biomedical Sciences, University
of Ostrava's Faculty of Medicine

Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Inst. of Immunol. and Microbiol., 1st Fac. of Med., Charles
Univ. in Prague and General Univ. Hosp. in Prague

Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.
Honorary member of Slovak Society of Clinical Microbiology

Doc. MUDr. Lenka Krbková, CSc.
Clinic of Children's Infectious Diseases,
Masaryk University and University Hospital in Brno

MUDr. Pavla Křížová, CSc.
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Roman Kula, CSc.
Dept. of Anaesthesiology and Resuscit., Univ. Hosp. Ostrava

MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Inst. Med. Microbiol. Charles Univ. 2nd Med. Fac. Prague

Doc. MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Dept. of Infect. Dis. 1st Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Dept. Infectious Diseases, University Hospital Ostrava

MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Dept. Med. Microbiol. Immunol. Regional Hospital Trutnov

Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.
Clinic of Infectious Diseases, Medical faculty, Košice

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Dept. Infect. Dis. 1st Med. Faculty, Charles Univ., Prague

Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Dept. of Pharmacology, Univ. Hospital Olomouc and Faculty
of Medicine and Dentistry, Palacký Univ. Olomouc

MUDr. Eva Žampachová
Central Laboratories, The Laboratory of Virology,
Hospital České Budějovice

CONTENTS

EDITORIAL

M. Kolář

3

ORIGINAL ARTICLE

**Resistance of bacterial pathogens isolated from the lower
respiratory tract and their clonality in intensive care patients
in a post-COVID-19 period**

*V. Pudová, K. Hricová, K. Fišerová, M. Htoutou Sedláková,
L. Doubravská, M. Kolář*

4

REVIEW

***Pseudomonas aeruginosa* virulence factors as a therapeutic target
in multidrug-resistant strains**

K. Nováková, M. Kolář

11

**Microbiological method for identification of the etiological agents
of bloodstream infections with focus on the T2Bacteria Panel**

L. Cíchová, M. Antušková, O. Džupová

20

**A case of botulism in the Czech Republic and current possibilities
for detecting the neurotoxin produced by *Clostridium botulinum***

*J. Dresler, K. Matůšková, Z. Kalaninová, P. Pompach,
M. Volný, P. Novák, A. Burantová, M. Holub*

26

NEWS

Remembering doc. MUDr. Vladko Poljak, CSc.

L. Rožnovský

29

INFORMATION

Content of Vol. 28

30

Index of Vol. 28

31



spol. s r. o.

PUBLISHER

and Editorial Office:

Redakce TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563
redakce@trios.cz, http://kml.trios.cz

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

DTP: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4

Printed by: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.

Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

**This journal is Indexed in Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica
Database and Scopus.**

A peer – reviewed journal

4 issues per volume.

ISSN 1211-264X

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

The views expressed in this journal are not necessarily those of the Editor or Editorial Board.

Úvodník

Vážené a milé kolegyně, vážení a milí kolegové,

Je mi velkým potěšením Vás co nejsrdečněji pozdravit nad stránkami prvního čísla 29. ročníku časopisu **Klinická mikrobiologie a infekční lékařství** (KMIL). Pevně věřím, že náš společný KMIL patří a nadále bude patřit k úspěšným českým recenzovaným časopisům, ve kterém jsou publikovány články s praktickým přínosem pro klinickou mikrobiologii a infekční lékařství v České republice. Jsem přesvědčen, že KMIL svou publikační činností významně přispívá ke kvalitní diferenciatně-diagnostické i léčebně-preventivní péči. Důležitá je i skutečnost, že se daří na stránkách našeho KMILu plně realizovat důležitou vlastnost současné medicíny, a to je její interdisciplinární charakter. Řada sdělení se týká nejen mikrobiologie či infektologie, ale i jiných oblastí medicíny, například intenzivní medicíny.

Rád bych poděkoval všem, kteří se zasloužili o úspěšné vydávání našeho odborného časopisu a významně přispěli k naplnění jednotlivých čísel KMILu nejen v roce 2022, ale za celou dobu jeho existence. Bohužel, není možné, abych poděkoval úplně všem, protože toto poděkování patří celé redakční radě, autorům jednotlivých sdělení, oponentům a v neposlední řadě čtenářům, kteří si jistě náš oblíbený časopis rádi přečtou. Přesto mi, prosím, dovoluji, abych poděkoval alespoň mým nejbližším spolupracovníkům, bez jejichž přispění a neocenitelné podpory by KMIL nemohl vycházet, a to našemu vydavateli Milanu Tomáškoví a firmě TRIOS, spol. s r. o., zástupcům šéfredaktora a garantům jednotlivých čísel, doc. MUDr. Janu Bardoňovi, Ph.D., doc. MUDr. Stanislavu Plíškovi, Ph.D. a doc. MUDr. Luděkovi Rožnovskému, CSc. Velké poděkování patří i technické redaktorce Mgr. Sabině Janovicové, DiS. Rád bych zdůraznil, že KMIL je zařazen v databázích Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica Database a v neposlední řadě i Scopus,

a je tedy vhodným odborným časopisem pro publikování nejen praktických článků či kazuistik, ale i sdělení vycházejících z vědecko-výzkumné činnosti, například v rámci doktorských studijních programů či grantových projektů.

Milí přátelé, první číslo nového ročníku KMILu přináší původní práci zaměřenou na problematiku vývoje antimikrobiální rezistence v pocovidové době. Další dvě sdělení shrnují informace o faktorech virulence významného bakteriálního species, a to *Pseudomonas aeruginosa*, a mikrobiologických metodách identifikace původců infekcí krevního řečiště se zaměřením na molekulárně genetické metody, včetně PCR v kombinaci s magnetickou rezonancí. Součástí tohoto čísla je i velmi zajímavá kazuistika botulinismu v České republice. Skladba tohoto čísla znovu potvrzuje návaznost našeho KMILu na lékařskou praxi a věřím, že Vás první číslo letošního ročníku zaujme.

Vážené kolegyně, vážení kolegové, závěrem bych Vás rád požádal o laskavou podporu a zachování přízně našemu společnému časopisu. Současně prosím o zasílání původních či přehledových prací a kazuistik, které nám pomohou v naší každodenní lékařské praxi. Doufám, že společnými silami se nám bude dařit i nadále držet velmi dobrou odbornou úroveň našeho KMILu a jeho příslušnost k uznávaným českým odborným periodikům. Za veškerou podporu a spolupráci předem moc děkuji.

Se srdečným pozdravem

prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
šéfredaktor

Rezistence bakteriálních agens izolovaných z dolních cest dýchacích pacientů v intenzivní péči a jejich klonalita v pocovidovém období

V. PUDOVÁ¹, K. HRICOVÁ¹, K. FIŠEROVÁ², M. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ²,
L. DOUBRAVSKÁ³, M. KOLÁŘ²

¹Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci;

²Ústav mikrobiologie, FN Olomouc; ³Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, FN Olomouc

SOUHRN

Pudová V., Hricová K., Fišerová K., Htoutou Sedláková M., Doubravská L., Kolář M.: **Rezistence bakteriálních agens izolovaných z dolních cest dýchacích pacientů v intenzivní péči a jejich klonalita v pocovidovém období**

Cíl práce: Období pandemie covid-19 výrazně ovlivnilo zdravotnický systém, včetně dopadu na dodržování principů racionální antibiotické politiky, zejména v souvislosti s nozokomiálními pneumoniemi, kdy bylo velmi obtížné odlišit případnou bakteriální superinfekci od závažné zánětlivé reakce vyvolané virem SARS-CoV-2. Cílem předložené studie byla analýza antimikrobiální rezistence bakteriálních agens izolovaných z dolních cest dýchacích a jejich klonality u pacientů v intenzivní péči v roce 2022 a porovnání s předchozím covidovým obdobím.

Materiál a metody: Do studie byly zahrnuty bakteriální kmeny izolované z dolních cest dýchacích (DCD) pacientů hospitalizovaných na Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny Fakultní nemocnice Olomouc (KARIM) v období tři let (1. 1. 2020 až 31. 12. 2022). Citlivost k antibiotikům byla stanovena standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST, u vybraných izolátů bylo provedeno porovnání pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE).

Výsledky: Rezistence nejčastějších bakteriálních agens izolovaných z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM se během covidového (2020–2021) a pocovidového (2022) období výrazně nezměnila, s výjimkou *Serratia marcescens* a *Enterococcus faecium*. Tato dvě species vykazala nárůst počtu kmenů během pandemie covid-19 a rovněž významný vzestup podílu rezistentních kmenů. V případě *Serratia marcescens* došlo k následnému poklesu počtu izolátů i jejich rezistence v roce 2022. V případě *Enterococcus faecium* celkový počet izolátů rovněž významně klesl, ale četnost vankomycin-rezistentních izolátů (VRE) se nadále zvyšovala. V období pandemie covid-19 lze zvýšený záchyt VRE spojit s klonálním šířením, v roce 2022 se však výrazná klonalita již nepotvrdila. Porovnání podobnosti pomocí PFGE u dalších bakteriálních druhů rovněž neodhalilo významnější horizontální přenos mezi pacienty v pocovidovém období, neboť většina izolátů (85 %) vykazovala jedinečný restriktivní profil.

Závěr: Výsledky naznačují, že frekvence i antimikrobiální rezistence většiny nejčastějších bakteriálních agens z dolních cest dýchacích pacientů hospitalizovaných na KARIM v pocovidovém období zůstává srovnatelná s dobou před propuknutím pandemie covid-19 i během ní. Výjimkou je druh *Enterococcus faecium*, u něhož došlo k nárůstu rezistence k vankomycinu v covidovém i pocovidovém období.

Klíčová slova: bakterie, antimikrobiální rezistence, pandemie covid-19, klonalita

SUMMARY

Pudová V., Hricová K., Fišerová K., Htoutou Sedláková M., Doubravská L., Kolář M.: **Resistance of bacterial pathogens isolated from the lower respiratory tract and their clonality in intensive care patients in a post-COVID-19 period**

Objectives: The period of the COVID-19 pandemic had a significant impact on the healthcare system, including its effect on compliance with the established procedures of a rational antibiotic policy, especially in the context of nosocomial pneumonia, where it was very difficult to distinguish a possible bacterial superinfection from a severe inflammatory reaction caused by the SARS-CoV-2 virus. The aim of the present study was to analyze the antimicrobial resistance of bacterial pathogens isolated from the lower respiratory tract and their clonality in intensive care patients in 2022 and to compare it with the previous COVID-19 period.

Material and Methods: Bacterial strains isolated from the lower respiratory tract (LRT) of patients hospitalized at the Department of Anaesthesiology, Resuscitation and Intensive Care, Olomouc University Hospital (DARIC) over a three-year period (January 1, 2020 – December 31, 2022) were included in the study. The susceptibility to antibiotics was determined by the standard microdilution method according to the EUCAST criteria, and selected isolates were compared using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: The resistance of the most common bacterial pathogens isolated from the LRT of patients hospitalized at DARIC did not change significantly during the COVID-19 (2020–2021) and post-COVID-19 (2022) periods, with the exception of *Serratia marcescens* and *Enterococcus faecium* species. These two showed an increase in the number of strains during the COVID-19 pandemic, as well as a significant increase in the proportion of resistant strains. In the case of *Serratia marcescens*, there was a subsequent decrease in the number of isolates and their resistance in 2022. For *Enterococcus faecium*, the total number of isolates also decreased significantly, but the frequency of vancomycin-resistant isolates (VRE) continued to increase. During the COVID-19 pandemic, increased VRE detection can be linked to proven clonal spread, but significant clonality was no longer confirmed in 2022. Comparison of similarity by

PFGE in other bacterial species also did not reveal significant horizontal transmission between patients in the post-COVID-19 period, as most isolates (85%) showed a unique restriction profile.

Conclusions: The results indicate that the frequency and antimicrobial resistance of the majority of the most common bacterial pathogens from the LRT of patients hospitalized at DARIC in the post-pandemic period remain comparable to the time before and during the COVID-19 pandemic outbreak. An exception is *Enterococcus faecium*, which showed an increase in vancomycin resistance in both the COVID-19 and the post-COVID-19 periods.

Keywords: bacteria, antimicrobial resistance, COVID-19 pandemic, clonality

Klin mikrobiol inf lék 2023;29(1):4–10

Adresa: Mgr. Kristýna Hricová, Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, e-mail: kristyna.hricova@upol.cz

Došlo do redakce: 26. 5. 2023

Schváleno k tisku: 9. 6. 2023

Úvod

Nozokomiální pneumonie (HAP) je v současné době jednou z nejčastějších a nejdůležitějších komplikací zdravotního stavu hospitalizovaných pacientů, především na jednotkách intenzivní péče (JIP). V etiopatogenezi HAP se uplatňuje široké spektrum potenciálních bakteriálních patogenů, především enterobakterie (nejčastěji *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* [1–3]. Velmi závažný problém pro iniciální antibiotickou léčbu HAP představuje antimikrobiální rezistence (AMR), která podmiňuje neadekvátní antibiotickou léčbu s následným vzestupem morbidity i mortality. Konkrétní dopad rezistence bakteriálního původce HAP na aplikovanou antibiotickou léčbu uvádí ve své práci Luna et al. [4]. Z výsledků této studie vyplývá 38% mortalita v případě pacientů adekvátně léčených, zatímco v případě neadekvátní léčby (bakteriální původce byl rezistentní) dosáhla mortalita hodnoty 91 %. Herkel et al. rovněž uvádějí statisticky významný rozdíl mezi adekvátní a neadekvátní antibiotickou léčbou HAP ve vztahu k mortalitě. U pacientů s adekvátní léčbou byla mortalita 27 %, zatímco v případě neadekvátní terapie, kdy bakteriální původci

byli rezistentní k iniciální antibiotické léčbě, dosáhla hodnoty 45 % [5]. Riziko mortality rovněž zvyšuje opožděné zahájení správné antibiotické léčby, včetně adekvátního dávkování [6].

V období pandemie covid-19 význam HAP ještě vzrostl. Během tohoto období byl hospitalizován na JIP velký počet pacientů s těžkým až kritickým stupněm respirační insuficience způsobené virem SARS-CoV-2. Bylo prokázáno, že stejně jako u jiných virových pneumonií (např. chřipky) i v případě covid-19 nasedající bakteriální plicní superinfekce významně zhoršuje klinický průběh a výsledek léčby, prodlužuje dobu hospitalizace a zvyšuje mortalitu pacientů [7–9]. Nicméně odlišit případnou bakteriální superinfekci od závažné zánětlivé reakce vyvolané SARS-CoV-2 je klinicky i laboratorně velmi obtížné. Z důvodů ztížené diferenciální diagnostiky a vyšší mortality u bakteriálních superinfekcí byla v době nejtěžších vln pandemického období aplikována extenzivní antibiotická terapie. Zcela oprávněně je tedy studována otázka souvisejícího vývoje AMR v důsledku nadměrného používání antibiotik, zvýšené expozice velkého množství pacientů nemocničnímu prostředí (často

Tabulka 1

Počty hospitalizovaných pacientů a osobodny na jednotlivých odděleních KARIM ve sledovaných letech

	2020	2021	2022	2020	2021	2022
	Počet hospitalizovaných pacientů			Osobodny		
Oddělení č. 15	614	632	550	4 660,30	6 200,00	3 460,00
NIP/DIOP	44	10	61	2 407,30	220,00	1 795,20
Celkem	658	642	611	7 067,60	6 420,00	5 255,20

Legenda: NIP/DIOP – oddělení Následné intenzivní péče a Dlouhodobé intenzivní ošetrovatelské péče; Osobodny – počet pacientů za rok násobený průměrnou délkou hospitalizace

Tabulka 2
 Rezistence nejčastějších gramnegativních bakteriálních agens z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM
 (v procentech). V závorce za názvem druhu celkový počet izolovaných kmenů v jednotlivých letech

Bakteriální species	AMS			CRX			CTZ			CPM		
	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (122;131;71)	65	76	63	63	70	59	62	69	59	62	67	55
<i>Escherichia coli</i> (23;26;40)	57	58	58	35	35	25	30	31	20	22	27	20
<i>Enterobacter cloacae</i> (39;33;24)	N	N	N	N	N	N	56	45	38	41	15	4
<i>Serratia marcescens</i> (18;74;26)	N	N	N	N	N	N	0	70	8	0	69	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (70;63;85)	N	N	N	N	N	N	11	17	19	19	21	21
	MER			PPT			GEN			AMI		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (122;131;71)	1	0	0	64	69	61	57	63	49	2	2	6
<i>Escherichia coli</i> (23;26;40)	0	0	0	39	31	30	17	4	15	13	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (39;33;24)	0	0	0	56	45	38	21	9	8	3	0	0
<i>Serratia marcescens</i> (18;74;26)	0	0	0	0	70	8	0	72	8	6	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (70;63;85)	29	21	42	21	25	27	N	N	N	9	2	4
	CIP			COL			COT			TIG		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (122;131;71)	61	68	55	2	10	6	62	79	54	10	6	6
<i>Escherichia coli</i> (23;26;40)	30	19	23	0	0	0	39	27	50	4	4	8
<i>Enterobacter cloacae</i> (39;33;24)	31	18	8	11	3	5	26	18	13	8	9	4
<i>Serratia marcescens</i> (18;74;26)	0	66	4	N	N	N	0	69	8	N	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (70;63;85)	23	25	27	1	3	2	N	N	N	N	N	N

Legenda: AMS – ampicilin/sulbaktam, CRX – cefuroxim, CTZ – ceftazidim, CPM – ceftazidim, CPM – ceftazidim, CPM – ceftazidim, PPT – piperacilin/tazobaktam, GEN – gentamicin, AMI – amikacin, CIP – ciprofloxacín, COL – kolistin, COT – kotrimoxazol, TIG – tigecyklin, N – nehodnoceno

prostorově a režimově reorganizovanému) a používání invazivních i neinvazivních postupů v intenzivní péči (umělá plicní ventilace, pronace apod.).

Cílem předložené studie byla analýza AMR u bakterií izolovaných z dolních cest dýchacích (DCD) a jejich klonalita v roce 2022 u pacientů hospitalizovaných na Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny Fakultní nemocnice Olomouc (KARIM) a porovnání s covidovým obdobím (2020–2021).

Materiál a metody

Soubor bakteriálních kmenů

Do studie byly zahrnuty bakteriální kmeny izolované z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM v období tří let (1. 1. 2020 až 31. 12. 2022). Počty hospitalizovaných pacientů na KARIM (lůžkové oddělení č. 15 a oddělení Následné intenzivní péče a Dlouhodobé intenzivní ošetrovatelské péče (NIP/DIOP)), resp. osobodny jsou uvedeny v *tabulce 1*. Jednalo se o kmeny, které byly vykultivovány v signifikantní kvantitě pro diagnózu pneumonie (sputum $\geq 10^6$ CFU/ml, endotracheální aspirát (endosekret) $\geq 10^5$ CFU/ml, bronchoalveolární lavážní tekutina (BAL) $\geq 10^4$ CFU/ml). Duplicitně izolované kmeny byly ze souboru vyřazeny. Vzhledem ke skutečnosti, že všechna mikrobiologická vyšetření byla realizována výhradně v rámci standardní diagnosticko-léčebné péče, nebyl nutný souhlas Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc.

