

# SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

ISSN 1338-645X

EV 2992/09

Ročník XV.

Číslo 3-4/2015

*Časopis*

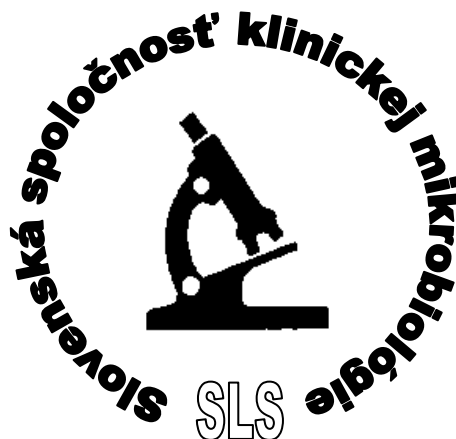
*Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie*

*Slovenskej lekárskej spoločnosti*

*a*

*Sekcie klinickej mikrobiológie*

*Slovenskej lekárskej komory*



## Obsah

### Virulencia a rezistencia termofilných kamylobakterov

Choková J., Hanzen J., Kmeť V..... 2

### Výskyt *Listeria monocytogens* u pacientov Fakultnej nemocnice Nitra, v rokoch 2011 – 2013

Zimmermann, M. .... 15

### Diagnostické postupy a terapia hepatitídy C

Loduhová, I., Liptáková A., Kristian, P..... 26

Zápisnica zo zasadnutia Výboru SSKM SLS zo dňa 25. novembra 2015 ..... 34

## Virulencia a rezistencia termofilných kampylobakterov

Choková J. <sup>1</sup>, Hanzen J. <sup>2</sup>, Kmet' V. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> HPL spol. s r.o., Košice, Oddelenie bakteriológie

<sup>2</sup> HPL spol. s r.o., Bratislava

<sup>3</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV Košice

### Abstrakt

Kampylobakteriôza je od roku 2009 najčastejšie hlásené hnačkové ochorenie v rámci EÚ a od roku 2011 aj na Slovensku. Pôvodcami ľudských gastroenteritíd sú v prevažnej väčšine prípadov termofilné druhy *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* (*Campylobacter* ďalej ako *C.*) Cieľom práce bolo zaznamenať u izolovaných kmeňov kampylobakterov výskyt rezistencie voči tetracyklínu, erytromycínu, ciprofloxacínu a ampicilínu so sulbaktámom a u vybraných rezistentných izolovaných kmeňov *C. jejuni* a *C. coli* zistiť gény pre rezistenciu *tet(O)*, *bla<sub>OXA-61</sub>*, *cmeB* a gén pre virulenciu - *cdtB*. Z celkového počtu 828 izolovaných kmeňov *Campylobacter* spp. sme zaznamenali najvyšší výskyt rezistencie voči ciprofloxacínu – 67,6 %. Rezistencia voči tetracyklínu sa vyskytla u 32,4 % a voči ampicilínu so sulbaktámom u 26,4 % izolovaných kmeňov. Kmene rezistentné voči erytromycínu v našom súbore tvorili menej ako 1 %. Prítomnosť génu *cdtB* zodpovedného za tvorbu toxínu sme stanovili u šiestich z 20-tich multirezistentných kmeňov. MALDI - TOF analýza (hmotnostná spektrometria) bielkovinových spektier ukázala zaujímavú podobnosť kmeňov z rôznych lokalít.