Identifikace bakteriálních agens

K identifikaci izolovaných bakterií byly použity standardní mikrobiologické postupy s pomocí systému MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex, Bruker Daltonics). Všechny bakteriální izoláty vykultivované v signifikantní kvantitě byly uchovány v kryozkumavkách v hlubokomrazícím boxu při -80 °C (Kryobanka B, ITEST, Hradec Králové, ČR).

Stanovení citlivosti/rezistence k antibiotikům

Citlivost k antibiotikům byla stanovena standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST [10]. Referenční bakteriální kmeny *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 byly použity k protokolované kontrole kvality. Produkce širokospektrých beta-laktamáz (ESBL, AmpC, KPC, MBL, OXA) byla detekována fenotypovými testy a potvrzena PCR průkazem příslušných genů [11–14]. U kmenů *Staphylococcus aureus* byla potvrzena rezistence k methicilinu pomocí selektivně diagnostické chromogenní půdy (Colorex/TM/MRSA, TRIOS, s. r. o., ČR) a pomocí imunochromatografického testu na průkaz PBP2a (PBP2a SA Culture Colony Test, Alere™). V případě vancomycin-rezistentních enterokoků byla rezistence potvrzena průkazem příslušných genů *vanA* a *vanB* [15].

Genetická analýza bakteriálních patogenů

Porovnání podobnosti bakteriálních izolátů pomocí pulzní gelové elektroforézy bylo provedeno u druhů *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. K izolaci DNA byly použity dříve popsané postupy [16,17]. Ke štěpení byly využity enzymy *Xba*I, *Sma*I a *Spe*I. Separace získaných fragmentů DNA probíhala v 1,2% agarózovém gelu při napětí $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ a pulzních časech 2–35 s po dobu 24 hodin (většina druhů), respektive 5–60 s 23 hodin (*Pseudomonas aeruginosa*). Po obarvení ethidium bromidem byly gely porovnány pomocí počítačového programu GelCompar II s využitím Diceho koeficientu (1,0 %) a metody UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means). Restrikční profily vykazující shodu větší než 95 % byly považovány za identické.

Výsledky

Antimikrobiální rezistence bakteriálních agens z DCD

Souhrn antimikrobiální rezistence bakterií izolovaných z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM ukazuje tabulky 2 a 3. Z výsledků vyplývá, že rezistence nejčastějších bakteriálních agens během covidového a pocovidového období nevykazovala významné rozdíly, s výjimkou druhů *Serratia marcescens* a *Enterococcus faecium*. Tato dvě species vykázala výrazný nárůst počtu kmenů v roce 2021 a rovněž významný nárůst podílu rezistentních kmenů při nezvyšujícím se počtu hospitalizovaných pacientů, resp. osobodnů na KARIM v jednotlivých letech (viz tabulka 1). V případě *Serratia marcescens* se zvýšil počet kmenů z 18 na 74 a poté klesl na 26; rezistence k mnoha antibiotikům (piperacilin/tazobaktamu, ceftazidimu, cefepimu, gentamicinu, ciprofloxacinu, kotrimoxazolu) vzrostla z 0 % v roce 2020 na 66–72 % v roce 2021 a poté poklesla na 4–8 %. V případě *Enterococcus faecium* vzrostl počet kmenů z 39 na 68 a poté klesl na 27; počet vancomycin-rezistentních kmenů *Enterococcus faecium* se v roce 2021 zvýšil z 8 % (v roce 2020) na 25 %, nicméně v roce 2022 došlo k dalšímu nárůstu na 27 %.

Genetická analýza

Gen pro betalaktamázu ze skupiny CTX-M-1 byl detekován u 10 ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

Tabulka 3
Rezistence nejčastějších grampozitivních bakteriálních agens z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM (v procentech, v závorce za názvem druhu celkový počet izolovaných kmenů v jednotlivých letech)

Bakteriální species	2020		2021		2022		2020		2021		2022				
	OXA	CIP	OXA	CIP	OXA	CIP	COT	ERY	CLI	AMP	TEI	AMP			
<i>Staphylococcus aureus</i> (41;36;62)	5	6	6	0	0	0	3	0	0	27	36	23	20	28	19
<i>Staphylococcus aureus</i> (41;36;62)	7	0	0	3	5	6	5	5	5	5	6	5	5	6	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (41;36;62)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> (39;68;27)	0	0	0	7	8	25	8	25	27	8	24	33	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> (20;18;20)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: OXA – oxacilin, ERY – erytromycin, CLI – klindamycin, TET – tetracyklin, VAN – vancomycin, TEI – teikoplanin, AMP – ampicilin

a jednoho ESBL-pozitivního kmene *Escherichia coli*. PCR také potvrdila přítomnost genu bla_{SHV} u všech 10 testovaných klebsiel (základní varianta SHV-1 je součástí chromozomu) a výskyt genu bla_{TEM} v 8 případech. PCR zaměřená na detekci AmpC betalaktamázy u AmpC-pozitivních izolátů *Enterobacter cloacae* odhalila pouze typ, který je u tohoto druhu kódovaný chromozomálně. Gen pro jiný typ AmpC betalaktamázy přenositelný pomocí plazmidu prokázán nebyl. Rezistence tak v tomto případě byla spojena s chromozomální mutací. Rezistence k vankomycinu byla u testovaných vankomycin-rezistentních izolátů *Enterococcus faecium* potvrzena přítomností genu *vanA*, v jednom případě byl detekován gen *vanB*.

Porovnání podobnosti pomocí PFGE bylo provedeno u kmenů 8 bakteriálních druhů izolovaných od pacientů hospitalizovaných na KARIM v roce 2022. Dvojice izolátů se shodným restričním profilem byly nalezeny u *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* a *Enterococcus faecium*. Mezi izoláty *Pseudomonas aeruginosa* se vyskytla jedna trojice shodných izolátů a 2 izoláty s vysokým koeficientem podobnosti (> 97 %). Většina izolátů (72 z 85 testovaných; 85 %) vykazovala jedinečný restriční profil. Vý-

sledky srovnání izolátů vybraných druhů přehledně zobrazují dendrogramy na obrázcích 1–3.

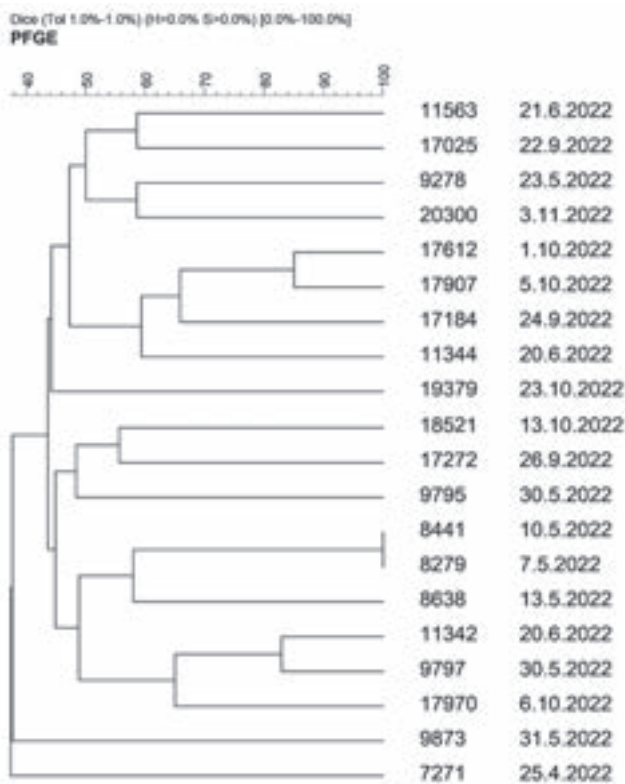
Diskuze

Porovnání bakteriálních agens izolovaných z DCD v roce 2022 od pacientů hospitalizovaných na KARIM s izoláty získanými v covidovém období (2020–2021) neodhalilo zásadní změny v jejich zastoupení ani v AMR. Předložené výsledky navazují na studii Fišerové et al. srovnávající předcovidové a covidové období, která rovněž neprokázala významné změny ve spektru bakteriálních patogenů izolovaných z DCD a ani zvýšení rezistence k antimikrobiálním látkám [18]. Dvěma výjimkami, u kterých v předložené studii došlo ke zřejmým změnám, jsou druhy *Serratia marcescens* a *Enterococcus faecium*, u nichž během covidového období v roce 2021 stoupl počet zachycených izolátů i AMR (při mírně klesajícím počtu pacientů v jednotlivých letech, resp. osobodnů). Tento nárůst je s největší pravděpodobností důsledkem klonálního šíření bakterií mezi pacienty, který byl v covidovém období na KARIM prokázán jak u gramnegativních bakterií, tak u vankomycin-rezistentních kmenů *Enterococcus faecium* [19,20]. V roce 2022 došlo k poklesu počtu kmenů *Serratia marcescens* i jejich rezistence k antibiotikům. Zajímavý je nárůst rezistence k vankomycinu u druhu *Enterococcus faecium* v roce 2022 při současném snížení počtu kmenů tohoto species i počtu pacientů v tomto roce. PFGE těchto izolátů odhalila pouze dvojici identických izolátů, a lze tak předpokládat, že rostoucí rezistence k vankomycinu je spojena spíše s přenosem mobilních elementů nesoucích geny *vanA*, respektive *vanB*, spojeným se selektivním tlakem antibiotik. Také u ostatních bakteriálních druhů nebylo v roce 2022 zaznamenáno žádné výraznější klonální šíření a většina (85 %) testovaných izolátů měla jedinečný restriční profil, podobně jako ve studiích provedených na tomto oddělení před vypuknutím pandemie covid-19 [21–23].

Údaje z literatury týkající se vývoje bakteriální rezistence v souvislosti s pandemií covid-19 nejsou zcela jednoznačné. Byly publikovány práce, které ukazují zvýšení rezistence bakteriálních izolátů v průběhu pandemie covid-19 [24], ale i opačné studie, které poukazují na pokles AMR [25]. Přičemž data mohou být odlišná dokonce i v rámci jedné studie. To lze vidět například v práci Bentivegna et al., kteří celkově zaznamenali nižší počet infekcí vyvolaných multi-rezistentními (MDR) bakteriemi v období pandemie. Ale při srovnání různých oddělení odhalili signifikantně vyšší incidenci MDR bakteriálních patogenů u pacientů s covid-19, včetně nárůstu infekcí spojených s ESBL-pozitivními kmeny *Klebsiella pneumoniae* [25]. Rozdílné výsledky v incidenci MDR bakterií, které byly příčinou nozokomiálních infekcí na JIP i standardních odděleních, prokázali také Polly et al. Tito autoři popsali zvýšený záchyt karbapenem-rezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii* a methicilin-rezistentních izolátů *Staphylococcus aureus* (MRSA) během pandemie covid-19 na běžných odděleních i JIP a současně snížení počtu kmenů karbapenem-rezistentních enterobakterií a pseudomonád na JIP. PFGE provedená u MRSA izolátů ukázala více klonů, a horizontální přenos tak v tomto případě pravděpodobně nebyl příčinou většího počtu MRSA

Obrázek 1

Dendrogram izolátů *Klebsiella pneumoniae*



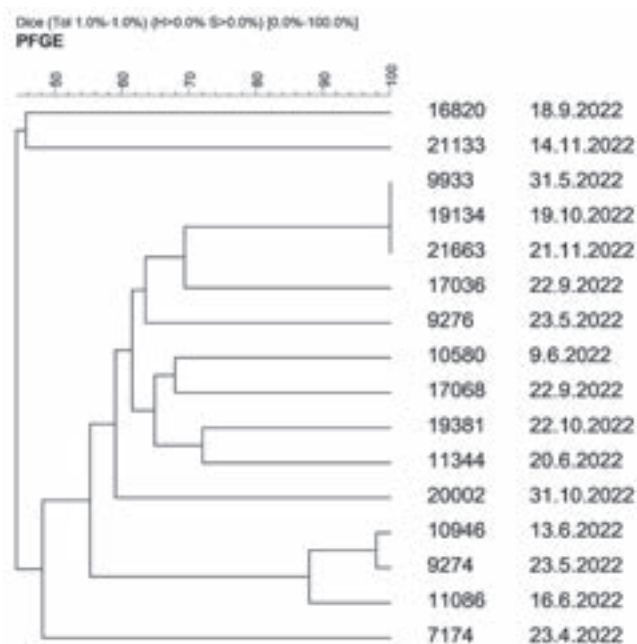
horizontální osa – podobnost bakteriálních izolátů (%)

vertikální osa – označení izolátů, datum odběru

izolátů [26]. Gasperini et al., kteří porovnávali výskyt a rezistenci bakterií u pacientů v průběhu první covidové vlny a po ní, zaznamenali signifikantní nárůst počtu infekcí krevního řečiště vyvolaných MDR kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus* sp. v pocovidovém období, zatímco u močových infekcí ke změně nedošlo. Statisticky významné rozdíly mezi obdobími však nebyly u dalších MDR bakterií, včetně ESBL-pozitivních enterobakterií [27].

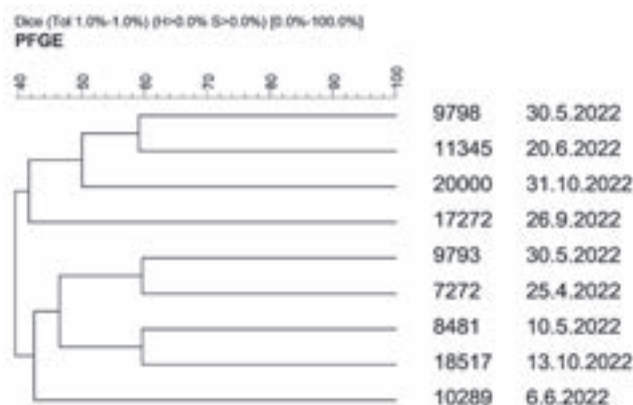
Nízká míra klonálního šíření v pocovidovém období na KARIM opět podtrhuje význam a nutnost hygienicko-epidemiologických režimů, jejichž důsledné dodržování bylo v době vrcholící pandemie covid-19 velmi obtížné. Příčinami byly zejména nemožnost izolovat jednotlivé pacienty z důvodu jejich vysokého počtu a omezené prostorové kapacity zdravotnických zařízení, nedostatek personálu, počáteční nedostatek ochranných pomůcek i využití technologie HFNOT (High-Flow Nasal Oxygen Therapy), které s velkou pravděpodobností přispěly k zaznamenanému horizontálnímu přenosu bakterií mezi pacienty prostřednictvím kontaminovaného aerosolu [19,20]. Pozitivní dopad preventivních programů bránících přenosu bakteriálních kmenů mezi hospitalizovanými pacienty dokládá také práce Elliotta et al., kteří prokázali snížení počtu infekcí vyvolaných MDR bakteriemi v průběhu covidové pandemie, ve srovnání s předchozími obdobími, díky zavedeným restriktivním opatřením a opětovný nárůst těchto infekcí po jejich uvolnění [28].

Obrázek 2
Dendrogram izolátů *Pseudomonas aeruginosa*



horizontální osa – podobnost bakteriálních izolátů (%)
vertikální osa – označení izolátů, datum odběru

Obrázek 3
Dendrogram izolátů *Escherichia coli*



horizontální osa – podobnost bakteriálních izolátů (%)
vertikální osa – označení izolátů, datum odběru

Celkové zhodnocení dopadu pandemie covid-19 na AMR je velmi komplikované. Výsledky jednotlivých studií jsou odlišné a souvisí s tím, že situace v různých oblastech i jednotlivých zdravotnických zařízeních, respektive jednotlivých odděleních, byla velmi proměnlivá. Je zřejmé, že množství dat hodnotících pocovidové období je prozatím málo. Také tato studie má svoje limitace, a to malý počet izolátů, omezení pouze na jedno zdravotnické zařízení a retrospektivní charakter. Na druhou stranu však monitoring AMR na hodnoceném pracovišti probíhá dlouhodobě s využitím shodné metodiky jak v odběru klinického materiálu, tak následném vyšetření vzorků, takže údaje získané ve zmiňovaných časových obdobích lze srovnat.

Závěr

Výsledky naznačují, že frekvence i rezistence nejčastějších bakteriálních agens izolovaných z DCD pacientů hospitalizovaných na KARIM v pocovidovém období zůstávají srovnatelné s dobou před propuknutím pandemie covid-19 i během ní. Výjimkou je druh *Enterococcus faecium*, u něhož došlo k nárůstu rezistence k vankomycinu v covidovém i pocovidovém období. V covidovém období lze zvýšení rezistence s největší pravděpodobností přičíst klonálnímu šíření, to se ale neprokázalo po odeznění pandemie covid-19. Lze předpokládat, že vyšší počet vankomycin-rezistentních izolátů v pocovidovém období poukazuje na přenos genů rezistence prostřednictvím mobilních genetických elementů, což může souviset také se selektivním tlakem antibiotik. Získaná data zdůrazňují význam důkladného mikrobiologického vyšetření, sledování vývoje AMR, nutnost dodržování zásad antibiotického stewardshipu, zapojení molekulárně-biologických metod pro případné odhalení klonálního šíření a v neposlední řadě také důležitost striktního dodržování hygienicko-epidemiologických režimů.

Práce byla podpořena projekty AZV NU22-B-112, IGA LF 2023_012 a RVO FNOL 00098892.

Literatura

- Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Inf Dis*. 2016;63:61–111.
- Torres A, Niederman MS, Chastre J, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2017;50:1–26.
- Uvizl R, Hanulík V, Husicková V, et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155:373–378.
- Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997;111:676–685.
- Herkel T, Uvizl R, Doubravská L, et al. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia: Results of a Central European multicenter, prospective, observational study compared with data from the European region. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2016;160:448–455.
- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:388–416.
- He Y, Li W, Wang Z, et al. Nosocomial infection among patients with COVID-19: A retrospective data analysis of 918 cases from a single center in Wuhan, China. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(8):982–983.
- Wang D, Yin Y, Hu C, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care*. 2020;24(1):188.
- Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–1062.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available from: <http://www.eucast.org>.
- Htoutou Sedlakova M, Hanulík V, Chroma M, et al. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit*. 2011;17:BR147–BR152.
- Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01140–18.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):490–495.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2153–2162.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:24–27.
- Husickova V, Cekanova L, Chroma M, et al. Carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156(4):348–353.
- Zakaria AM, Hassuna NA. Modified PFGE protocol for improving typeability of DNA degradation susceptible nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2019;68(12):1787–1792.
- Fišerová K, Doubravská L, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Dopad pandemie covid-19 na antimikrobiální rezistenci. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2022;(2):36–51.
- Doubravská L, Htoutou Sedláková M, Fišerová K, et al. Bacterial resistance to antibiotics and clonal spread in COVID-19-positive patients on a Tertiary Hospital Intensive care unit, Czech Republic. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(6):783.
- Bogdanová K, Doubravská L, Vágnerová I, et al. *Clostridioides difficile* and vancomycin-resistant enterococci in COVID-19 patients with severe pneumonia. *Life (Basel)*. 2021;11(11):1127.
- Papajk J, Mezerová K, Uvizl R, Štosová T, Kolář M. Clonal diversity of *Klebsiella* spp. and *Escherichia* spp. strains isolated from patients with ventilator-associated pneumonia. *Antibiotics* 2021;10:674.
- Pudová V, Htoutou Sedláková M, Kolář M, working group. Clonality of bacterial pathogens causing hospital-acquired pneumonia. *Curr Microbiol*. 2016;73:312–316.
- Hanulík V, Uvizl R, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Pneumonia-causing bacterial pathogens in intensive care patients. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2011;17:135–140.
- Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;57(4):106324.
- Bentivegna E, Luciani M, Arcari L, et al. Reduction of multidrug-resistant (MDR) bacterial infections during the COVID-19 pandemic: A retrospective study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18:1003.
- Polly M, de Almeida BL, Lennon RP, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *Am J Infect Control*. 2022;50(1):32–38.
- Gasperini B, Cherubini A, Lucarelli M, Espinosa E, Prospero E. Multi-drug-resistant bacterial infections in geriatric hospitalized patients before and after the COVID-19 outbreak: Results from a retrospective observational study in two geriatric wards. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):95.
- Elliott TM, Hurst C, Doidge M, et al. Unexpected benefit of COVID-19 hospital restrictions: Reduction in patients isolating with multidrug resistant organisms after restrictions were lifted. *Infect Dis Health*. 2022;27(1):10–14.

Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa* jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů

K. NOVÁKOVÁ, M. KOLÁŘ

Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc

SOUHRN

Nováková K., Kolář M.: **Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa* jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů**

Bakterie druhu *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) jsou známy svou schopností tvořit biofilm a další produkci faktorů virulence asociovaných s rezistentním fenotypem. Multirezistentní (MDR) PSAE jsou významným problémem ve zdravotnictví, na který se soustřeďuje čím dál více studií zabývajících se terapií infekcí vyvolanými těmito kmeny. V řadě recentních studií se však pozornost zaměřuje spíše na přítomnost faktorů virulence než mechanismů rezistence k užívaným antibiotikům, neboť právě studium faktorů virulence umožňuje rozšířit možnosti efektivní a účelné terapie. V tomto přehledovém článku jsou popsány faktory virulence (FV), vylučované jedním z pěti používaných sekrečních systémů PSAE, u nichž byl pozorován potenciál stát se cílem tzv. antivirulentní terapie infekcí vyvolaných MDR PSAE. Jedná se zejména o alkalickou proteázu (AprA), elastázu B (LasB), exotoxiny A, S a Y (exo-A/S/Y) a pyocyanin. Recentní studie se také kromě konkrétních faktorů virulence zaměřují na složky sekrečních systémů PSAE, které transportují toxiny a lytické enzymy z bakteriální buňky. Inhibicí specifických molekul pro sekreční systémy typu 2 a 3 (T2SS a T3SS) může dojít k zábraně sekrece FV do extracelulárního prostoru a hostitelských buněk, což by mělo významný dopad na snížení virulence PSAE.

Klíčová slova: Pseudomonas aeruginosa, multirezistence, faktory virulence, antivirulentní terapie

SUMMARY

Nováková K., Kolář M.: ***Pseudomonas aeruginosa* virulence factors as a therapeutic target in multidrug-resistant strains**

Pseudomonas aeruginosa (PSAE) is known for its ability to form biofilm and produce other virulence factors associated with a resistant phenotype. Multidrug-resistant (MDR) PSAE strains represent a serious problem in healthcare and are the focus of an increasing number of studies dealing with the therapy of infections caused by these bacteria. Nowadays, a number of studies focus on the presence of virulence factors rather than on the mechanisms of resistance to the antibiotics used, as it is the study of virulence factors that makes it possible to expand the possibilities of effective and efficient therapy. This review describes the virulence factors produced by the one of the five PSAE secretion systems that have the potential to become targets for so-called antivirulence therapy, have been described. These are mainly alkaline protease, elastase B, exotoxins A, S and Y and pyocyanin. In addition to specific virulence factors, recent studies have focused on the components of the PSAE secretion systems that mediate the transport of toxins and lytic enzymes out of the bacterial cell. Inhibition of specific molecules for type 2 and 3 secretion systems may prevent secretion of virulence factors into the extracellular space and host cells, which would have a significant impact on reducing PSAE virulence.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, multidrug resistance, virulence factors, antivirulence therapy

Klin mikrobiol inf lék 2023;29(1):11–19

Adresa: Mgr. Kristýna Nováková, Ph.D., Ústav mikrobiologie, LF UP Olomouc, FN Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, e-mail: Kristyna.Novakova@fnol.cz

Došlo do redakce: 15. 3. 2023

Schváleno k tisku: 20. 5. 2023

Úvod

Multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) byly v roce 2017 dle WHO zařazeny mezi bakterie s urgentní potřebou pro vývoj nových antibiotik [1]. Obecně se bakterie tohoto druhu vyznačují vysokou odolností vůči zevnímu prostředí, včetně dezinfekce, a bývají proto častým původcem nozokomiálních infekcí. Při léčbě nozokomiálních infekcí je proto potřeba terapie rezervními antibiotiky, což při-

spívá k nárůstu výskytu multirezistentních (MDR) bakterií. U gramnegativních nefermentujících bakterií druhu PSAE byla zaznamenána řada primárních i sekundárních mechanismů rezistence, představujících hrozbu pro současné terapeutické postupy. Rozšířené mechanismy rezistence u PSAE jsou dány vysokou variabilitou genomu. Právě plasticita genomu vede k rychlé evoluci pseudomonád, kvůli které je studium nových antimikrobiálních látek neustále ohroženo

dalšími indukovanými mechanismy rezistence [2]. Proto se v poslední době studie zaměřují také na možnosti tzv. antivirulentní terapie. Jedná se o strategii cílící na konkrétní faktory virulence (FV) PSAE, jako jsou proteolytické enzymy nebo faktory asociované se schopností tvořit biofilm.

Sekreční systémy *Pseudomonas aeruginosa*

Export toxinů a lytických enzymů sloužících jako faktory virulence bakterií je zajišťován různými typy sekrečních systémů ("the type x secretory system" TxSS). U pseudomonád jsou ve vztahu k virulenci relevantní sekreční systémy typu I, II, III, V a VI [3]. Sekreční systém typu I (T1SS) představuje spolu se sekrečním systémem typu V (T5SS) nejjednodušší dráhu pro transport látek do extracelulárního prostoru, ačkoliv se liší jejich mechanismus transportu. Sekreční systém typu II (T2SS) patří mezi nejrozšířenější sekreční systémy u gramnegativních bakterií. Z hlediska terapeutického potenciálu je u PSAE nejdůležitějším sekrečním systémem spolu se sekrečním systémem typu III (T3SS). Jedná se totiž o systémy transportující řadu látek s cytotoxickým účinkem na hostitelskou buňku, jejichž přítomnost byla detekována u většiny pseudomonád způsobujících těžké infekce. Disfunkce nebo úplná absence T2SS a T3SS aparátu významně snižuje virulenci PSAE. Proto se kromě efektorových proteinů sekrečních systémů, představujících FV u PSAE, některé výzkumy zaměřují na možnosti inhibice samotného sekrečního systému prostřednictvím přímé interakce látek se složkami těchto sekrečních systémů nebo např. vývojem protilátek proti složkám T3SS [4–6].

Obecně se mohou sekreční systémy rozdělovat do dvou typů. Jednokrokové a dvoukrokové sekreční systémy. Jednokrokové sekreční systémy dopravují látky přímo z cytoplasmy na povrch bakteriálních buněk. Takový mechanismus využívá T1SS, který transportuje látky do vnějšího prostředí nebo T3SS a T6SS, které přímo vstříkují exolátky do hostitelských buněk [7,8]. Systémem T3SS jsou vstříkované toxiny a bakteriální DNA do hostitelských buněk prostřednictvím útvaru připomínajícího jehlu, proto bývá tento aparát označován jako injektozom. Tento injektozom je sestaven ze strukturálních proteinů, bez kterých nelze translokovat toxiny přes cytoplasmatickou membránu (CM) do hostitelské buňky, proto by mohly představovat cíle pro antivirulentní terapii, např. protein PcrV [9]. Ve výše popsaném transmembránovém exportním komplexu je T3SS využíván jak pro stavbu samotné extracelulární jehly, tak pro přímý transport efektorových proteinů do hostitele [10]. Oproti tomu dvoukrokové sekreční mechanismy se vyznačují syntézou prekurzoru daného exoproteinu a jeho exportu prostřednictvím obecné sekretorické dráhy Sec přes CM do periplasmu, kde už se protein nachází ve svém zralém stavu. Proteiny transportované Sec dráhou se vyskytují v nesbaleném stavu a mají N-terminální signální sekvence, které jsou při translokaci přes CM odštěpeny. Kromě Sec dráhy může být prekurzor translokován přes CM do periplasmu také dráhou Tat ("twin-arginine translocase"), která je využívána pro export již sbalených proteinů za účasti kofaktorů [8,11]. Odtud je poté zralý protein přenesen příslušným typem sekrečního systému T2SS nebo T5SS. Lze rozlišit čtyři komplexy T2SS, z nichž proteiny hlavního komplexu T2SS vykazují sekven-

ční homologii s podjednotkami tvořícími bakteriální pilus typu IV, proto bývají označovány jako pseudopilus [12]. Pseudopilus zde hraje roli pístu, poháněným GspE ATPázou, kterým jsou exoproteiny vytlačovány ven z buňky přes sekreční kanály [8]. U T5SS jsou transportovány velké proteiny asociované se schopností adheze PSAE [13]. Nejprve je protein přenesen přes CM Sec dráhou, a poté je transportován přes poriny vnější membrány, na kterých buď setrvává, nebo je proteolyticky štěpen a uvolněn do extracelulárního prostoru. U gramnegativních bakterií existují dva podtypy T5SS, a to autotransportéry (T5aSS a T5cSS) a tzv. TPS sekrece ("two-partner secretion") nebo-li T5bSS, která je obecně u gram-negativních bakterií přímo určena pro sekreci dlouhých proteinů [8]. Sekreční systémy PSAE jsou znázorněny na *obrázku 1*.

Efaktorové proteiny sekrečního systému typu I

Alkalická proteáza

T1SS pseudomonády využívají pro transport alkalické proteázy (AprA). AprA se účastní degradace dvou základních komponent endotelu a bazální laminy, fibronektinu a lamininu [15]. Zároveň byla u této proteázy dokumentována schopnost rozkládat a štěpit proteiny komplementu, jako je C1q, C2, C3 nebo C5a a cytokinů IFN- γ , TNF- α umožňující PSAE fagocytární únik [16–18]. Kromě degradace cytokinů a složek komplementu byla u AprA proteázy pozorována schopnost štěpit bakteriální flagelin, a tudíž potlačit aktivaci toll-like receptorů (TLR-5), které rozpoznávají bičíkaté bakterie, a umožňují tak účinnou likvidaci širokého spektra mikroorganismů [17]. V nedávné studii byla popsána schopnost této proteázy přímo degradovat neutrofilní extracelulární pasti ("neutrophile extracellular traps", NETy), jejichž tvorbu sami podněcují [19]. NETy jsou 3D sítě tvořené zejména z dekonenzované DNA neutrofilů a z granulárních a cytoplasmatických proteinů procesem zvaným netóza. Jedná se o specifický způsob buněčné smrti neutrofilů, během něž dochází k uvolnění 3D sítí pro polapení bakterií a mikroskopických hub jako reakce na probíhající zánět v makroorganismu [20,21]. Rozrušení NETů prostřednictvím AprA hraje klíčovou roli u pseudomonádových plicních infekcí [19]. Kromě samotné schopnosti způsobit patologický stav u hostitele prostřednictvím zmíněných mechanismů účinku je AprA vhodným adeptem pro antivirulentní terapii i díky své detekované přítomnosti u PSAE s rezistencí ke karbapenémům [22], a dokonce nejčastější prevalenci ze všech testovaných faktorů virulence u MDR kmenů PSAE (67,2 %) [23].

Jedním z přístupů zabývajících se vývojem terapeutických látek proti PSAE je navržení molekul odvozených od přirozeného inhibitoru této proteázy (AprI) kódovaného samotnou PSAE [17]. V současné době však není žádná zpráva o pokroku vývoje léku na základě strukturální homologie s AprI. Bohužel ani další publikace od stejného autora nenavštědčují posunu v této problematice. Recentní studie Hirakawa a kol., zabývající se komplexnějším úhlem pohledu, nabízejí alternativní možnost léčby MDR PSAE prostřednictvím vývoje léku na základě použití makroporézního uhlíkatého materiálu na bázi oxidu hořečnatého (MgO).

Tento materiál, MgOC₁₅₀, adsorbuje extracelulární protein, jako je pyocyanin. Tato schopnost významně přispívá k atenuaci toxicity PSAE v lidských epiteliálních buňkách [24]. Makroporózní materiál na bázi MgO kromě FV PSAE adsorbuje také Shiga toxin a efektorové proteiny sekrečního systému T3SS u enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* [25]. Přes potvrzenou schopnost MgOC₁₅₀ suprimovat faktory virulence bakterií in vitro a in vivo je stále otázkou, v jaké podobě, a zda-li jej vůbec bude možné aplikovat v klinické praxi.

Ačkoli je T1SS dobře prostudován, dosud nejsou známy sloučeniny, které by jej blokovaly. Vzhledem k většímu významu ostatních sekrečních systémů PSAE, které tato bakterie používá pro transport toxinů a lytických enzymů, současné studie vyvíjející antivirulentní látky proti PSAE zřejmě neuvažují o T1SS jako o vhodném terapeutickém cíli.

Efaktorové proteiny sekrečního systému typu II

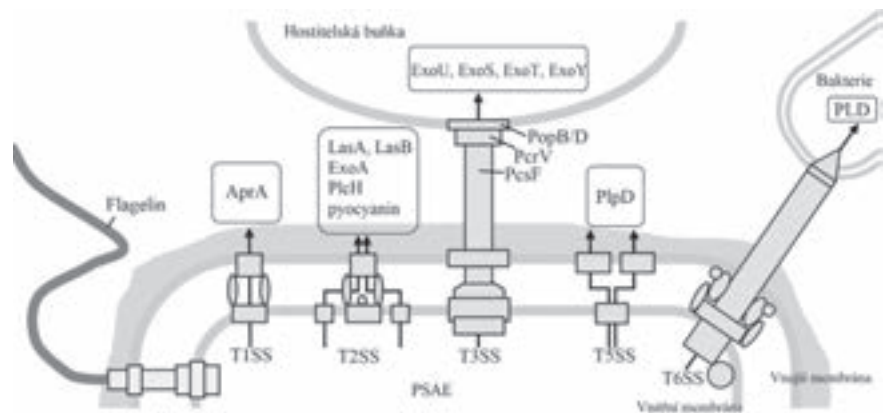
Systémem T2SS jsou z bakteriální buňky uvolňovány FV, které se uplatňují při akutních pseudomonádových infekcích [3]. Jedná se o toxiny, jako je stafylolytická proteáza (lasA) a elastáza B, nebo-li tzv. pseudolysin (lasB), fosfolipáza C (PlcH), pyocyanin nebo exotoxin A (exoA). Zinkové metaloproteázy, zejména lasA a lasB, mají z hlediska cílů pro antivirulentní terapii nejpodstatnější význam. V recentní studii Vermilyea a kol. byla prokázána inhibice aktivity těchto proteáz ve sputu získaných od pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) prostřednictvím zinkové chelatace zprostředkované rekombinantním lidským kalprotektinem [26]. Chelatací bylo dosaženo post-translační inhibice proteolytických aktivit lasA i lasB, což by mělo mít za následek snížení virulence PSAE kolonizující dýchací cesty pacientů s CF.

Elastáza B

Elastáza, konkrétně lasB, je velice diskutovaným efektorovým proteinem vzhledem k jeho abundantnímu výskytu u MDR pseudomonád a jeho proteolytické činnosti působící na elastin, fibronektin, kolagen a další komponenty extracelulárního matrix [23,27–29]. U této elastázy byla zároveň pozorována schopnost podkopávat aktivitu alveolárních makrofágů (AM) prostřednictvím inhibice aktivity komplementu, omezení tvorby reaktivních forem kyslíku generovaných AM a snížená aktivita činnosti nespecifických imunitních reakcí makroorganismu [30]. Kromě její participace v mnoha pochodech inhibujících imunitní systém (IS) hostitele byla u lasB pozorována naopak přímá podpora aktivity časně prozánětlivé signální molekuly IL-1 β a indukce neutrofilního zánětu, vedoucího k destrukci plicní tkáně charakteristické pro těžké pseudomonádové plicní infekce [31], což samo o sobě napovídá o zapojení lasB do etiopatogeneze respiračních onemocnění. V neposlední řadě je lasB

Obrázek 1

Sekreční systémy PSAE (převzato ze studie Liao a kol. 2022) [14]. Vylučované FV příslušným sekrečním systémem jsou uvedeny v obrázci nad každým typem sekrečního systému. Popisu těchto FV se věnují následující kapitoly.



asociována také se schopností zamezit proteázově-dependenčním imunomodulačním pochodům hostitele prostřednictvím degradace bakteriálního flagelinu spolu s AprA za nedostatku vápníku a s tvorbou biofilmu [32,33]. Právě kvůli širokému spektru účinku lasB v hostitelských buňkách představuje zajímavý terapeutický cíl.

Pro účely antivirulentní terapie byly prozkoumány možnosti přirozených i syntetických inhibitorů lasB [34]. Ve studii Galdino a kol. byly studovány účinky odvozených sloučenin od 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu (fendionu). Zejména s navázanou mědí zmínil tento ligand toxický účinek jak purifikovaných molekul lasB, tak bakteriálních sekretů obsahujících lasB v modelu in vivo, čímž prodloužil dobu přežití exponovaných larev zavíječe voskového [28]. Molekulární dokování studie podpořily vazbu tohoto zkoumaného komplexu na lasB, ale k úplnému pochopení mechanismu inhibice je nutná rentgenová krystalografie spolu s dalšími studiemi zabývajícími se interakcí lasB inhibitorů se systémem modelových organismů [34]. Dalším nadějným inhibitorem je derivát N-aryl merkptoacetamidu. Kaya a kol. zdokumentovali pozitivní účinek tohoto derivátu na lidské plicní a kožní buňky, které byly ošetřeny supernatantem obsahujícím lasB. Bylo prokázáno udržení integrity exponovaných plicních a kožních buněk a snížení virulence bakterií. Zároveň byla pozorována zvýšená míra přežití larev zavíječe voskového ošetřených supernatantem kultury PSAE produkujících lasB [35]. Ve studii Yahiaoui a kol. byla spolu s inhibičním efektem derivátu N-aryl merkptoacetamidu na lasB prokázána také schopnost potlačovat produkci metalo- β -laktamáz u bakterie *Klebsiella pneumoniae*, [36], což nabývá na významu této sloučeniny.

Studie, které projevují snahu o zavedení aplikace výše zmíněných dvou sloučenin (fendionu a derivátu N-aryl merkptoacetamidu) do klinické praxe, se v současné době nacházejí v preklinické fázi. Vzhledem k dosavadním datům dokládajících jejich netoxické působení na lidské buněčné linie by se mohlo jednat o sloučeniny s obrovským potenciálem.