**Kľúčové slová:** *Campylobacter*, rezistencia, gastroenteritída, *tet(O)*, *bla<sub>OXA-61</sub>*, *cmeB*, *cdtB*

### Abstract

Since 2009, campylobacteriosis has been the most commonly reported diarrheal disease in the EU and since 2011 also in Slovakia. The causative agents of human gastroenteritis are in most cases thermophilic species of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. The aim of our study was to record the occurrence of resistance of isolated *Campylobacter* strains to tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin, ampicillin with sulbactam and search for the genes of resistance - *tet(O)*, *bla<sub>OXA-61</sub>*, *cmeB* and gene for virulence – *cdtB* in resistant isolates *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. From 828 isolates of *Campylobacter* spp., we recorded the highest prevalence of resistance to ciprofloxacin - 67.6 %. Resistance to tetracycline was occurred in 32.4 %, and resistance to ampicillin with sulbactam in 26.4 % of the isolates. Strains resistant to erythromycin in our group occurred in less than 1 %. Presence of the gene *cdtB* responsible for the production of toxin we determined in 6 of 20 multi-resistant strains. MALDI-TOF analysis (mass spectrometry) of protein spectra showed interesting similarity of strains from different locations.

**Key words:** *Campylobacter*, resistance, gastroenteritis, PCR, *tet(O)*, *bla<sub>OXA-61</sub>*, *cmeB*, *cdtB*

### Úvod

Rod *Campylobacter* zahŕňa gramnegatívne, mikroaerofilné až anaeróbne, štíhle, zahnuté, prípadne špirálovité, pohyblivé baktérie (s výnimkou druhu *Campylobacter gracilis*) (4). Morfológicky sú podobné rodu *Vibrio*, preto boli až do roku 1963 zaradované do tohto rodu (10). Bežne sa vyskytujú v gastrointestinálnom trakte cicavcov a vtákov. V súčasnosti rod obsahuje 32 druhov a 13 poddruhov (11), z nich viaceré sú spájané s ľudskými ochoreniami, ale len 4 druhy sú považované za patogénne pre ľudí – *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* a *C. upsaliensis*.

V prírode sú kampylobaktérie veľmi rozšírené, ich rezervoárom je tráviaci trakt domácich i voľne žijúcich zvierat. Zástupcovia rodu *Campylobacter* boli opakovane izolovaní z rôznych druhov surovín a potravín, najčastejšie z hydiny a surového hydinového mäsa, menej často z bravčového mäsa, surového mlieka, nedostatočne tepelne spracovaných alebo sekundárne kontaminovaných výrobkov z mäsa a neupravenej pitnej vody. Človek sa najčastejšie infikuje konzumáciou primárne alebo sekundárne kontaminovaných potravín. Pri druhu *C. upsaliensis* je možná infekcia aj priamym kontaktom človeka s infikovaným psom, ktorý je jeho prirodzeným hostiteľom. Interhumánny prenos je pomerne vzácny. Vyskytuje sa najmä pri nedodržaní osobnej hygieny (8).

Kampylobakteriózy sú alimentárne infekcie, ktoré sa môžu prejavovať ako gastroenteritída alebo postinfekčné manifestácie a vo vzácných prípadoch aj ako systémové infekcie a sepsy. Systémové infekcie sa vyskytujú najmä u imunokompromitovaných pacientov a pôvodcom je najčastejšie druh *C. fetus*. K postinfekčným prejavom patrí reaktívna artritída, urtikária, erythema nodosum, potrat a klinicky najvýznamnejšie Guillain-Barrého a Miller-Fischerov syndróm. Sú to akútne demyelinizačné ochorenia ovplyvňujúce periférny alebo centrálny nervový systém (5, 15). Najčastejším prejavom kampylobakterovej infekcie u ľudí je gastroenteritída. Viac ako 90 % ľudských kampylobakterových gastroenteritíd spôsobuje druh *C. jejuni*. Infekčná dávka je približne 500 baktérií, inkubačná doba je 1 až 7 dní (18). Po požití môžu kampylobaktérie kolonizovať dolnú časť tráviacej sústavy bez klinických príznakov. Objavenie sa príznakov závisí od imunitného stavu konkrétneho jedinca a faktorov virulencie konkrétneho kmeňa. Medzi hlavné klinické prejavy patrí hnačka, ktorá môže mať podobu ľahšej vodnatej hnačky, ale aj typickej hemoragickej kolitídy s horúčkami, bolesťami brucha s prímiesou krvi v stolici, ojedinele až masívnejšieho krvácania do lúmen čreva. U malých detí je hnačka s prímiesou krvi často jediným príznakom infekcie. Počiatočné príznaky, ešte pred nástupom hnačky, sú kŕčovitá bolesť brucha (môže imitovať apendicitídu), bolesť hlavy, asténia a horúčka (4, 5, 10).

Rod *Campylobacter* sa vyznačuje viacerými skupinami faktorov virulencie – motilitou, chemotaxiou, adhezivitou, invazivitou, produkciou toxínov (Tab 1).

Základom liečby pacientov s nekomplikovanou enteritídou spôsobenou *Campylobacter* spp. zostáva rehydratácia a úprava elektrolytov. U starších detí s dostatočným príjmom tekutín perorálne, u mladších detí intravenóznym podávaním náhradných roztokov. Antibakteriálna terapia je indikovaná u pacientov s krvavou stolicou, horúčkou, zhoršovaním alebo pretrvávaním klinických príznakov dlhšie ako týždeň. Vzhľadom na možný potrat v dôsledku kampylobakterovej infekcie sa odporúča antibakteriálna terapia aj u tehotných žien. Antibakteriálna terapia by sa mala zahájiť čo najskôr od prvých príznakov ochorenia. Podané antibakteriálne látky zmierňujú klinické príznaky a významne redukujú vylučovanie baktérií, neovplyvňujú však dĺžku ochorenia. Vylučovanie baktérií môže perzistovať od 2 týždňov do 3 mesiacov u imunokompetentných pacientov bez antibakteriálnej liečby (14).

**Tab 1:** Prehľad faktorov virulencie rodu *Campylobacter* spp., kódujúcich génov a ich účinku (6).

Faktor virulencie	Gény	Účinok
motilita chemotaxia	<i>flaA, flaB</i> <i>cheY</i> <i>cheA, cheB, cheR</i>	bičičky, prekonávanie mukóznej vrstvy
adhezivita invazivita	<i>cadF, peb1A,</i> <i>peb3, peb4, jlpA</i> <i>ciaB, ciaC</i>	naviazanie a prienik do epitelovej bunky
produkcia toxínov	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>	cytopatický a enterotoxický efekt
získavanie železa	<i>cfrA, cfrB, ceuE,</i> <i>cj0178, fur, chuA</i>	nutrične dôležitá látka pre rast
povrchové polysacharidové štruktúry	<i>neuB1, neuB2,</i> <i>neuB3</i>	mimikry v gangliách vedúce ku Guillain-Barrého syndrómu
oxidačný stres-obranný systém	<i>sodB</i>	obrana pred vyšším obsahom kyslíka v prostredí
obrana pred teplotným šokom	<i>RacR, RacS, dnaJ</i>	schopnosť prežiť v širokom rozmedzí teplôt

Liekom voľby v liečbe kampylobakterovej enteritídy sú makrolidy počas 5 až 7 dní, prípadne tetracyklín. Alternatívnym liečivom je ampicilín so sulbaktámom, najmä u detí a tehotných žien. Často indikovaným empirickým liečivom v liečbe bakteriálnej gastroenteritídy dospelých sú fluorochinolóny, pretože sú účinné na väčšinu najvýznamnejších bakteriálnych pôvodcov. Ďalšou výhodou fluorochinolónov je cídnosť, dobrý prienik do tkanív a neúčinnosť na anaeróbne baktérie, ktoré tvoria prevažnú časť mikroorganizmov flóry čreva. Problémom je fluorochinolónová rezistencia, ktorá súvisí s ich častým podávaním v humánnej aj veterinárnej medicíne (15). Rezistencia voči makrolidom sa na Slovensku vyskytuje zatiaľ skôr ojedinele.

Najjednoduchším opatrením pred kampylobakterovou infekciou zostáva prevencia vo forme osobnej hygieny, hygieny potravín a vody.