Exotoxin A

ExoA je ribotoxin vyplavovaný pomocí T2SS během chronických pseudomonádových infekcí. ExoA indukuje ADP-ribosylaci, a tedy inaktivaci eukaryotického elongačního faktoru 2 (EEF2). V důsledku inaktivace EEF2 se zastaví biosyntéza hostitelského proteinu, což indukuje apoptózu buňky [37]. Jedná se tedy v podstatě o cyklomodulin, který způsobuje zástavu buněčného cyklu, což má cytotoxický účinek na exponovanou buňku. Inaktivace EEF2 vede k ZAK α -dependentnímu ribotoxickému stresu ("Ribotoxic Stress Response", RSR), k aktivaci MAP-kinázy ("Mitogen-Activated Protein", MAP), P38, a k následné fosforylaci inflamazómu NLRP1 způsobující destrukci epitelálních buněk dýchacích cest a rohovky. Právě u pacientů s CF je při exacerbacích detekována aktivita P38 a hypersenzitivita na exoA-indukovaný ribotoxický stres vedoucí k aktivaci NLRP1. Aplikace specifických inhibitorů ZAK kináz by tedy představovala účelnou terapeutickou strategii [38]. Nadějnou antivirulentní terapii představuje rovněž použití lidských jedno-řetězcových protilátek ("human single-chain antibodies", HuscFvs) s vysokou afinitou k exoA. Počítačová simulace prokázala, že tyto vytvořené HuscFv využívají několik zbytků ve svých oblastech určujících komplementaritu (CDR) k vytvoření interakce s katalyticky aktivním místem exoA, který je nezbytný pro ADP-ribosylaci EEF2. Po expozici buněk exoA ošetřených HuscFvs protilátkami byla pozorována inhibice apoptózy buněk, dokonce byla snížena exprese genů asociovaných s apoptózou, *cas3* a *p53*. Účinnost těchto protilátek by měla být otestována na zvířecích modelech s návazností na klinické studie. Z prozatímních dat však vyplývá, že by se mohlo jednat o bezpečnou, účelnou a vysoce efektivní látku zmírňující patologický efekt PSAE u obtížně léčitelných infekcí [39].

Fosfolipáza C

Kromě inhibitorů proteáz je v řešení také možnost zacílit a potlačit aktivitu dalšího faktoru virulence, a to fosfolipázy C (PlcH). Jedná se o klíčový modulátor exprese prozánětlivého interleukinu IL-8 v epitelálních buňkách bronchiolů pacientů s CF [40], přímo asociovaného s dysfunkcí plicního surfaktantu [41]. Ve studii Wolfmeier a kol. byl úspěšně aplikován lipozom obsahující sfingomyelin (Sm) na vysoce virulentní kmen PSAE získaný od pacienta s CF. Po expozici byla u tohoto kmene prokázána neutralizace cytolytické aktivity PlcH, což otevírá nové možnosti terapie infekcí způsobených i ostatními gramnegativními bakteriemi produkujícími PlcH [42].

Pyocyanin

Pyocyanin je metabolitem systému quorum sensing (QS), který je sekretován přes CM pomocí T2SS. Obecně je tento fenazin znám pro svou schopnost propůjčit pseudomonádám zeleno-modré zbarvení. Nejedná se pouze o neškodný pigment, vyznačuje se také schopností indukovat oxidativní stres v hostitelských buňkách, inhibicí aktivity B a T lymfocytů, makrofágů a indukci apoptózy neutrofilů [3]. Působením pyocyaninu v makroorganismu dochází k supresi přirozené i získané imunity [43]. Zejména u pacientů s CF představuje pyocyanin hrozbu, vzhledem k jeho schopnosti indukovat nekontrolovatelné vyplavení NET sítí vedoucí k exa-

cerbaci a poškození plicní tkáně [44]. Toxicita tohoto pigmentu významně ovlivňuje průběh respiračních infekcí, a proto se v současné době různé studie zaměřují na jeho neutralizaci prostřednictvím působení specifických protilátek. Např. studie Susilowati a kol. demonstrovala protektivní účinek Anti-PCN IgY protilátek získaných imunizací kuřat pyocyaninem u exponovaných buněčných linií B lymfocytů sloužících pro výzkumné účely, tzv. Raji buněk. U těchto Raji buněk byla pozorována inhibice pyocyaninem-indukované smrti, dokonce byla popsána zvýšená vitalita zkoumaných Raji buněk [43]. Vývoj terapeutických protilátek je vzhledem k jednoduché dostupnosti, ubikvitárnímu výskytu a patologickému efektu pyocyaninu v makroorganismu velmi diskutovaným tématem [3].

Disrupce T2SS

Systém T2SS se skládá z pěti pseudopilinů, kompletujících se do pseudopilu, který funguje jako píšťka k vytlačení exoproteinů z buněk. Stanovením struktury pseudopilinových komplexů XcpVWX a XcpVW a funkční analýzou bylo ve studii Zhang a kol. potvrzeno, že dva pseudopiliny, XcpV a XcpW, tvoří jádrový komplex nepostradatelný pro hrot pseudopilu. Absence buď XcpV, nebo XcpW vede k nefunkčnosti T2SS. V této studii byly na základě informací o architektuře pseudopilu z měření maloúhlového rozptylu rentgenového záření („Small Angle X-ray Scattering“, SAXS) a následném interakčním rozhraní komplexů vyvinuty inhibiční peptidy narušující komplex XcpVW a tedy celý hrot pseudopilu in vitro a in vivo. Účinnost těchto peptidů byla zkoumána v modelovém organismu, háďátku obecném. Při expozici těchto červů byla pozorována snížená virulence PSAE dokazující inhibiční účinek aplikovaných peptidů [45]. Kromě samotné struktury pseudopilu se řada studií zaměřuje na vývoj látek blokujících Tat dráhu, která je uplatňována před samotnou sekrecí proteinu z periplazmy do extracelulárního prostoru pomocí T2SS.

Pro tyto účely je používána metoda využívající vysoce výkonný screening ("high-throughput screening" HTS). Za použití HTS bylo ve studii Massai a kol. vyhodnoceno cca 40 000 molekul a identifikováno 59 počátečních hitů jako možné inhibitory Tat. V této studii byla použita PlcH jako chromogenní substrát pro testování inhibičního účinku látek, která je exportována do periplazmy pomocí Tat a následně translokována přes vnější membránu T2SS. Snaha týmu Massai a kol. vedla k identifikaci tří Tat inhibitorů a jednoho inhibitoru T2SS. Ačkoli žádný z identifikovaných inhibitorů nebyl vhodný jako hlavní sloučenina pro vývoj léčiv, tato studie potvrzuje potenciál využití HTS jako efektivního způsobu pro identifikaci inhibitorů Tat a T2SS [5]. V další recentní studii byla pomocí in silico analýzy identifikována sloučenina s inhibičním účinkem za použití proteinu ExoA jako sekretovaného markeru u PSAE. Tato identifikovaná sloučenina, která je příbuzná nedávno popsané látce s antimikrobiálním účinkem vůči *Proteus mirabilis* [46], velmi účinně inhibovala sekreci ExoA, nicméně v dalším testování vykazovala problémy se solubilitou v kulturačním médiu při koncentraci vyšší než 250 μ M. Pod touto hranicí koncentrace u ní nebyla prokázána schopnost inhibovat samotný růst PSAE. Vzhledem k prokázané netoxicitě

pro lidskou buněčnou linii A549 však tento inhibitor splňuje požadavky na blokátory virulence bakteriálních systémů [6].

Efektorové proteiny sekrečního systému typu III

Pomocí T3SS pseudomonády injektují toxiny, jako jsou exotoxiny S, T, U a Y (exo-S,T,U,Y) do hostitelských buněk makroorganismu. Tyto toxiny se uplatňují zejména u lokalizovaných infekcí, jako jsou oční infekce nebo pneumonie [3]. U exoY byla prokázána schopnost hromadit cyklické nukleotidy v hostitelské buňce prostřednictvím své nukleotid-cyklázové aktivity. Po infekci myši plicní tkáň pseudomonádou produkující exoY byla pozorována hemoragie, tvorba intersticiálního edému v alveolárních septech a infiltrace perivaskulárního prostoru erytrocyty a neutrofilů. Analýza patogenese na molekulární úrovni potvrdila zvýšenou sekreci cytokinů a prevalenci apoptózy poškozených buněk zároveň s celkovým narušením integrity plicní tkáň [47].

Exotoxin S

Exotoxiny exoS a exoT vykazují 76% sekvenční homologii. V obou případech se jedná o bifunkční cytotoxiny s GTPázovou a ADP-ribosyltransferázovou (ADPr) aktivitou. Oba uvedené cytotoxiny způsobují narušení aktinového cytoskeletu hostitelské buňky pro účely adheze PSAE. Zároveň u nich byla pozorována schopnost indukovat apoptózu hostitelské buňky [14]. Konkrétně exoS je spojován s ireverzibilní destrukcí pulmonárně-vaskulární bariéry vedoucí k diseminaci PSAE, a tedy zhoršení prognózy pacientů s pneumonií [48]. Tento exoprotein vykazuje antifagocytární a cytotoxickou aktivitu. Jeho roli se z hlediska intracelulární perzistence PSAE snažila objasnit nedávná studie Kroken a kol. Výsledky této studie dokazují dvě další role ExoS prostřednictvím své ADPr aktivity při sledování intracelulárního životního cyklu PSAE; potlačení smrti hostitelské buňky pro zachování replikačního cyklu PSAE a inhibice antifagocytárních aktivit ostatních efektorových molekul T3SS pro umožnění bakteriální invaze. Tato zjištění přispívají k rostoucímu množství důkazů, že exoS-kódující (invasivní) kmeny PSAE mohou být fakultativními intracelulárními patogeny [49]. Kromě role exoS při patogenese různého spektra onemocnění byl ve vysoké míře exoS spolu s exotoxinem U (exoU) detekován u MDR klinických izolátů PSAE, proto jsou tyto toxiny považovány za vhodné terapeutické cíle [50].

Vysoce výkonný screening za použití optimalizované fluorescenční esaje s detekcí real-time identifikoval sloučeninu STO1101 inhibující toxicitou aktivitu exoS in vitro. Tato studie navrhuje design inhibitoru exoS na základě chemické struktury STO1101,

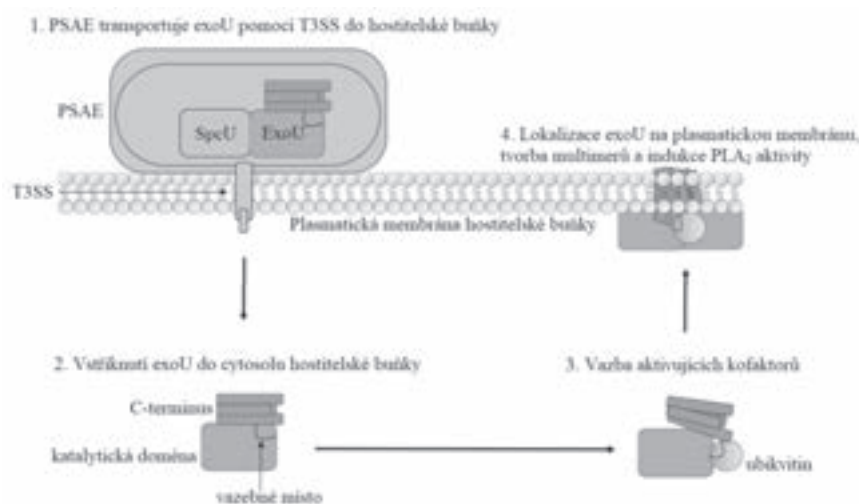
který by vykazoval účinnost také in vivo [51]. Kromě objevu nových inhibičních sloučenin se výzkumy zabývají také potenciálem již popsanych, v praxi aplikovaných látek. Za předpokladu, že by ibuprofen mohl zmírnit virulenci PSAE prostřednictvím inhibice T3SS bylo v nedávné studii Cao a kol. zjištěno, že ibuprofen nejen, že působí bakteriostaticky na PSAE samotnou, ale potlačuje expresi exoS snížením exprese regulačního genu T3SS, ExsA [52].

Exotoxin U

Zatímco aktivita ExoS je spojena s průnikem PSAE za vzniku membránových vezikulů umožňujících intracelulární přežití, exprese ExoU způsobuje rychlou destrukci plazmatické membrány hostitelské buňky. ExoU je považován za nejtoxičtější efektorový protein T3SS, který disponuje fosfolipázovou aktivitou A_2 (PLA₂) způsobující ireverzibilní destrukci buněčných membrán s následnou nekrotizací [53]. U PSAE produkujících exoU byla na myších popsána jeho spojitost s rozvinutím septického šoku v návaznosti na pneumonii [54]. Infekce plicních mikrovaskulárních endotelálních buněk ("pulmonary microvascular endothelial cell" PMVEC) kmeny PSAE produkujícími exoU spustila robustní generaci ROS oproti PMVEC vystaveným PSAE bez exprese ExoU. Fosfolipázová aktivita exoU byla pozorována také u mitochondrií vystavených buněk PMVEC [55].

Přestože mechanismus regulace exprese exoU zatím nebyl zcela objasněn, bylo prokázáno, že pro úspěšnou sekreci exoU je vyžadován chaperon SpcU, který umožňuje rozbalení molekuly exoU a její transport pomocí injektoru do cytosolu hostitelské buňky. Tento chaperon však nepokračuje spolu s exoU na plazmatickou membránu exponovanou buňku, pouze exoU doprovází ven z bakteriální buňky [56]. Zároveň bylo dokumentováno, že fosfolipázová aktivita ExoU je pozorovatelná pouze za přítomnosti lyzátu savčích buněk CHO ("Chinese Hamster Ovary"). Určité eukaryotické hos-

Obrázek 2
Mechanismus toxicity exoU (převzato z Foulkes a kol., 2019) [60]



titelské kofaktory tedy přímo interagují s ExoU a jsou nutné pro indukcí jeho cytotoxické a lytické fosfolipázové aktivity [57]. Následně bylo demonstrováno, že ExoU je aktivován enzymem superoxid dismutázou 1 (SOD1) [58]. Kromě působení SOD1 je pro efektivní utilizaci fosfolipidů vyžadována také lokalizace exoU na plazmatické membráně hostitelské buňky zároveň s jeho ubikvitinací, což koreluje s tvrzením, že pro aktivaci exoU jsou nutné eukaryotické kofaktory, v tomto případě ubikvitin [59]. Dokud je exoU vázán na SpcU, jedná se o neaktivní protein, avšak po jeho ubikvitinaci, následně lokalizaci na plazmatickou membránu a oligomerizaci se začne projevovat PLA2 aktivita (obrázek 2) [60].

ExoU by mohl být jako farmakologický cíl kompatibilní s používanými antibiotiky, přičemž inhibitory ExoU by sloužily jako adjuvantní terapie. Tímto způsobem by inhibitory exoU mohly zmírnit drastické cytotoxické účinky, zatímco konvenční antibiotika by eliminovala PSAE. Kromě strategií pro objevování nových antivirulentních sloučenin jsou zapotřebí další strukturální analýzy, na základě kterých by mohly být prováděny molekulárně řízené designy již objevených inhibitorů ExoU pro jejich bezpečné použití in vivo [60]. Ve studii Foulkes a kol. se podařilo pomocí buněčných esejí, fluorescenční mikroskopie a molekulárního dokování vyhodnotit efektivní nízkomolekulární inhibitory exoU; pseudolipasin A (PSA), sloučenina A a sloučenina B. Pomocí simulací molekulárního dokování bylo potvrzeno, že PSA, sloučenina A a sloučenina B jsou schopny kompetitivní inhibice fosfolipázové aktivity exoU in vitro. Zároveň byla v této studii prokázána schopnost těchto tří látek zmírnit ExoU-dependentní cytotoxicitu po infekci HCE-T ("Human corneal epithelial cell-transformed") buněčné linie v koncentracích pod 0,5 mM. Po přidání antimikrobiální látky, konkrétně moxifloxacinu, bylo docíleno jak inhibice cytotoxického působení exoU, tak inhibice růstu PSAE. Tento experiment tedy dokazuje synergické působení anti-

virulentní látky s antibiotikem. Zároveň studie dokazuje efektivní použití jejich testovacího modelu pro identifikaci účinných inhibitorů ExoU [61].

Disrupce T3SS

Součástí molekulárního komplexu T3SS jsou proteiny PopD, PopB a PcrV spolu s PcrG. Jedná se o proteiny na samotné špičce injektozomu. Svě místo zde má také zatím ne moc detailně charakterizovaná molekula PscF, která prezentuje středovou část jehly (viz obrázek 1). Nicméně vzhledem k této vysoce konzervované části T3SS vyskytující se u všech pseudomonád a yersinií by PscF molekula mohla představovat zajímavý terapeutický cíl. PopD a PopB tvoří heterodimer, který umožňuje sestavení funkčních translokonů s jejich následnou penetrací do cílové buněčné struktury. PcrV a PcrG jsou heterodimery tvořící integrální část hrotu injektozomu. PcrV, nebo-li V antigen PSAE, je asociován se zhoršenou prognózou pacientů a s antibiotickou rezistencí PSAE. Pro svou imunogenitu je molekula PcrV používána pro vývoj vakcín proti pseudomonádovým infekcím [3,62].

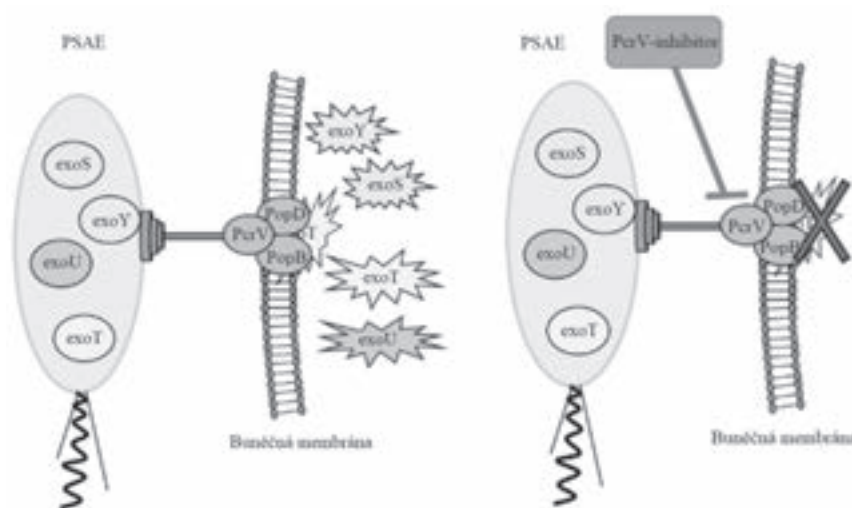
O PcrV proteinu je však uvažováno také z hlediska antivirulentní terapie. V recentní studii bylo zanalyzováno 7 600 malých molekul, které by mohly vykazovat vysokou afinitu k PcrV. Z tohoto souboru molekul byly vybrány netoxické blokátory PcrV, díky kterým bylo dosaženo snížení virulence PSAE prostřednictvím blokace T3SS (obrázek 3). Tyto sloučeniny s inhibiční aktivitou jsou malé velikosti, vykazují dobrou rozpustnost ve vodě a teoreticky je lze upravit pro lékařskou medikaci. Na základě výše uvedených vlastností by se mohly využít jako odrazový můstek pro další vývoj [9].