## Pôvodné práce

**Tab 2:** Prehľad mechanizmov rezistencie u *Campylobacter* spp. na používané skupiny antibakteriálnych látok (6, 14, 18)

Skupina antimikrobiálnych látok	Mechanizmus rezistencie
Aminoglykozidy	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ modifikácia antibiotickej látky prostredníctvom enzýmov (AphA, AadE, Sat)</li><li>▪ podiel efluxu nie je dostatočne objasnený</li></ul>
Betalaktámy	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ enzýmová inaktivácia pomocou betalaktamázy (penicilináza, <i>bla</i><sub>OXA-61</sub>)</li><li>▪ zníženie permeability membrány pomocou MOMP (major outer membrane protein)</li><li>▪ možný eflux cez CmeABC</li></ul>
Fluorochinolóny	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mutácia na chromozóme v DNA-gyráze (Thr-86-Ile, Asp-90-Asn, Ala-70-Thr)</li><li>▪ eflux cez CmeABC</li></ul>
Makrolidy	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mutácia na 23SrRNA</li><li>▪ mutácia na ribozómovom proteíne L4/L22</li><li>▪ možný eflux cez CmeABC</li><li>▪ zníženie permeability membrány cez MOMP</li></ul>
Tetracyklíny	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ modifikácia cieľového ribozómového miesta A naviazaním TetO</li><li>▪ možný eflux cez CmeABC</li><li>▪ zníženie permeability membrány cez MOMP nie je úplne objasnené</li></ul>

## Cieľ práce

Cieľom práce bolo zaznamenať u izolovaných kmeňov *C. jejuni* a *C. coli* výskyt rezistencie proti tetracyklínu, ciprofloxacínu, erytromycínu a ampicilínu so sulbaktámom. U vybraných rezistentných kmeňov *C. jejuni* a *C. coli* zistiť pomocou PCR gény pre rezistenciu (*tet(O)*, *bla*<sub>OXA-61</sub>, *cmeB*) a produkciu toxínu (*cdtB*).

## Materiál a metódy

Do práce sme zaradili kmene *Campylobacter* spp. izolované z výterov z rekta s diagnózami A02 – A05, A09, K29, K30, K35 – K38, K52 a R10 analyzovaných na piatich prevádzkach HPL spol. s r.o. (Košice, Prešov, Komárno, Galanta a Bratislava - Petržalka) v období od januára do apríla roku 2015. Výtery z rekta boli do laboratória dodané na sterilnom detoxikovanom vatovom tampóne v transportnom médiu AMIES s aktívnym uhlím. Na kultiváciu vzoriek sme použili selektívny agar pre kampylobaktery – CB agar (modifikácia Preston agaru, HPL SERVIS spol. s r.o., Bratislava). Selektívne médium sme kultivovali 48 hodín pri teplote 42°C v mikroaerofilných podmienkach (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>).

Rodovú identifikáciu sme uskutočnili pomocou mikroskopického preparátu s farbením podľa Grama, detekčného prúžku na stanovenie cytochromoxidázy a acetátsterázovej aktivity od firmy Diagnostics, s.r.o., Galanta a rezistencii voči cefalotínu (30 µg) diskovou difúznou metódou na agare podľa Muellera a Hintonovej so 7 % baranej krvi (HPL SERVIS spol. s r.o., Bratislava) (16).

## Pôvodné práce

---

U izolovaných kmeňov kampylobakterov sme diskovou difúznou metódou stanovili citlivosť na nasledujúce antibakteriálne látky: erytromycín (ERY) 15 µg, ampicilín a sulbaktám (SAM) 10+10 µg, ciprofloxacín (CIP) 5 µg, cefalotín (CEF) 30 µg, tetracyklín (TET) 30 µg. Rezistencia voči cefalotínu predstavuje diagnostický znak a vo výsledkoch citlivosti nie je uvádzaná (16). Komerčne dodávané disky boli dodané od firmy BIO-RAD spol. s r.o., Praha, ČR. Disková difúzna metóda bola stanovená na agare podľa Muellera a Hintonovej so 7 % baranej krvi (HPL SERVIS spol. s r.o., Bratislava). Výsledky testov citlivosti sme interpretovali podľa kritérií EUCAST, verzia 5.0, platná od 1.1.2015. V prípade ampicilínu so sulbaktámom sme použili hodnoty pre amoxicilín s kyselinou klavulánovou (t.j. pre rezistenciu menej ako 14 mm) ako je uvedené v CASFM EUCAST 2014.

Z celkového súboru kmeňov sme vybrali 20 izolovaných kmeňov rezistentných voči TET (tetracyklínu), SAM (ampicilínu so sulbaktámom) a CIP (ciprofloxacínu) pre PCR a MALDI-TOF experimenty.

Rod *Campylobacter* sme určili pomocou 16 S rRNA primerov PCR (7), druh a biodiverzitu kmeňov MALDI-TOF biotyperom (Bruker) porovnaním ich bielkovinových spektier, podľa návodu výrobcu prístroja. Gény rezistencie *bla<sub>OXA-61</sub>* (13), *cmeB* (14), a *tet(O)* (12) a génu *cdtB* (2), zodpovedné za produkciu toxínu boli zisťované pomocou PCR.

Izolácia DNA bola uskutočnená pomocou DNazolu (Invitrogen), ktorý obsahuje guanidín s detergentom ako lytickú látku. K bunkovej suspenzii v TE pufri (20 mM Tris, 10mM EDTA, pH 8,0) sa pridal 1 ml DNazolu. Po 30 minútovej inkubácii pri 60°C sa výsledný bakteriálny lyzát zrážal 96 % etanolom a DNA sa rozpustila v 8mM NaOH.

Polymerázová reťazová reakcia bola vykonaná podľa nasledovného amplifikačného protokolu: počiatočná denaturácia pri 94°C po dobu 5 minút, 30 cyklov denaturácie pri 94°C po 60 sekúnd, hybridizácia po dobu 60 sekúnd pri teplote 55°C (*tet(O)*), 50,8°C (*cmeB*) a 54°C (*bla<sub>OXA-61</sub>*) a extenzia pri 72°C po dobu 1 minúty. Bola použitá hot-start CheeTah Taq polymeráza (Biotium). Zloženie primerov a veľkosť PCR produktov je uvedené v Tab 3. Veľkosť PCR produktov bola analyzovaná v agarózovom géli, ofarbenom nekarzinogénnym farbivom GoodView (SBS Genetech), za použitia 100bp štandardu molekulových hmotností (Jena Bioscience).

## Výsledky

V období od januára do apríla roku 2015 nám z vyššie uvedených laboratórií HPL spol. s r.o. dodali 828 kmeňov *Campylobacter* spp. (Tab. 4, graf 1). Izolované kampylobaktery predstavovali 4,8 % z celkového počtu výterov z rekta (n=16974) s diagnózami A02 – A05, A09, K29, K30, K35 – K38, K52 a R10. Opakované izolácie od jedného pacienta boli vylúčené.

Z celkového počtu 828 izolovaných kampylobakterov bolo 383 kmeňov (46 %) izolovaných z výterov z rekta žien. 48 % kmeňov bolo izolovaných z výteru z rekta detí do 5 rokov.

Najvyšší výskyt rezistencie v sledovanom súbore vzoriek (n=828) bol zaznamenaný voči ciprofloxacínu – 67,6 %. Rezistencia voči tetracyklínu sa vyskytla u 32,4 % kmeňov, v prípade ampicilínu so sulbaktámom bol výskyt rezistentných kmeňov nižší - 26,4 %. Rezistencia voči erytromycínu sa v testovanom súbore vzoriek vyskytla iba veľmi ojedinele (< 1 %). Graf 3.