Na PcrV se soustřeďují také studie zabývající se vývojem aplikovatelných protilátek. KB001-A je pegylovaný fragment monoklonální protilátky proti T3SS s anti-PcrV aktivitou. Na souboru CF pacientů byla provedena dvojitě zaslepená srovnávací studie, ve které byla prokázána bezpečnost

a dobrá snášenlivost sloučeniny KB001-A u testovaných subjektů. Nicméně zde byla dokumentována nedostatečná účinnost KB001-A [63]. Naopak k pozitivním závěrům dospěla studie Ali a kol., ve které byl pozorován účinek látky MEDI13902. Jedná se o bivalentní, bispecifickou monoklonální protilátku třídy imunoglobulinu G1k, která se váže jak na protein PcrV, tak na exopolysacharid Psl umožňující kolonizaci a adhezenci PSAE k buňkám makroorganismu. V klinické studii fáze 1 byla prokázána bezpečnost a efektivita látky MEDI13902 u zdravých subjektů. Vzhledem ke skutečnosti, že MEDI13902 je vyvíjena pro prevenci nozokomiálních infekcí způsobených PSAE, potvrdila tato studie potenciál její aplikace na rizikové pacienty [64]. Po vyhodnocení klinické fáze 2 pro MEDI13902 u pacientů s pseudomonádovou pneumonií nebyla prokázána

Obrázek 3

Inhibice PcrV a zábrana translokace toxinů do hostitelské buňky prostřednictvím T3SS (převzato ze studie Sundin a kol. 2021) [9]



účinnost testované látky [65]. Jiná studie však docílila profylaktického účinku MEDI3902 v kombinaci s meropenemem v souvislosti s infekcí plic a sepse způsobené PSAE u králků [66]. V současné době probíhá celá řada dalších studií, které se soustředí na T3SS jako terapeutický cíl. Pro jejich popis by však byl nutný přehledový článek zabývající se pouze touto problematikou.

Sekreční systém typu V

Tento typ sekrečního systému zprostředkovává transport molekul asociovaných s tvorbou biofilmu, jako jsou EstA nebo fosfolipáza PlpD ("patatin-like protein D"). EstA je autotransportérová molekula s esterázovou aktivitou. Zvyšuje expresi rhamnolipidů, což má za následek podporu tvorby biofilmu [67].

Fosfolipáza PlpD

Oproti EstA je více charakterizována fosfolipáza PlpD, a proto představuje vhodnější terapeutický cíl [3]. PlpD je enzym s fosfolipázovou aktivitou, umožňující adheenci bakterie. PlpD je syntetizována jako makromolekula nesoucí tzv. POTRA ("polypeptide transport-associated") doménu a 16-ti vláknový β -barel. Beta-barel s doménou POTRA vykazují vlastnosti TpsB proteinů. Ty jsou asociovány se specializovanými sekrečními systémy TPS u gramnegativních bakterií. TpsB proteiny jsou umístěny ve vnější membráně, specificky rozpoznávají a následně transportují své partnerské proteiny, TspA [68]. Tento TspA region fosfolipázy PlpD hraje zřejmě roli při inhibici růstu bakterií pro udržení optimální hustoty populace v biofilmu [13]. Snadná dostupnost PlpD a její schopnost zvýšit virulenci PSAE prostřednictvím adheence a regulace tvorby biofilmu, činí fosfolipázu PlpD vhodným adeptem pro vývoj inhibitorů. Bohužel však zatím nejsou žádná data o vývoji látek, které by účinně blokovaly přímo PlpD, nebo její transport pomocí inhibitorů molekul T5SS.

Sekreční systém typu VI

Pomocí T6SS jsou sekretovány FV, jako jsou bakteriolytický protein Tse1-3 hydrolyzující peptidoglykan uplatňující se při bakteriální kompetici a fosfolipáza D (PLD) působící na prokaryotické i eukaryotické buňky [14].

Fosfolipáza D (PldA, PldB)

Jedná se o fosfolipázu se schopností štěpit fosfodiesterové vazby v hlavních komponentách buněčných membrán. Díky své enzymatické aktivitě přispívá k průniku PSAE do epitelálních buněk. PLD fosfolipázy, PldA a PldB, se podílejí také na aktivaci signální dráhy PI3K/Akt, čímž usnadňují invazi PSAE do hostitelských buněk [69,70]. PldA by mohla hrát roli během plicních infekcí, navíc je v kmenech PSAE zřejmě koselektována s determinanty rezistence k imipenemu, což prohlubuje význam tohoto FV z hlediska vývoje antivirulentní látky [71]. Přestože kompletní struktura i mechanismus účinku PldA nebyly až donedávna popsány, recentní studií se podařilo odhalit krystalickou strukturu PldA. Vzhledem ke strukturální podobnosti PldA s eukaryotickou fosfolipázou D, lze spekulovat o tom, že PldA je schopna napodobit určité

funkce hostitelské PLD. Díky informaci o struktuře tohoto enzymu, lze odvodit mechanismu jak aktivace, tak inhibice PldA [70]. Nicméně vzhledem k teprve nedávnému objevení krystalické struktury PldA lze předpokládat, že identifikace účinných inhibitorů této fosfolipázy ještě bude nějaký čas trvat.

Další možnosti alternativní terapie MDR PSAE

Kromě výše popsaných FV, které jsou vylučovány jedním z pěti uvedených sekrečních systémů PSAE, jsou další studie zaměřeny na řadu jiných FV pro účely vývoje antivirulentních látek. Například pyoverdín, hlavní siderofor PSAE, reguluje produkci FV sekretovaných systémem T2SS, jako je exotoxin A a proteázy PrpL, které mají devastující účinek na plicní tkáň, a nepřímo indukuje zánětlivou reakci [72]. Pokud by se podařilo inhibovat produkci pyoverdinu, čímž by se zabránilo sekreci dalších navazujících FV, dosáhlo by se významné atenuace toxicity PSAE.

Kromě antivirulentní terapie se v současné době diskutuje také o tzv. anti-QS strategii. V tomto případě se jedná o inhibici exprese molekul systému QS. Po specifické vazbě autoinduktorů na signální molekuly QS se totiž aktivují geny, jejichž exprese je charakteristická pro příslušný patogenní fenotyp PSAE [73]. Anti-QS strategie tedy představuje, podobně jako antivirulentní terapie, nadějnou alternativu v léčbě infekcí způsobených MDR kmeny PSAE.

Závěr

Prohlubování znalostí v oblasti antivirulentní terapie by mohlo vést ke stanovení nové, cílené a efektivní terapie infekcí vyvolaných PSAE. Tato terapie kombinovaná s antibiotickou léčbou může podstatně zesílit účinnost obou podávaných látek, snížit riziko rozvoje život ohrožujícího septického šoku. V případě, že by se podařilo zavést nové terapeutické postupy využívající terapii antivirulentních látek, významně by to přispělo ke snížení používání antibakteriálních látek ve zdravotnictví, a tím k minimalizaci jejich selekčního tlaku na vývoj sekundárních mechanismů bakteriální rezistence.

Podpořeno projektem „Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU“, projektem IGA_LF_2023_012 a projektem MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

Literatura

1. World Health Organisation. Dostupné z: <https://www.who.int/news-item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
2. Pachori P, Goyalwal R, Gandhi P. Emergence of Antibiotic Resistance *Pseudomonas Aeruginosa* in Intensive Care Unit; a Critical Review. *Genes Dis.* 2019;6:109–119.
3. Proctor LL, Ward WL, Roggy CS, et al. Potential Therapeutic Targets for Combination Antibody Therapy against *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Antibiotics* 2021;10:1–31.

4. Horna G, Ruiz J. Type 3 Secretion System as an Anti-Pseudomonal Target. *Microb. Pathog.* 2021;155:104907.
5. Massai F, Saleeb M, Doruk T, et al. Development, Optimization, and Validation of a High Throughput Screening Assay for Identification of Tat and Type II Secretion Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:250.
6. Swietnicki W, Czarny A, Antkowiak L, et al. Identification of a Potent Inhibitor of Type II Secretion System from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 513:688–693.
7. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:1–37.
8. Blevess S, Viarre V, Salacha R, et al. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas Aeruginosa*: A Wealth of Pathogenic Weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010;300:534–543.
9. Sundin C, Saleeb M, Spjut S, et al. Identification of Small Molecules Blocking the *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System Protein Pcrv. *Biomolecules* 2021;11:1–17.
10. Diepold A, Armitage JP. Type III Secretion Systems: The Bacterial Flagellum and the Injectisome. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015; 370(1679):20150020.
11. Filloux A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas Aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* 2011; 2:1–21.
12. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WJG. The Type II Secretion System: Biogenesis, Molecular Architecture and Mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:336–351.
13. Da Mata Madeira PV, Zouhir S, Basso P, et al. Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type v Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2016;428:1790–1803.
14. Liao C, Huang X, Wang Q, et al. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:1–17.
15. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In *Pathophysiological Aspects of Proteases*; Chakraborti S, Dhalla NS, Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2017; pp 381–397.
16. Laarman AJ, Bardeel BW, Ruyken M, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* 2012;188:386–393.
17. Bardeel BW, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG, et al. Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence: Characterization of the AprA-AprI Interface and Species Selectivity. *J. Mol. Biol.* 2012;415:573–583.
18. Mateu-Borrás M, González-Alsina A, Doménech-Sánchez A, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Adaptation in Cystic Fibrosis Patients Increases C5a Levels and Promotes Neutrophil Recruitment. *Virulence* 2022;13:215–224.
19. Jing C, Liu C, Liu Y, et al. Antibodies Against *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease Directly Enhance Disruption of Neutrophil Extracellular Traps Mediated by This Enzyme. *Front. Immunol.* 2021;12:1–16.
20. Paračková Z, Kayserová J, Šedivá A. Neutrofilní extracelulární pasti - záchranné sítě imunitního systému. *Alergie* 2017;19:33–40.
21. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004;303:1532–1535.
22. Park Y, Koo SH. Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect. Drug Resist.* 2022;15:141–151.
23. Hassuna NA, Mandour SA, Mohamed ES. Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* in Upper Egypt. *Infect. Drug Resist.* 2020;13:587–595.
24. Hirakawa H, Kimura A, Takita A, et al. Adsorption of Extracellular Proteases and Pyocyanin Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Using a Macroporous Magnesium Oxide-Templated Carbon Decreases Cytotoxicity. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2022;3:100160.
25. Hirakawa H, Suzue K, Uchida M, et al. Macroporous Magnesium Oxide-Templated Carbon Adsorbs Shiga Toxins and Type III Secretory Proteins in Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*, Which Attenuates Virulence. *Front. Microbiol.* 2022;13:883689.
26. Vermilyea DM, Crocker AW, Gifford AH, et al. Calprotectin-Mediated Zinc Chelation Inhibits *Pseudomonas Aeruginosa* Protease Activity in Cystic Fibrosis Sputum. *J. Bacteriol.* 2021;203(13):e0010021.
27. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, et al. VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas Aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10:1–17.
28. Galdino ACM, Viganor L, De Castro AA, et al. Disarming *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target. *Front. Microbiol.* 2019;10:1–16.
29. Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska DM, et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, Genes Coding Virulence Factors and Source of Origin of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2021;28:306–313.
30. Bastaert F, Kheir S, Saint-Criq V, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering with Bacterial Killing through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Front. Immunol.* 2018;9:1–18.
31. Sun J, LaRock DL, Skowronski EA, et al. The *Pseudomonas Aeruginosa* Protease LasB Directly Activates IL-1 β . *EBioMedicine* 2020;60: 102984.
32. Yu H, He X, Xie W, et al. Elastase LasB of *Pseudomonas Aeruginosa* Promotes Biofilm Formation Partly through Rhamnolipid-Mediated Regulation. *Can. J. Microbiol.* 2014;60:227–235.
33. Casilag F, Lorenz A, Krueger J, et al. LasB Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA to Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* 2015;84: 162–171.
34. Everett MJ, Davies DT. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase (LasB) as a Therapeutic Target. *Drug Discov. Today* 2021;26:2108–2123.
35. Kaya C, Walter I, Alhayek A, et al. Structure-Based Design of α -Substituted Mercaptoacetamides as Inhibitors of the Virulence Factor LasB from *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 2022,8,1010–1021.
36. Yahiaoui S, Voos K, Hauptenthal J, et al. N-Aryl Mercaptoacetamides as Potential Multi-Target Inhibitors of Metallo- β -Lactamases (MBLs) and the Virulence Factor LasB From *Pseudomonas Aeruginosa*. *RSC Med. Chem.* 2021;12:1698–1708.
37. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: Optimized by Evolution for Effective Killing. *Front. Microbiol.* 2015;6:1–7.
38. Pinilla M, Mazars R., Vergé R, et al. EEF2-Inactivating Toxins Engage the NLRP1 Inflammasome and Promote Epithelial Barrier Disruption upon *Pseudomonas* Infection. *bioRxiv* 2023, 2023.01.16.524164.
39. Santajit S, Seesuy W, Mahasongkram K, et al. Human Single-Chain Antibodies That Neutralize *Pseudomonas Aeruginosa*-Exotoxin A-Mediated Cellular Apoptosis. *Sci. Rep.* 2019;9:1–15.
40. Bezzerri V, d'Adamo P, Rimessi A, et al. Phospholipase C-B3 Is a Key Modulator of IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *J. Immunol.* 2011;186:4946–4958.
41. Wargo M.J, Gross MJ, Rajamani S, et al. Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184:345–354.
42. Wolfmeier H, Wardell SJT, Liu LT, et al. Targeting the *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor Phospholipase C With Engineered Liposomes. *Front. Microbiol.* 2022;13:867449.
43. Susilowati H, Artanto S, Yulianto HDK, et al. The Protective Effects of Antigen-Specific IgY on Pyocyanin-Treated Human Lymphoma Raji Cells. *Wellcome Open Res.* 2019;4:1–12.
44. Rada B, Jendrysik MA, Pang L, et al. Pyocyanin-Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation Requires the NADPH Oxidase. *PLoS One* 2013;8(1):e54205.
45. Zhang Y, Faucher F, Zhang W, et al. Structure-Guided Disruption of the Pseudopilus Tip Complex Inhibits the Type II Secretion in *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2018;14:1–27.
46. Swietnicki W, Czarny A, Urbanska N, et al. Identification of Small Molecule Compounds Active against *Staphylococcus Aureus* and *Proteus Mirabilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;506: 1047–1051.
47. Kloth C, Schirmer B, Munder A, et al. The Role of *Pseudomonas Aeruginosa* Exoy in an Acute Mouse Lung Infection Model. *Toxins (Base)*. 2018;10:1–15.
48. Rangel SM, Diaz MH, Knoten CA, et al. The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas Aeruginosa* during Pneumonia. *PLoS Pathog.* 2015;11:1–27.

49. Kroken AR, Kumar NG, Yahr TL, et al. Exotoxin S Secreted by Internalized *Pseudomonas Aeruginosa* Delays Lytic Host Cell Death. *PLoS Pathog.* 2022;18:1–28.
50. Horna G, Amaro C, Palacios A, et al. High Frequency of the ExoU+/ExoS+ Genotype Associated with Multidrug-Resistant “High-Risk Clones” of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates from Peruvian Hospitals. *Sci. Rep.* 2019;9:1–13.
51. Pinto AF, Ebrahimi M, Saleeb M, et al. Identification of Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin-S ADP-Ribosyltransferase Activity. *J. Biomol. Screen.* 2016;21:590–595.
52. Cao J, Xie Z, Zhang Y, et al. Ibuprofen Suppresses the Expression of ExoS Secreted by *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System in Vitro. *Acta Medica Mediterr.* 2022;38:8.
53. Sato H, Frank DW. ExoU Is a Potent Intracellular Phospholipase. *Mol. Microbiol.* 2004;53:1279–1290.
54. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Acquisition of Expression of the *Pseudomonas Aeruginosa* ExoU Cytotoxin Leads to Increased Bacterial Virulence in a Murine Model of Acute Pneumonia and Systemic Spread. *Infect. Immun.* 2000;68:3998–4004.
55. Hardy KS, Tuckey AN, Renema P, et al. ExoU Induces Lung Endothelial Cell Damage and Activates Pro-Inflammatory Caspase-1 during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Toxins (Basel).* 2022;14:1–19.
56. Halavaty AS, Borek D, Tyson GH, et al. Structure of the Type III Secretion Effector Protein ExoU in Complex with Its Chaperone SpcU. *PLoS One* 2012;7(11):e49388.
57. Phillips RM, Six DA, Dennis EA, et al. In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas Aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2003;278:41326–41332.
58. Sato H, Feix JB, Frank DW. Identification of Superoxide Dismutase as a Cofactor for the *Pseudomonas* Type III Toxin, ExoU. *Biochemistry* 2006;45:10368–10375.
59. Stirling FR, Cuzick A, Kelly SM, et al. Eukaryotic Localization, Activation and Ubiquitinylation of a Bacterial Type III Secreted Toxin. *Cell. Microbiol.* 2006;8:1294–1309.
60. Foulkes DM, McLean K, Haneef AS, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms* 2019;7:11–13.
61. Foulkes DM, McLean K, Zheng Y, et al. A Pipeline to Evaluate Inhibitors of the *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin U. *Biochem. J.* 2021;478:647–668.
62. Moriyama K, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Protective Effects of Affinity-Purified Antibody and Truncated Vaccines against *Pseudomonas Aeruginosa* V-Antigen in Neutropenic Mice. *Microbiol. Immunol.* 2009;53:587–594.
63. Jain R, Beckett VV, Konstan MW, et al. KB001-A, a Novel Anti-Inflammatory, Found to Be Safe and Well-Tolerated in Cystic Fibrosis Patients Infected with *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Cyst. Fibros.* 2018;17:484–491.
64. Ali SO, Yu XQ, Robbie GJ, et al. Phase 1 Study of MEDI3902, an Investigational Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* PcrV and Psl Bispecific Human Monoclonal Antibody, in Healthy Adults. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25:629.e1-629.e6.
65. Chastre J, François B, Bourgeois M, et al. Efficacy, Pharmacokinetics (PK), and Safety Profile of MEDI3902, an Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Bispecific Human Monoclonal Antibody in Mechanically Ventilated Intensive Care Unit Patients; Results of the Phase 2 EVADE Study Conducted by the Public. *Open Forum Infect. Dis.* 2020;7:S377–S378.
66. Le HN, Tran VG, Vu TTT, et al. Treatment Efficacy of MEDI3902 in *Pseudomonas Aeruginosa* Bloodstream Infection and Acute Pneumonia Rabbit Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019;63:3–7.
67. Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al. The Autotransporter Esterase EstA of *Pseudomonas Aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2007;189:6695–6703.
68. Cai X, Wang R, Filloux A, et al. Structural and Functional Characterization of *Pseudomonas Aeruginosa* CupB Chaperones. *PLoS One* 31;6(1):e16583.
69. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, et al. A *Pseudomonas Aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host Microbe* 2014;15:600–610.
70. Yang X, Li Z, Zhao L, et al. Structural Insights into PA3488-Mediated Inactivation of *Pseudomonas Aeruginosa* PldA. *Nat. Commun.* 2022;13:1–13.
71. Boulant T, Boudehen YM, Filloux A, et al. Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas Aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front. Microbiol.* 2018;9:1–7.
72. Kang D, Kirienko VN. *Pseudomonas Aeruginosa* Siderophores Damage Lung Epithelial Cells and Promote Inflammation. *bioRxiv Prepr.* 2023.01.26.525796.
73. Papenfort K, Bassler BL. Quorum Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14:576–588.