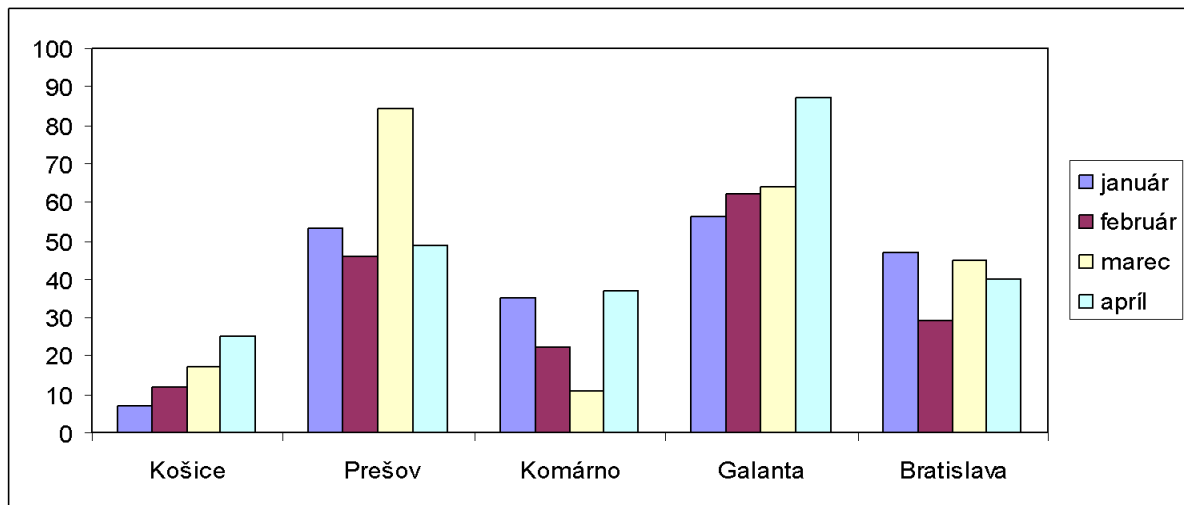
## Pôvodné práce

**Tab 3** Oligonukleotidy použité v našej práci

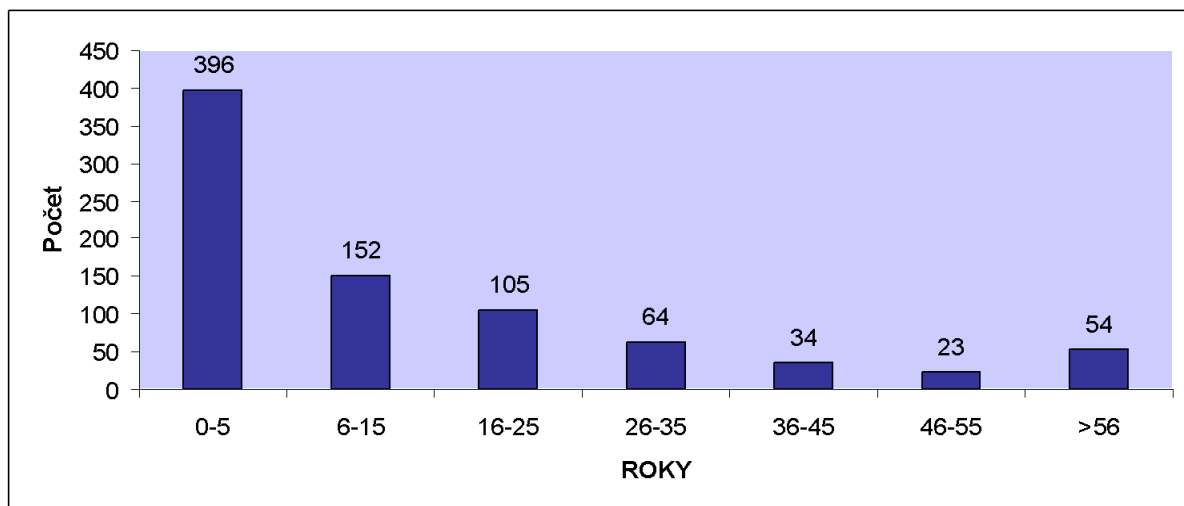
Primer	Sekvencia od 5' - 3'	Veľkosť amplikónu (bp)	Teplota annealing u	Referencia
OT1559	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG	287	55 °C	Josefsen M. H. et al. 2004
18-1	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA			
OXA61f	AGAGTATAATACAAGCG	372	54 °C	Obeng A. S. et al. 2012
OXA61r	TAGTGAGTTGTCAAGCC			
cmeBf	AGGCGGTTTTGAAATGTATGTT	444	50,8 °C	Olah P. A. et al 2006
cmeBr	TGTGCCGCTGGGAAAAG			
cdtB CJf	ATCTTTTAACCTTGCTTTTGC	714	56 °C	Asakura M. et al. 2008
cdtB CJr	GCAAGCATTAATAATCGCAGC			
cdtB Ccf	TTTAATGTATTATTTGCCGC	413	56 °C	Asakura M. et al. 2008
cdtB Ccr	TCATTGCCTATGCGTATG			
tet(O)f	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	515	55 °C	Ng L. K. et al 2001
tet(O)r	TCCCCTGTTCCATATCGTCA			