Mikrobiologické metody identifikace původců infekcí krevního řečiště se zaměřením na T2Bacteria Panel

L. CÍCHOVÁ¹, M. ANTUŠKOVÁ², O. DŽUPOVÁ¹

¹Klinika infekčních nemocí, 3. LF UK a FN Bulovka; ²Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol

SOUHRN

Cíchová L., Antušková M., Džupová O.: **Mikrobiologické metody identifikace původců infekcí krevního řečiště se zaměřením na T2Bacteria Panel**

Zlatým standardem k určení etiologického agens infekce krevního řečiště je hemokultivační vyšetření. Jeho hlavními nevýhodami jsou relativně nízká senzitivita a dlouhá doba do detekce patogenu, což vede k pozdnímu podání cílené antibiotické léčby a k nutnosti zahajovat empirickou léčbu širokospektrými antibiotiky. Takový postup negativně ovlivňuje celkové léčebné výsledky a přispívá k šíření antibiotické rezistence. Výzkum v posledních letech umožnil zavést metody pro rychlejší identifikaci patogenních mikrobů z pozitivní hemokultury a dále metody přímé detekce patogenů z plné krve bez nutnosti předchozí hemokultivace. Metody přímé detekce z plné krve dramaticky zkrátily čas do detekce etiologického agens infekce krevního řečiště, mají však rovněž své limity. Jako poměrně perspektivní se jeví metody, které kombinují PCR a T2 váženou magnetickou rezonanci. V článku je podán přehled diagnostických metod a podrobný popis testu T2Bacteria Panel, jeho výhody a nevýhody vycházející z prospektivních observačních studií a přehledových článků. Zařazení těchto metod do diagnostiky infekcí krevního řečiště a potenciálně i lokalizovaných infekcí by mohlo mít v budoucnu pozitivní vliv na časné podání cílené antimikrobiální léčby a následně i na celkové léčebné výsledky a zpomalení šíření antibiotické rezistence.

Klíčová slova: bakteriemie, sepsis, T2Biosystems, T2Bacteria Panel, antibiotická léčba, přímá diagnostika

SUMMARY

Cíchová L., Antušková M., Džupová O.: **Microbiological methods for identification of the etiological agents of bloodstream infections with focus on the T2Bacteria Panel**

Blood culture is the gold standard method for identifying the etiological agents of bloodstream infections. A relatively low sensitivity and a long time to detection are its main disadvantages, resulting in delayed administration of pathogen-specific antibiotic therapy and the need to initiate empiric treatment with broad-spectrum antibiotics. Such an approach negatively affects overall treatment outcomes and contributes to the spread of antibiotic resistance. Research in recent years has allowed the introduction of methods for rapid identification of pathogenic microbes from positive blood cultures, as well as methods for direct detection of bacteria and fungi from whole blood without the need for prior culture. Direct detection tests from whole blood have dramatically reduced the time to identify the causative pathogen of a bloodstream infection, but they also have their limitations. Methods that combine PCR and T2-weighted magnetic resonance imaging appear promising. This article provides an overview of diagnostic tests and a detailed description of the T2Bacteria Panel, its advantages and disadvantages based on prospective observational studies and review articles. Future implementation of these methods in the diagnosis of bloodstream infections and potentially localized infections could have a positive impact on the early administration of pathogen-specific antimicrobial therapy and subsequently on overall treatment outcomes, as well as on reducing the spread of antibiotic resistance.

Keywords: bacteremia, sepsis, T2Biosystems, T2Bacteria Panel, antibiotic treatment, direct detection

Klin mikrobiol inf lék 2023;29(1):20–25

Adresa: MUDr. Lucie Cíchová, Klinika infekčních nemocí FNB, Budínova 67/2, 180 81 Praha 8-Libeň,
e-mail: lucie.cichova@protonmail.com

Došlo do redakce: 10. 5. 2023

Schváleno k tisku: 7. 6. 2023

Úvod

Infekce krevního řečiště (bloodstream infection, BSI) je definovaná jako onemocnění se systémovými příznaky infekční nemoci a pozitivní hemokulturou, jinými slovy je to

bakteriemie či fungemie se systémovými příznaky. Může být sekundární, vycházející z infekčního ložiska přítomného v těle, nebo primární bez ložiska [1]. Zlatým standardem určení původce bakteriemie a fungemie je hemokultivace,

kteřá má však i přes svůj nezpochybnitelný přínos řadu nevýhod. Hlavními limitacemi je nedostatečná citlivost, potřeba odběru relativně velkého množství krve a dlouhá doba do identifikace patogenu. Falešná negativita hemokultivace je často způsobena antibiotiky podanými před odběrem krve. Podle studie Sheera et al. se u pacientů se sepsí citlivost hemokultury snížila z původních 50,6 % na 27,7 % po zahájení antibiotické léčby ($p < 0,001$) [2]. Podle jiného zdroje klesá citlivost hemokultivace po podání antibiotik až o 50 % [3]. Interpretaci výsledků hemokultivace komplikuje i častá falešná pozitivita, způsobená kontaminací krve během preanalytické fáze.

Doba do průkazu původce z hemokultury (tzv. turnaround time, TAT) se pohybuje při použití klasických metod identifikace patogenů v rozmezí 48–72 hodin. Přitom včasné zahájení adekvátní antibiotické léčby sepse je naprosto zásadní, neboť její zpoždění je spojeno s vyšší morbiditou a letalitou, prodloužením doby léčby, doby hospitalizace a s tím souvisejícími dalšími komplikacemi, a s vyššími ekonomickými náklady. Nedostatečná citlivost hemokultury a dlouhý TAT vedou obvykle k nutnosti zahájit empirickou antibiotickou léčbu, a pro tu se obvykle při neznalosti patogenu zvolí širokospektrý přípravek nebo kombinace více léků, jejichž antibakteriální spektrum se sčítá. Empirická antibiotická léčba má větší potenciál jak terapeutického selhání, tak vzniku nežádoucích účinků, jako je dysmikrobie, toxické a alergické reakce a mnohem větší dopad na vznik a šíření antibiotické rezistence ve srovnání s léčbou cílenou na konkrétní patogen.

Již zavedení metody MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight) do běžné laboratorní praxe v posledních deseti letech významně zkrátilo čas nutný k identifikaci patogenu a stanovení citlivosti na antibiotika. Metoda je založená na porovnávání proteinového profilu vyšetřovaného patogenu získaného hmotnostní spektrofotometrií s databází profilů konkrétních mikroobů. Vyšetření plynule navazuje na pozitivní detekci v hemokulturách v automatickém hemokultivačním systému a patogen je určen během 12–24 hodin po pozitivitě hemokultury. Citlivost je uváděna v rozmezí 60–99 % v závislosti na konkrétní bakterii. U gramnegativních bakterií díky přesné extrakci proteinů z buněčné stěny se citlivost pohybuje mezi 84–99 %, u grampozitivních bakterií se uvádí nejčastěji kolem 80 % s rozmezím 65–96 % [4]. MBT Sepsityper® IVD Kit je test společnosti Bruker, který umožňuje zrychlenou identifikaci pomocí MALDI-TOF z pozitivní hemokultury během 15–20 minut [5]. I přes urychlení detekce jsou testy založené na metodě MALDI-TOF závislé na citlivosti hemokultury a čase do pozitivivity.

Nové diagnostické metody

Současným trendem v mikrobiologii je vývoj rychlých diagnostických testů, tzv. rapid diagnostic testing (RDT), mezi něž kromě molekulárně genetických metod patří i detekce antigenů, enzymů produkovaných bakteriemi a zánětlivých mediátorů. Molekulárně genetické metody do velké míry splňují požadavky na vysokou citlivost, rychlost a minimalizaci pracnosti. Metody používané k určení původců sepse lze rozdělit na metody identifikace z pozitivní hemokultury

a metody přímé detekce z plné krve. Podle principu použité metody se rozlišují metody amplifikační (nucleic acid amplification techniques, NAAT) s využitím PCR (polymerázové řetězové reakce) a sekvenační metody nové generace.

1. Metody identifikace z pozitivní hemokultury

Tyto metody jsou i přes svou vysokou citlivost 91–100 %, velké spektrum panelu detekovaných patogenů, včetně genů rezistence a rychlost vlastního provedení 1–3 hodiny stále zatíženy dlouhým celkovým časem do identifikace, který zahrnuje i dobu hemokultivace do pozitivivity [6]. Přehled metod je uveden v *tabulce 1*.

2. Metody přímé detekce z plné krve

Paralelně s rychlým vývojem metod identifikace z hemokultur rychle přibývá i technologií k detekci patogenů přímo z plné krve. Jejich hlavním bonusem je dramatické zkrácení času do identifikace patogenu na 3–6 hodin, nevýhodou některých je poměrně nízká senzitivita ve srovnání s identifikací z hemokultury. První test pro detekci patogenů z plné krve zavedený do praxe byl The LightCycler® SeptiFast firmy Roche pracující na principu real-time PCR, se senzitivitou 65–75 %, který byl posléze stažen z trhu [11]. Kombinace patogen specifické PCR a miniaturizované T2 vážené magnetické rezonance je podstatou metody použité firmou T2Biosystems pro detekci bakteriálních a fungálních patogenů a genů rezistence, která bude podrobněji popsána níže. Přehled metod je uveden v *tabulce 2*.

Naděje byla vkládána do systému IRIDICA firmy Abbott, který kombinuje patogen specifickou PCR a Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS); panel obsahoval 780 mikroorganismů a 4 geny rezistence. Firma Abbott však přestala výzkum podporovat a jeho testování bylo po dvou letech pozastaveno. Důvody pro stažení studie byly ekonomické, logistické i regulační. Ukázalo se, že přístroj je náročný na prostor, cena přístroje i reagentů je vysoká, je nutná nepřetržitá obsluha, propustnost je nízká a není dostatek studií prokazujících přínos metody [18]. Čeští autoři Tkadlec a kol. ve studii prokázali, že diagnostika systémem IRIDICA je ve srovnání s konvenčními metodami průměrně o 34 hodin kratší [19].

Nevýhodami PCR metod je nemožnost odlišit infekci a kolonizaci (u infekcí krevního řečiště infekci a kontaminaci), potřeba dostupnosti zkušeného a kvalifikovaného pracovníka a adekvátního laboratorního prostředí, absence vyšetření citlivosti a detekce omezeného spektra patogenů, na které je test cílený [6]. Výsledky mohou být zkreslené přítomností inhibitorů amplifikace a nízkou koncentrací mikroorganismů.

Sekvenační metody nové generace se dělí na amplifikační a tzv. shotgun metody. Amplifikační neboli sekvenační analýza 16S je založena na amplifikaci genu pro 16S rRNA bakterií nebo 18S rRNA hub pomocí univerzálních primerů; amplicony jsou poté sekvenovány a podle získaného taxonomického profilu je identifikována bakterie nebo houba. Shotgun metody stejně jako sekvenační analýza 16S využívají sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS), ale sekvenuje se při nich paralelně veškerý genetický materiál obsažený ve vzorku. Sekvence je tedy

Tabulka 1
Molekulární metody identifikace patogenů z pozitivní hemokultury (upraveno podle Peri et al. [6])

Technologie	Výrobce	Název	Detekované mikroby	Senzitivita [%]	Specificita [%]
Multiplex PCR	bioMérieux	The BioFire Blood Culture Identification 2 Panel (BCID2)	15 G+, 11 G- bakterií, 7 hub, 10 genů rezistence	99 ^a	99,8
Real-time PCR	Cepheid	Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay	MSSA/MRSA	100 ^b	99,5/100
	Cepheid	Xpert Carba-R assay	Karbapenemázy	100 ^c	96,7
PCR + DNA Microarray	Luminex	Verigene Blood Cluture system	13 G+, 9 G- bakterií, 8 genů rezistence	92,6–98,6 ^d	95,4–99,5
FISH 16S/18S rRNA	AdvanDx	4 panely nazvané podle detekovaných cílů (stafylokoky, enterokoky, gramnegativy, kandidy)	8 bakterií, 4 houby	88–99	98–100

G+ – grampozitivní, G- – gramnegativní, FISH – fluorescenční in situ hybridizace

^a <https://www.biomerieux-diagnostics.com/> [7], ^b Spencer et al. [8], ^c Ko et al. [9], ^d Siu et al. [10]

nečleněná (untargeted sequencing). Výsledkem je identifikace patogenu a potenciálně i genů rezistence. Tyto metody umožňují obsáhlou analýzu genetického materiálu ve vzorku, mají však rovněž své limity: jsou nákladné a náročné na kvalifikovaný personál a informační systém k interpretaci výsledků, jejich citlivost je při detekci z krve ovlivněna častým záchytém kontaminace a přítomností lidské DNA.

Přímá diagnostika metodou PCR v kombinaci s magnetickou rezonancí

Výrobce T2Biosystems, Lexington, MA, USA, v roce 2018 uvedl na trh inovativní, plně automatizovaný stolní přístroj T2Dx Instrument, určený k detekci patogenů a genů rezistence přímo z plné krve. V současné době existují čtyři panely: pro bakteriální a kandidové infekce, pro geny rezistence a nejnověji i rozšířený panel pro další druhy kandid. První tři jsou již schválené americkými a evropskými regulačními orgány (FDA – U. S. Food and Drug Administration, CE-IVD – Conformité Européenne – in vitro diagnostics). T2Bacteria® Panel identifikuje šest bakterií nejčastěji způsobujících nozokomiální infekce krevního řečiště známé pod akronymem ESKAPE: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* (ve zkratce ESKAPE je obvykle pod druhým písmenem „E“ uveden *Enterobacter* spp.). T2Candida® Panel je určen k průkazu *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* a *Candida parapsilosis*. Panel T2Resistance je určen k detekci 13 genů rezistence grampozitivních a gramnegativních bakterií [20].

Principem metody je detekce mikrobiálních nukleových kyselin patogen specifickou PCR a následná detekce ampliconů pomocí T2 vážené magnetické rezonance (T2MR). V přístroji dochází k zakoncentrování patogenů, lýze buněk a amplifikaci uvolněné nukleové kyseliny pomocí PCR. Přítomná je termostabilní polymeráza a primery ESKAPE bakterií nebo kandid. Amplicony bakteriální nebo kandidové DNA hybridizují na sondách navázaných na superparamagnetické částice, vznikají jejich agregáty, které jsou díky změně chování v magnetickém poli detekovány pomocí T2MR.

K vyšetření je nutné pacientovi odebrat 4 ml nesrážlivé krve do zkumavky K2EDTA nebo K3EDTA Vacutainer. Výsledek je k dispozici za 3–5 hodin. Současně je v přístroji možné vyšetřovat 1–7 vzorků, jeden vstup je vyhrazen pro statimové vyšetření. Metoda je velice citlivá, limit detekce je 1 CFU/ml, tedy nižší než u klasické PCR. V každém vzorku je interní kontrola, která monitoruje proces amplifikace a detekce. Ověřuje, zda vzorek neobsahuje interferující inhibitory a ověřuje pravdivost negativního výsledku. Hlavní výhody této metody jsou vysoká senzitivita, specificita a krátký TAT. Výrobce udává senzitivitu u bakterií a kandid 90 % a 91 % a specificitu 98 % a 99 % [21,22].

V první studii hodnotící T2Bacteria Panel autorů De Angelis et al. bylo vyšetřeno 140 vzorků od 129 pacientů se suspekci na infekci krevního řečiště. Senzitivita byla 83,3 % a specificita 97,6 %. Negativní prediktivní hodnota byla stanovena na 99,8 %. U 13,8 % vzorků byl výsledek diskordantní – T2Bacteria Panel pozitivní a hemokultura negativ-

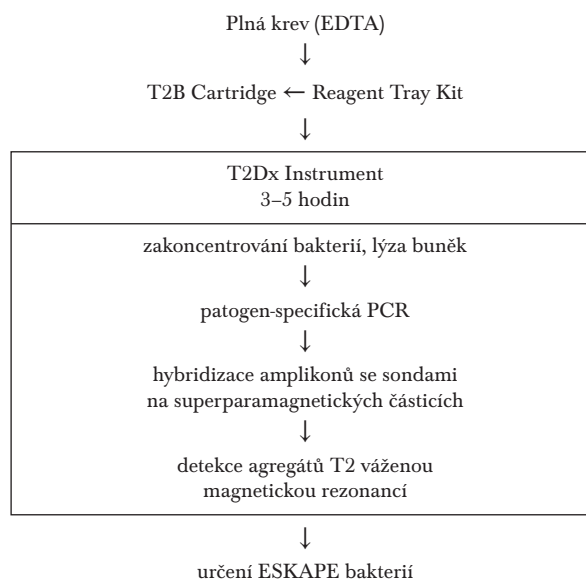
ní, a vzorky byly hodnoceny jako falešně pozitivní. Po zavedení tzv. true-infection kritéria, které umožnilo zahrnout do hodnocení citlivosti kromě hemokultury i výsledky vyšetření dalších validních biologických materiálů, senzitivita stoupla na 89,5 % a specificita na 98,4 %. Ukázalo se, že vzorky s diskordantním výsledkem byly odebrány pod antibiotickou clonou, proto byla bakteriální nálož pro kultivaci na rozdíl od T2Bacteria Panel příliš nízká. Díky vysoké citlivosti technologie T2MR detekuje i patogeny ovlivněné již zahájenou antibiotickou léčbou. Zajímavé bylo, že vzorky vyšetřované T2Bacteria Panel byly méně často kontaminované, protože byly odebrány jako druhé v pořadí za hemokulturami [23].

Nguyen et al. publikovali zatím nejrozsáhlejší studii hodnotící T2Bacteria Panel, která zahrнула 1 427 pacientů v 11 amerických nemocnicích. Hemokultura byla pozitivní na sledované bakterie u 3 % a T2Bacteria Panel pozitivní u 13 % vzorků. Senzitivita a specificita byly shodně 90 %, negativní prediktivní hodnota byla 99,7 %. V 10 % případů byla hemokultura negativní a T2Bacteria Panel pozitivní. Autoři zavedli následující kritéria pro hodnocení spolehlivosti výsledků: „proven BSI“ – hemokultura a T2Bacteria Panel současně pozitivní, „probable BSI“ – hemokultura negativní, T2Bacteria Panel pozitivní, patogen byl prokázán z jiného odběru hemokultury nebo validního biologického materiálu, „possible BSI“ – hemokultura negativní, T2Bacteria Panel pozitivní, detekovaná bakterie byla věrohodnou etiologií zjištěné choroby (např. *E. coli* u cholangoitidy). Pokud z 10 % neshodných výsledků byly „probable“ a „possible“ výsledky považovány za pravdivě pozitivní, specificita se zvýšila na 96 %. Diskrepanci mezi negativním výsledkem hemokultivace a pozitivním výsledkem T2Bacteria Panel autoři vysvětlují schopností T2Bacteria Panel detekovat i bakterie usmrcené, neproliferující, inhibované antibiotiky nebo intracelulární ve fagocytech. Může se však jednat i o falešnou pozitivitu danou přítomností bakteriální DNA při tranzitní bakteriemii v důsledku krátkodobého a klinicky nezávažného porušení kolonizované sliznice nebo kůže [24].

V navazující studii se autoři zaměřili na neshodné výsledky mezi hemokultivací a T2Bacteria Panel. Z 233 pacientů se u 21 vzorků od 20 pacientů (9 %) lišil výsledek pozitivní T2Bacteria Panel a negativní hemokultury. Osmdesát procent těchto pacientů bylo v době odběru léčeno antibiotiky. Neshodné výsledky byly opět hodnoceny podle výše popsaných kritérií pro proven, probable a possible bakteriemií. Při nesplnění kritérií byl výsledek T2Bacteria Panel hodnocen jako falešně pozitivní. U 14 z 20 pacientů (15 z 21 vzorků) s diskordantním výsledkem byl nález vyhodnocen jako probable nebo possible bakteriemie a byla u nich diagnostikována ložisková infekce: u sedmi pacientů pyelonefritida, u čtyř absces, jednotlivě pneumonie, infikovaný hematom a osteomyelitida. Tyto lokalizované infekce byly způsobeny patogenem detekovaným T2Bacteria Panel, jiný patogen nebyl z biologického materiálu prokázán. Test T2Bacteria Panel je tedy pravděpodobně schopen detekovat původce lokalizované infekce, při níž dochází k intermitentní bakteriemii. Významnou roli v nesouladu výsledků mezi oběma metodami autoři rovněž připisují antibiotikům [25].