**Tab 4.** Počet analyzovaných výterov z rekta, pozitívnych kultivácií *Campylobacter* spp. v období január až apríl 2015 na vybraných prevádzkach HPL spol. s r.o.

Prevádzka HPL spol. s r.o.	Celkovo výterov	pozitívna kultivácia <i>Campylobacter</i> spp.	%
Košice	1397	61	4,4
Prešov	3649	232	6,4
Komárno	2176	105	4,8
Galanta	5213	269	5,1
Bratislava – Petržalka	4539	161	3,5
	16974	828	4,8



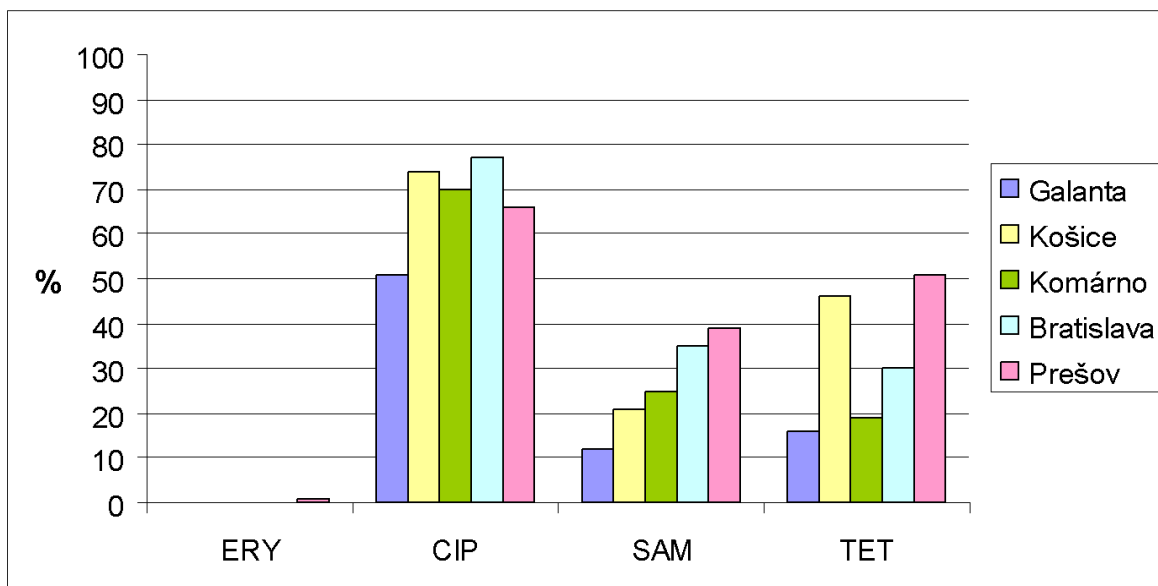
**Graf 1.** Zastúpenie izolovaných kmeňov *Campylobacter* spp. v jednotlivých mesiacoch a prevádzkach spoločnosti HPL s.r.o.