V dosud jediné české studii autorů Dřevínka et al. byla zjištěna senzitivita 94 % a specificita 100 %. V 36,7 % pozi-

Obrázek 1
Schéma metody T2Bacteria Panel



itivních vzorků byl patogen prokázán pouze pomocí T2Bacteria Panel, tyto pacienti byli v době odběru již léčeni antibiotiky. Šedesát procent pacientů díky rychlejší metodě dostalo časněji cílenou léčbu. V průběhu studie se zvýšila i citlivost hemokultur ze 14,8 % na 36,4 %, patrně v důsledku nového proškolení personálu ve správném provedení odběru krve [26].

Rychlost identifikace patogenu pomocí T2Bacteria Panel zůstává zatím nepřekonaná. Čas do detekce se mění v závislosti na počtu simultánně vyšetřovaných vzorků. Ve studii autorů Nguyen et al. byl výsledek dostupný průměrně za 3,61 h, při plném obsazení přístroje za 7,7 h. Čas do pozitivní signalizace hemokultur byl v průměru 38,5 h a do identifikace patogenu 71,7 h [24]. Ve studii Dřevínka et al. trvala detekce patogenů pomocí T2Bacteria Panel průměrně o 55 hodin méně než hemokultivace [26].

Test T2Bacteria Panel má i své limity. Riziko kontaminace je pravděpodobně nižší než u jiných PCR technik a spadá především do preanalytické fáze. Je důležité provést aseptický odběr krve, zamezit kontaminaci vzorku při další manipulaci a před každým použitím povrch přístroje a pracovní plochu důkladně a opakovaně dezinfikovat. Při vlastním vyšetření je práce s biologickým materiálem minimalizována. Do přístroje se vkládá přímo zkumavka s materiálem a není potřeba žádná laboratorní příprava, při níž by mohlo dojít k případné kontaminaci. Kromě toho běžné kožní kontaminanty (koaguláza-negativní stafylokoky a kožní kmeny korynebakterií) nejsou v panelu obsaženy a metoda je tedy nedetekuje. T2Dx přístroj je uzavřený systém a T2Bacteria Panel je zacílen na DNA obsaženou v bakteriálních buňkách, nikoliv na volnou DNA. Tyto vlastnosti byly vyvinuty s cílem minimalizovat kontaminaci a inhibici cirkulující lidskou DNA [24].

Tabulka 2
Molekulární metody přímé detekce patogenů z plné krve (upraveno podle Peri et al. [11])

Technologie	Výrobce	Název	Detekované mikroby	Senzitivita (%)	Specifická (%)
Amplifikační metody (NAAT)					
Multiplex real-time PCR	Seegene	MagiPLEX™ Sepsis Real-Time test	73 G+, 12 G- bakterií, 6 hub, 2 geny rezistence	29–65	66–95
PCR + miniaturizovaná MR	Bruker Daltonik	Fungiplex® Candida	6 druhů kandid	100	94,1
	T2Bacteria® Panel	T2Biosystems	6 bakterií	90	98
	T2Candida® Panel	T2Biosystems	5 druhů kandid	91	99
	T2Resistance® Panel	T2Biosystems ^a	13 genů rezistence (G-, G+ bakterie)	78	99
Sekvenční metody nové generace					
PCR I6S/18S + sekvenace	Molzzym	SepsiTes TM	1 359 patogenů: 303 bakterií, 40 hub ^b	48	86
PCR I6S/18S + sekvenace	Molzzym	Micro-DX TM	200 bakterií, 65 hub ^c	89	85 ^d
PCR I6S/18S + sekvenace	CubeDx	Hybeell Pathogens DNA assay	56 bakterií, 19 hub, 9 genů rezistence ^e	63	83
Necílná NGS (shotgun)	PathoQuest, Illumina	iDTECT® Dx Blood test	> 1 200 patogenů (bakterie, viry)	NPV 98,4	–
Necílná NGS (shotgun)	Karius, Illumina	Karius NGS Plasma Test TM	> 1 000 patogenů (bakterie, DNA viry, paraziti, houby)	93	63 ^f

MR – magnetická rezonance, NGS – next generation sequencing, NPV – negativní prediktivní hodnota

^a Skeel et al. [12], ^b <https://www.molzzym.com/index.php> [13], ^c <https://www.molzzym.com/index.php> [14], ^d <https://www.molzzym.com/index.php> [15], ^e Knabl et al. [16],

^f <https://kariusdx.com/> [17]

Při detekci polymikrobiálních infekcí pomocí klasické multiplex PCR reakce dochází při významné kvantitativní převaze DNA jedné bakterie ke kompetitivní inhibici dalšího cíle. Při použití T2Bacteria Panel byl tento jev pozorován pouze při současné přítomnosti *E. coli* a *P. aeruginosa* s vysokou převahou první bakterie ve vzorku.

Interpretace výsledků vyšetření T2Bacteria Panel by měla být vedena zkušeným klinikem s ohledem na klinický stav nemocného a výsledky standardních diagnostických postupů.

Cena jednoho vyšetření pomocí T2Bacteria Panel je přibližně 5.000,- Kč bez DPH, tedy poměrně vysoká, a vyšetření zatím není hrazeno zdravotními pojišťovnami. Metoda neumožňuje detekovat všechny patogeny vyvolávající bakteriémie, nemůže tedy nahradit konvenční mikrobiologické metody a měla by sloužit jako doplňkové vyšetření. Bakterie ze skupiny ESKAPE jsou nejčastějšími etiologickými agens nozokomiálních bakteriemi a častými původci komunitních bakteriemi (*S. aureus*, *E. coli*), a proto autoři studií doporučují metodu jako vhodnou k použití na odděleních urgentního příjmu a jednotkách intenzivní péče. Časná identifikace patogenu umožňuje časně zahájení cílené antibiotické léčby nebo časnou deeskalaci úvodní širokospektré léčby.

Panely pro bakterie a kandidy neumožňují současnou detekci genů rezistence. Citlivost na antibiotika lze ověřit antibiogramem u vykultivovaného mikroba, proto je paralelně prováděná hemokultivace nezbytná. Druhou možností je zařazení panelu pro detekci rezistence, což dále významně zvýší cenu mikrobiologické diagnostiky.

Závěr

Diagnostické metody nezávislé na hemokultivaci mají potenciál zlepšit léčbu pacientů s infekcemi krevního řečiště, protože umožňují řádově rychlejší cílenou detekci patogenů v porovnání s konvenčními metodami, mají vyšší senzitivitu a specifitu a jejich výsledek je méně ovlivněn již probíhající antibiotickou léčbou. Lze předpokládat, že časněji zahájená cílená antiinfekční léčba povede k lepšímu léčebnému výsledku a perspektivně se odrazí ve zpomalení šíření antibiotické

rezistence. Skutečný přínos zavedení nových metod závisí na více faktorech, jako je následný způsob zpracování výsledku klinickým lékařem, propojení s programy antibiotického stewardshipu, stav antibiotické rezistence v daném zařízení a poměr cena-výkon, což bude nutné ověřit v dalších studiích. Podnětem pro další výzkum je také zatím neověřený přínos metody k diagnostice etiologie lokalizovaných infekcí a optimální načasování odběru krve na vyšetření.

Práce byla podpořena interním grantem Fakultní nemocnice Bulovka č. 22-IGS06-36.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FN Bul, 00064211).

Literatura

1. Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med* [online]. 2020 Feb [cited 2023 03 28]; 46(2):266–284. Available from: doi.org/10.1007/s00134-020-05950-6.
2. Scheer CS, Fuchs C, Gründling M, et al. Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: a prospective clinical cohort study. *Clin Microbiol Infect* [online]. 2019 March [cit. 2023 03 28]; 25(3), 326–331. Available from: doi:10.1016/j.cmi.2018.05.016.
3. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, et al. Blood culture results before and after antimicrobial administration in patients with severe manifestations of sepsis: a diagnostic study. *Ann Intern Med* [online]. 2019 Oct [cited 2023 03 28]; 171(8):547–554. Available from: doi:10.7326/M19-1696.
4. Faron ML, Buchan BW, Ledebner NA. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol* [online]. 2017 Dec [cited 2023 03 28]; 55(12):3328–3338. Available from: 10.1128/JCM.00868-17.
5. <https://www.bruker.com/en.html> [homepage on the Internet]. Billerica. Bruker Corporation; 2023 [cited 2023 05 09]. Available from: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/mbt-sepsityper-ivd-kit.html>.
6. Peri AM, Stewart A, Hume A, Irwin A, N A Harris P. New microbiological techniques for the diagnosis of bacterial infections and sepsis in ICU including point of care. *Curr Infect Dis Reports* [online]. 2021 Jun [cited 2023 03 28]; 23(8):12. Available from: 10.1007/s11908-021-00755-0.
7. <https://www.biomerieux-diagnostics.com> [homepage on the Internet]. Marcy-l'Étoile. bioMérieux; 2022 [cited 2023 05 09]. Available from: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/biofire-bcid2-panel>.
8. Spencer DH, Sellenriek P, D. Burnham CA. Validation and Implementation of the GeneXpert MRSA/SA Blood Culture Assay in a Pediatric Setting. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. Nov 2011 [cited 2023 04 06]; 136(5):690–694. Available from: <https://doi.org/10.1309/AJCP07UGYOKBVVNC>.
9. Ko YJ, Kim J, Kim HN, et al. Diagnostic performance of the Xpert Carba-R assay for active surveillance of rectal carbapenemase-producing organisms in intensive care unit patients. *Antimicrob Resist Infect Control* [online]. 2019 July [cited 2023 04 06]; 8(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0579-2>.
10. Siu GK, Chen JH, Ng TK, et al. Performance Evaluation of the Verigene Gram-Positive and Gram-Negative Blood Culture Test for Direct Identification of Bacteria and Their Resistance Determinants from Positive Blood Cultures in Hong Kong. *PLoS One* [online]. 2015 Oct [cited 2023 04 06]; 10(10):e0139728. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0139728.
11. Peri AM, NA Harris P, Paterson LD. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2022 [cited 2023 04 06]; 28(2):195–201. Available from: 10.1016/j.cmi.2021.09.039.
12. Skeel A, Clancy CJ, Lucas A, et al. Performance of the T2Resistance Panel in Detecting Antibiotic Resistant Bacteria Directly in Whole Blood, and Implications for Improving Appropriate Therapy of Bloodstream Infections. *Open Forum Infect Dis* [online]. 2021 Dec [cited 2023 04 06]; 8(Supplement_1), S429–S429. Available from: doi:10.1093/ofid/ofab466.851.
13. <https://www.molzvm.com/index.php> [homepage on the Internet]. Bremen. Molzym GmbH & Co. KG; 2023 [updated 2018 11 05; cited 2023 05 09]. Available from: <https://www.molzvm.com/molzvm-blog/categories/molecular-diagnostics/166-sepsitest-umd-unbiased-rdna-pcr-pathogen-diagnosis>.
14. <https://www.molzvm.com/index.php> [homepage on the Internet]. Molzym GmbH & Co. KG; 2023 [2023 05 09]. Available from: <https://www.molzvm.com/clinical-diagnostics/products/automated-pathogen-diagnosis>.
15. <https://www.molzvm.com/index.php> [homepage on the Internet]. Molzym GmbH & Co. KG; 2018 [2023 05 09]. Available from: https://www.molzvm.com/images/products/Flyer_App_Notes/AN_Micro_D_x_1_18.pdf
16. Knabl L, Mutschlechner W, Orth-Höller D. Evaluation of a multiplex OnSpot Primer-Extension PCR assay in the diagnosis of sepsis. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2016 Jan [cited 2023 04 06]; 120: 91–93. Available from: doi:10.1016/j.mimet.2015.12.001.
17. <https://kariusdx.com/> [homepage on the Internet]. Redwood City. Karius; 2023 [2023 05 09]. Available from: <https://kariusdx.com/karius-test/clinical-and-analytical-validation#clinical-validation>.
18. Özenci V, Patel R, Ullberg M, Strålin K. Demise of polymerase chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry as an infectious diseases diagnostic tool. *Clin Infect Dis* [online]. 2018 Jan [cited 2023 03 28]; 66(3):452–455. Available from: doi: 10.1093/cid/cix743.
19. Tkadlec J, Bebrova E, Berousek J, et al. Limited diagnostic possibilities for bloodstream infections with broad range methods: a promising PCR/electrospray ionization mass spectrometry platform is no longer available. *MicrobiologyOpen* [online]. 2020 May [cited 2023 03 28]; 9(5): e1007. Available from: doi: 10.1002/mbo3.1007.
20. <https://www.t2biosystems.com/> [homepage on the Internet]. Lexington. T2 Biosystems; 2022 [updated 2023 03; cited 2023 04 05]. Available from: <https://www.t2biosystems.com/products-technology/pipeline/t2resistance-panel/>.
21. <https://www.t2biosystems.com/> [homepage on the Internet]. Lexington. T2 Biosystems; 2022 [updated 2023 03; cited 2023 03 28]. Available from: <https://www.t2biosystems.com/products-technology/t2bacteria-panel/>.
22. <https://www.t2biosystems.com/> [homepage on the Internet]. Lexington. T2 Biosystems; 2022 [updated 2023 03; cited 2023 03 28]. Available from: <https://www.t2biosystems.com/products-technology/t2candida-panel/>.
23. De Angelis G, Posteraro B, De Carolis E, et al. T2Bacteria magnetic resonance assay for the rapid detection of ESKAPEc pathogens directly in whole blood. *J Antimicrob Chemother* [online]. 2018 Mar [cited 2023 03 28]; 73(suppl_4): iv20–iv26. Available from: doi: 10.1093/jac/dky049.
24. Nguyen MH, Clancy CJ, Pasculle AW, et al. Performance of the T2Bacteria panel for diagnosing bloodstream infections. *Ann Intern Med* [online]. 2019 Jun [cited 2023 03 28]; 170(12):845–852. Available from: doi: 10.7326/M18-2772.
25. Kalligeros M, Zacharioudakis IM, Tansarli GS, et al. In-depth analysis of T2Bacteria positive results in patients with concurrent negative blood culture: a case series. *BMC Infect Dis* [online]. 2020 May [cited 2023 03 28]; 20(1):326. Available from: doi: 10.1186/s12879-020-05049-9.
26. Drevinek P, Hurych J, Antuskova M, et al. Direct detection of ESKAPE pathogens from whole blood using the T2Bacteria Panel allows early antimicrobial stewardship intervention in patients with sepsis. *MicrobiologyOpen* [online]. 2021 Jun [cited 2023 03 28]; 10(3): e1210. Available from: doi: 10.1002/mbo3.1210.

Případ botulismu v ČR a současné možnosti detekce neurotoxinu *Clostridium botulinum*

J. DRESLER¹, K. MATUŠKOVÁ^{1,4}, Z. KALANINOVÁ², P. POMPACH³, M. VOLNÝ²,
P. NOVÁK², A. BURANTOVÁ⁴, M. HOLUB⁴

¹Vojenský zdravotní ústav, Praha; ²Mikrobiologický ústav, AV ČR;

³Biotechnologický ústav, AV ČR; ⁴Klinika infekčních nemocí, 1. LF UK a ÚVN, Praha

SOUHRN

Dresler J., Matušková K., Kalaninová Z., Pompach P., Volný M., Novák P., Burantová A., Holub M.: **Případ botulismu v ČR a současné možnosti detekce neurotoxinu *Clostridium botulinum***

Botulismus je v České republice raritní život ohrožující onemocnění. Od roku 1960 bylo hlášeno celkem 155 případů, přičemž od roku 2013, s výjimkou výskytu familiárního botulismu v roce 2013, se jednalo dle údajů ISIN (dříve EPIDAT) pouze o 3 izolované případy. V naší práci uvádíme výskyt botulismu po požití paštiky nedohledatelného původu u manželského páru, jenž byl hospitalizován v červenci 2022 pro otravu botulotoxinem. Z neurologických příznaků dominovala dysartrie, po aplikaci antitobulinního séra došlo k výraznému zlepšení klinického obrazu. Vzorky pacientů byly analyzovány pomocí afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie. Jedná se o moderní vysoce citlivou techniku k zjištění přítomnosti botulinových neurotoxinů. Na rozdíl od klasického průkazu obtížným a finančně nákladným biologickým pokusem na myších nedochází při výše uvedené analýze k usmrcování laboratorních zvířat.

Klíčová slova: botulinové neurotoxiny, alimentární botulismus, diplopie, dysartrie, antitobulinní sérum, MALDI, peptidový substrát

SUMMARY

Dresler J., Matušková K., Kalaninová Z., Pompach P., Volný M., Novák P., Burantová A., Holub M.: **A case of botulism in the Czech Republic and current possibilities for detecting the neurotoxin produced by *Clostridium botulinum***

In the Czech Republic, botulism is a rare life-threatening disease. A total of 155 cases have been reported since 1960; according to the ISIN (formerly EPIDAT) database, there have been only three isolated cases since 2013, with the exception of a single occurrence of familial botulism in 2013. In our work, we present the occurrence of botulism after ingestion of pâté of untraceable origin by a couple who were hospitalized for botulotoxin food poisoning in July 2022. Their neurological symptoms were dominated by dysarthria. After administration of antitobulinum serum, their condition improved significantly. Patient samples were analyzed using affinity carriers and MALDI mass spectrometry, a modern highly sensitive technique for detecting the presence of botulinum neurotoxins. Unlike traditional detection by a difficult and costly biological experiment on mice, the above analysis does not require the killing of laboratory animals.

Keywords: botulinum toxins, food botulism, diplopia, dysarthria, botulinum antitoxin, MALDI, peptide substrate

Klin mikrobiol inf lék 2023;29(1):26–28

Adresa: prof. MUDr. Michal Holub, Ph.D., Klinika infekčních nemocí, 1. LF UK a ÚVN Praha, U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6, e-mail: michal.holub@uvn.cz

Došlo do redakce: 11. 4. 2023

Schváleno k tisku: 24. 4. 2023

Úvod

Botulismus patří v České republice k velmi vzácně se vyskytujícímu onemocnění. Poslední výskyt familiárního botulismu byl zaznamenán v roce 2013, a dále byly zaznamenány izolované případy v letech 2014, 2015 a 2017. Otrava je způsobena neurotoxinem (nejčastěji typu A, B, E a vzá-

ně F) obligátně anaerobní, sporulující, grampozitivní bakterie *Clostridium botulinum*, vzácně i *Clostridium butyricum* a *Clostridium baratii* [2,3].

Klostridia jsou přítomna v půdě, kam se dostávají ze zažívacího traktu zvířat. Tepelná odolnost spor se zvyšuje v potravinach s vyšším pH a vyšším obsahem soli [4].

Za vhodných anaerobních podmínek se pak spory mění ve vegetativní formu a produkují toxin, který je termolabilní a je ničen při 85 °C za 15 minut [5]. Jedná se o nejjedovatější známý toxin s letální dávkou pro člověka 1 ng/kg tělesné hmotnosti [6]. Botulotoxin je proto považován za významnou hrozbu v rámci bioterorismu nebo potenciální biologickou zbraň [7].

Podle způsobu nákazy se tradičně rozlišuje několik typů botulismu – alimentární, vzniklý kontaminací rány, a kojenecký. Nejčastější alimentární botulismus je vyvolán požitím kontaminovaných potravin, především nedostatečně tepelně upravených. Nástup symptomů se obecně objevuje od 18 do 36 hodin po požití kontaminované potraviny. Počáteční příznaky se mohou projevovat zvracením, nevolností, křečemi v břiše nebo průjmem. Úvodní neurologické příznaky zahrnují xerostomii, mlhavé nebo dvojité vidění. Dalším typem je botulismus způsobený kontaminací rány. Klinické příznaky jsou podobné předchozímu typu, kromě změny gastrointestinální motility. Další formou je velmi vzácný kojenecký botulismus, který je způsoben vstřebáním toxinu produkovaného *C. botulinum* kolonizujícím střevní trakt dětí, a to až do věku jednoho roku. Kojenecký botulismus často souvisí s požitím medu. Mezi prvotními klinickými příznaky dominuje zácpa, dále můžeme pozorovat suchost sliznice, sníženou gastrointestinální motilitu, retenci moče a kolísání srdeční frekvence [3,4].

Nejnověji identifikovanou formou botulismu je iatrogenní botulismus. Intoxikace se může objevit u jedinců, kteří dostávají injekce botulotoxinu pro kosmetické účely (např. vrásky na obličeji) nebo z terapeutických důvodů (např. při léčbě svalové spasticity), ale také v souvislosti s intragastrickou aplikací injekcí botulotoxinu [8]. Rešerše dostupné literatury z roku 2017 však uvádí, že v současné době neexistuje přesvědčivý průkaz trvalého úbytku hmotnosti po použití endoskopické injekce botulotoxinu [9].

Botulismus je při včasné diagnóze reverzibilní, ale může i zanechávat následky či končit smrtí [2]. Diagnóza je založena na epidemiologické anamnéze a charakteristických klinických příznacích. Průkaz toxinu se standardně provádí obtížným a finančně nákladným biologickým pokusem na myších [10]. Alternativní přístup detekce využívá produktů štěpených botulotoxinem pomocí **afinitních nosičů a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) hmotnostní spektrometrie** [11]. Tato technika přímé detekce využívá vysoce specifické proteázové aktivity botulotoxinů s cílenými peptidy specifickými pro každý toxin sérotypu [11]. Peptidy odvozené z endopeptidázové aktivity BoNT jsou následně detekovány pomocí MALDI-TOF-MS. V pufru tato metoda dosahuje citlivosti až 0,01 LD₅₀ pro myš (střední letální dávka). Přesnější typ toxinu lze následně určit pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) nebo nověji PCR v reálném čase (RT PCR), případně při přítomnosti dostatečného množství toxinu i přímým průkazem vlastních peptidů toxinu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

Kazuistika

60letý pacient A a jeho 59letá manželka, pacientka B, byli přivezeni rychlou záchrannou službou na Emergency ÚVN

Praha 24. 7. 2022 ve 12.20 hod. Oba manželé 17. 7. společně konzumovali paštiku. 20. 7. začaly lehké obtíže ve smyslu únavy. Únava, malátnost, slabost ale progredovaly, postupně se přidaly i dysartrie a kolébová chůze. U pacienta A byla dysartrie o něco horší. Nemocní sami upozornili na obavy z botulismu a své příznaky spojili se zkaženou paštikou (mohlo to souviset s faktem, že pacientka B je zdravotník – fyzioterapeutka). Při příjmu laboratorně bez výraznější patologie. Klinicky se nově objevily mírné problémy s polykáním. Bez prodlení bylo indikováno podání séra antitoxinů.

Pacientka B byla chronicky léčena pro arteriální hypertenzi, pacient A neměl žádné komorbidity. Ani jeden z nich neměl v anamnéze alergii, což je důležitá informace ve vztahu k podání nehumánních sér. Z Toxikologického informačního střediska bylo následně získáno 20 lahviček séra Antytoksyna botulinowa (výrobce Wytwornia Surowic i Szczepionek BIOMED, spol s r. o., Varšava, Polská republika). Pacientům byly podány dvě 3hodinové infuze (ředěno do 250 ml fyziologického roztoku a infuze séra musela být zahřáta na 36 °C). Během podání séra byly monitorovány životní funkce obou pacientů.

Klinický stav byl stabilní a již nedocházelo k dalšímu zhoršování. Po několikadenní observaci byli oba pacienti propuštěni do domácího prostředí. Ze vstupních odběrů jsme zajistili i vzorek pro zpětné potvrzení diagnózy botulismu, tj. před aplikací antitoxinu.

Diagnostika a léčba

Z důvodu jasného klinického obrazu a rizika prodlení při čekání na výsledky analýzy (k hospitalizaci došlo v sobotu a příslušní laboratorní pracovníci nebyli přítomni) bylo indikováno podání séra antitoxinů před provedením vlastní analýzy. Pacientům bylo odebráno sérum před podáním antitoxinu a plazma po podání antibotulinního séra a uloženo na –80 °C.

Analýza toxinu provedením biologického průkazu na myších v Národní referenční laboratoři pro anaerobní nákazy v Ostravě byla tímto pracovištěm odmítnuta z důvodu prodlevy uskladněním vzorku (průkaz toxinu je možno provádět pouze v čerstvém vzorku). Dále bylo zjištěno, že alternující pracoviště ve Státním veterinárním ústavu v Praze 6-Lysolajích se tímto typem analýz již nezabývá. Výše uvedené vzorky pak byly analyzovány pomocí afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie. Tato technika je dlouhodobě vyvíjena a implementována ve spolupráci Biotechnologického ústavu, Mikrobiologického ústavu AV ČR a Vojenského zdravotního ústavu. V současnosti je k dispozici analýza pro detekci typů A a B. Tyto analýzy jednoznačně neprokázaly přítomnost výše uvedených toxinů ve vzorcích. Alikvotní podíl těchto vzorků pak byl zaslán do německé národní referenční laboratoře (Institut Roberta Kocha, Berlín), kde rovněž nebyla zjištěna přítomnost botulinového neurotoxinu A, B, E a F, a to jak výše uvedenou technikou, tak i pomocí enzymoimunoeseje.

Diskuze

Diagnostika botulismu je samozřejmě vzhledem k nutnosti neodkladného podání antiséra v první řadě klinická.

U tohoto konkrétního případu v rozhodování pomohl již jen fakt, že se stejnými příznaky přijeli dva členové společné domácnosti, tedy podezření na otravu bylo zjevné. Dále pomohla dobrá informovanost pacientů, včetně důležité informace o zkažené paštice, která nás navedla již cíleně. Klinická odpověď na podání séra (zástava progresu neurologického postižení) diagnózu prakticky potvrdila. Poslední rodinný výskyt botulismu byl zaznamenán v roce 2013, kdy šlo o tři členy jedné rodiny, kteří požíli kontaminovanou vepřovou paštiku. Pacienti dostali antitoxinové sérum a uzdravili se [1]. Nicméně vzhledem ke špatné dostupnosti séra uvedený rodinný výskyt vedl k navýšení pohotovostní zásoby antitoxinového séra v Toxikologickém informačním středisku v Praze.

V případě nejasné anamnézy, rapidní progresu neurologického deficitu, postižení u pouze jednoho pacienta, či naopak více nemocných bez jasné anamnézy požití stejné potraviny, podezření z bioterorismu, je však diferenciální diagnostika mnohem širší a získání zpětného laboratorního potvrzení je proto nezbytné, a to v krátkém časovém úseku.

Negativní výsledek analýzy v krevních vzorcích mohl být způsoben tím, že pacienti byli hospitalizováni po 7 dnech od ingesce pravděpodobného zdroje otravy. Empiricky jsou botulotoxiny v krvi prokazatelné maximálně do 72 hodin, kde jsou rychle degradovány přítomnými proteázami. Pro potvrzení nákazy jsou esenciální vzorky stolice, které by mohly sloužit k izolaci a kultivaci pravděpodobně přítomného toxigenního kmene, případně je využitelný nepřímý průkaz genu pro toxin (touto technikou Vojenský zdravotní ústav rovněž disponuje). Technika PCR pomůže v průkazu i v případech, kdy již došlo k degradaci toxinu v organismu, a přímý průkaz na základě jeho účinku dává negativní výsledek. Mezi další možné vzorky patří žaludeční aspirát a podezřelý vzorek jídla, který se rovněž v tomto případě nepodařilo zajistit.

Odběr stolice však z důvodu raritnosti botulismu, a s tím souvisejícími nedostatečnými zkušenostmi s touto otravou, nebyl realizován. Takového vzorky dle praxe německé referenční laboratoře vykazují pozitivitu i přes negativní výsledky v séru. Lze je skladovat i při teplotě 4 °C (zmrazování není doporučeno) do následného transportu.

Detekce produktů proteázové aktivity botulotoxinu pomocí afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie je v odborné komunitě dlouhodobě etablovanou a preferovanou alternativou k experimentu na zvířeti. V případě metody pokusu na myších může pro vyšetření jednoho pacienta dojít k usmrcení až 10 laboratorních myší (určuje se též typ toxinu a orientačně i jeho koncentrace). V různých variacích tohoto vyšetření může být pokus i velmi stresový pro labo-

ratorní zvíře, a je tedy nutné velmi dobře zvažovat nutnost využití této metody. Nemałym úskalím tohoto přístupu je také nutnost proškoleného a zkušeného laboratorního personálu pro pozorování specifické symptomatologie otravy před úhynem [10,11].

Je potřeba zdůraznit, že pokus na sajcích myších je poslední laboratorní diagnostikou prováděnou na živých savcích. V obecné rovině se proto domníváme, že je-li možnost použít jiná vyšetření k potvrzení diagnózy než pokus *in vivo*, měla by být v každém případě preferována.

Poděkování

Laboratorní analýza pomocí afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie byla realizována za podpory Dlouhodobého záměru rozvoje organizace Ministerstva obrany č. 907930101413 a projektu MO1012.

Autoři děkují Dr. Martinu Dornerovi, Dr. Martinu Skibovi a Dr. Silvie Worbs z německé národní referenční laboratoře pro botulinové nákazy z Institutu Roberta Kocha v Berlíně za provedení analýz dodaných vzorků.

Literatura

1. Ambrožová H, Džupová O, Smíšková D, et al. Familiární výskyt botulismu – kazuistika. *Klin. Mikrobiol. Infekční Lek.* 2014;20(2):40–42.
2. Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism, 2021. *MMWR Recomm Rep.* 2021;70(2):1–30.
3. Ambrožová H. Botulismus – vzácné, ale stále se vyskytující život ohrožující onemocnění. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2019;68(1):33–38.
4. World Health Organization. *Clostridium botulinum*. International Programme on Chemical Safety – Poisons Information Monograph 858. Available from: <https://pdf4pro.com/view/clostridium-botulinum-who-14fe1a.html>
5. Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis.* 2005;41(8):1167–1173.
6. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):80–99.
7. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, et al. Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 2001;285(8):1059–1070.
8. European Centre for Diseases Control and Prevention. Botulism cases in Europe following medical interventions with botulinum neurotoxin. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/botulism-cases-europe-following-medical-interventions-botulinum-neurotoxin>
9. Elshakh H, El-Ejji K, Taheri S. The Role of Endoscopic Intra-Gastric Botulinum Toxin-A for Obesity Treatment. *Obes Surg.* 2017;27(9):2471–2478.
10. Wilder-Kofie TD, Lúquez C, Adler M, et al. An alternative in vivo method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Comp Med.* 2011;61(3):235–242.
11. Barr JR, Moura H, Boyer AE, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1578–1583.

Vzpomínka na bývalého primáře infekčního oddělení docenta Poljaka

Dne 20. května 2023 zemřel ve věku 96 let nestor ostravské a československé infektologie doc. MUDr. Vladko Poljak, CSc. Docent Poljak pracoval na infekčním oddělení v Ostravě-Porubě od 70. let minulého století, dlouhodobě byl primářem oddělení a současně krajským odborníkem pro obor infekčních chorob. Docenturu získal v roce 1988, kdy obhájil disertační práci o klíšťové encefalitidě. I po odchodu do starobního důchodu v 90. letech se nadále aktivně zajímal o dění na klinice, pravidelně se zúčastňoval klinických seminářů, na kterých nás udivoval svými rozsáhlými teoretickými znalostmi i cennými postřehy z klinické praxe, a to nejen z oboru infekčního lékařství.

Docent Poljak dlouhodobě vyučoval infekční lékařství na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, byl autorem několika učeb-

ních textů, z nichž nejcennější je kniha „Manuál infekčních nemocí“ z roku 2000, která se stala srozumitelnou učebnicí

mediků nejen olomoucké univerzity. Byl aktivní v přednáškové i publikační činnosti během svého zaměstnání, ale i po odchodu do důchodu. Obdivuhodná byla jeho rozsáhlá jazyková vybavenost. Dokonalou znalost angličtiny a němčiny využíval při překladech odborných textů.

Docent Poljak byl společenský, přátelský a ochotný poradit i mladším kolegům na klinice. V osobním životě se zajímal o českou literaturu, o sport, byl fanouškem Baníku Ostrava, věnoval se turistice a byl velmi dobrý tanečník.

Věnujte prosím docentu Poljakovi, spolu s kolegy Kliniky infekčního lékařství Fakultní nemocnice v Ostravě, tichou vzpomínku.

Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.



Obsah 28. ročníku

M. Kolář: Úvodník	3
T. Koníčková, F. Puškáš, E. Novotná, A. Chrdle: Pneumotorax, pneumomediastinum a podkožní emfyzém jako komplikace onemocnění covid-19	4
P. Jakubec, S. Genzor: Plicní komplikace po covid-19 infekci	10
O. Zahornacký, Š. Porubčín, A. Rovňáková, P. Jarčuška: Imipeném-relebaktám-cilastatin a jeho využití v léčbě ventilátorové pneumonie vznikající v teréne infekcie SARS-CoV-2	18
A. Milotová, A. Žákovská: Monitoring aktivity a pozitivitu klíšťat <i>Ixodes ricinus</i> v lokalitě brněnské aglomerace lesoparku Brno-Pisárky; vymezení kritické doby výskytu a infekčnosti klíšťat	22
P. Myšková, P. Kubáčková, P. Janků: <i>Trichomonas vaginalis</i> – viník nebo spoluviník?	25
I. Kocmanová, N. Mallátová: Způsobuje infuzní roztok Plasmalyte stále falešnou pozitivitu testu Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag?	27
Obsah 27. ročníku	28
Rejstřík 27. ročníku	29
J. Bardoň: Úvodník	35
K. Fišerová, L. Doubravská, M. Htoutou Sedláková, M. Kolář: Dopad pandemie covid-19 na antimikrobiální rezistenci	36
A. Papoušková: Drůbež jako rezervoár zoonotických kmenů <i>Escherichia coli</i>	42
P. Ježek, L. Mališová, R. Šafránková: Kazuistika fatální sepsy způsobené <i>Actinobacillus suis/A. equuli</i> u dospělého muže	45
M. Kolář: Digitalizace v klinické mikrobiologii	48
G. Kroneislová, J. Závora, V. Adámková: Může zavedení definice rezistence typu difficult-to-treat prohloubit spolupráci mezi mikrobiology a klinickými lékaři?	52
J. Rychlíčková, V. Kubíčková: Farmakologické vlastnosti kolistinu	59
L. Rožnovský: Úvodník	67
J. Sagan, M. Hýža, T. Skřont, P. Širůček: Neuroleptický maligní syndrom – neočekávaná komplikace u pacienta s covid-19	69
J. Kučerová, A. Jesenková, M. Fajfr: Vliv střevní mikrobioty na vznik kolorektálního karcinomu a anastomotických leaků ze střevních anastomóz	73
J. Beneš, R. Stebel, V. Musil, M. Krůtová, J. Vejmelka, P. Kohout: Aktualizovaný doporučený postup pro léčbu nemocných s kolitidou vyvolanou <i>Clostridioides difficile</i>	77
A. Plíšek: Úvodník	99
O. Džupová, J. Beneš: Postavení chloramfenikolu v dnešní klinické praxi	101
M. Bezdíček, K. Dufková, M. Nykrýnová, J. Hansliková, M. Lengerová: Metody sekvenování druhé a třetí generace a jejich praktické využití pro typizaci bakterií	106
J. Mizera, P. Jakubec, M. Sova, M. Vykopal, P. Pobeha, S. Genzor: Respirační projevy post-covid syndromu	116

Rejstřík 28. ročníku

- abusus 1/25
Acinetobacter baumannii 2/52
Actinobacillus suis/A. equuli 2/45
aktivita klíšťat 1/22
alkoholismus 2/45
anastomotický leak 3/73
antibiotická politika 4/101
antimikrobiální rezistence 2/36, 2/52
antimikrobiální stewardship 2/52
antipsychotika 3/69
aplastická anemie 4/101
Aspergillus Ag 1/27
bakterie 2/36
Borrelia burgdorferi sensu lato 1/22
bromokriptin 3/69
celogenomové sekvenování 4/106
cilastin 1/18
citlivost k antibiotikům 2/45
Clostridioides difficile 3/77
ColV plazmidy 2/42
covid-19 1/4, 1/18, 2/36, 3/69
covid-19 infekce 1/10
covid-19 pneumonie 1/4
dehiscence anastomóz 3/73
difficult-to-treat 2/52
digitalizace 2/48
doporučený postup 3/77
drůbež 2/42
E. coli patogenní pro ptáky 2/42
Enterobacter cloacae complex 2/52
Escherichia coli 2/42, 2/52
extraintestinální patogenní *E. coli* 2/42
falešná pozitivita testu PlateliaTM 1/27
farmakodynamika 2/59
farmakokinetika 2/59
fatální sepse 2/45
fekální bakterioterapie 3/77
fidaxomicin 3/77
hemokultura 2/52
hypertenze 1/25
chloramfenikol 4/101
imipenem 1/18
infekce 1/10
infuzní roztok Plasmalyte 1/27
Ixodes ricinus 1/22
Klebsiella pneumoniae 2/52
klíště obecné 1/22
klostridiová kolitida 3/77
kolistin 2/59
kolorektální karcinom 3/73
kreatinkináza 3/69
léčba post-covid syndromu 4/116
long covid 1/10
metody sekvenování 4/106
metronidazol 3/77
mikrobiologie 2/48, 2/52
molekulární typizace 4/106
myoglobin 3/69
nefrotoxin 2/59
neinvazivní ventilace 1/4
nemocniční epidemiologie 4/106
neuroleptický maligní syndrom 3/69
nežádoucí účinky 2/59
patogeny 1/22
plicní postižení 4/116
pneumomediastinum 1/4
pneumotorax 1/4
podkožní emfyzém 1/4
post-covid syndrom 4/116
postcovidové komplikace 1/10
postižení respiračního systému 1/10
pozitivita klíšťat 1/22
předčasné porušení plodových obalů 1/25
Pseudomonas aeruginosa 2/52
relabaktam 1/18
rizikové linie 2/42
střevní anastomóza 3/73
střevní mikrobiota 3/73
TDM 2/59
terapie 3/73
Trichomonas vaginalis 1/25
vankomycin 3/77
ventilátorová pneumonie 1/18
zoonotické kmeny 2/42
zoonóza 2/42