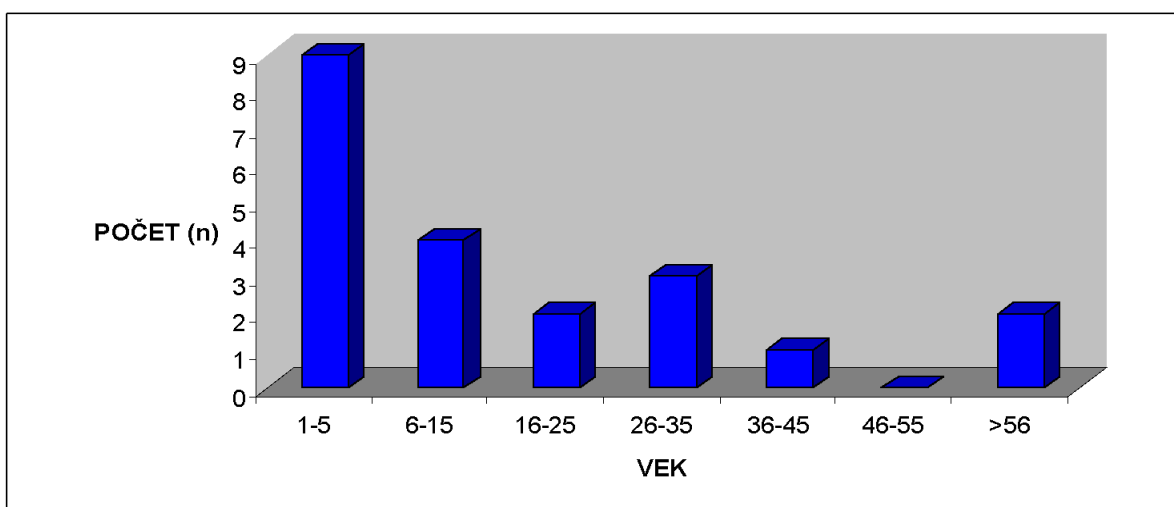
**Graf 2.** Veková štruktúra pacientov s pozitívnym kultivačným nálezom *Campylobacter* spp. v sledovanom súbore vzoriek.

Z celkového súboru vzoriek (n=828) sme vyseletovali 20 kmeňov *Campylobacter* spp. rezistentných voči tetracyklínu, ciprofloxacínu a ampicilínu so sulbaktámom. Výsledky PCR diagnostiky potvrdili rod *Campylobacter* spp. u všetkých 20 analyzovaných kmeňov, z ktorých boli metódou hmotnostnej spektrofotometrie detekované iba 3 kmene *C. coli*. Vybraných 20 kmeňov *C. jejuni* a *C. coli* pochádzalo od pacientov z okresov Košice, Prešov, Komárno a Bratislava. Z celkového počtu 20 bolo 9 kmeňov (45 %) izolovaných z rekta detí vo veku do 5 rokov. (Graf 4) Najčastejšie uvedenými diagnózami v sledovanom súbore vzoriek boli diagnózy K30 a K52.





**Graf 3.** Prehľad rezistencie voči testovaným antibakteriálnym látkam u izolovaných kmeňov *Campylobacter* spp. v sledovanom súbore vzoriek.



**Graf 4.** Veková štruktúra pacientov s pozitívnou kultiváciou *Campylobacter* spp. u vybraných 20 multirezistentných kmeňov.

Z 20 vybraných kmeňov *Campylobacter* spp. rezistentných voči TET, SAM a CIP, sme detekovali gén *cmeB* (efluxová pumpa) až u 12 kmeňov, čomu zodpovedá aj najvyšší výskyt rezistencie voči ciprofloxacínu (67,6 %). Betalaktamáza typu OXA-61 sa vyskytla u jedenástich a gén *tet(O)* bol prítomný u štrnástich z 20 vybraných kmeňov. (Tab 5.)

Všetky tri testované gény rezistencie súčasne sa vyskytli u piatich kmeňov *C. jejuni* a u jedného kmeňa *C. coli*. Rezistencia proti erytromycínu sa v testovanom súbore vzoriek vyskytla iba ojedinele, preto sme PCR diagnostiku pre tieto antibiotické látky nerealizovali.

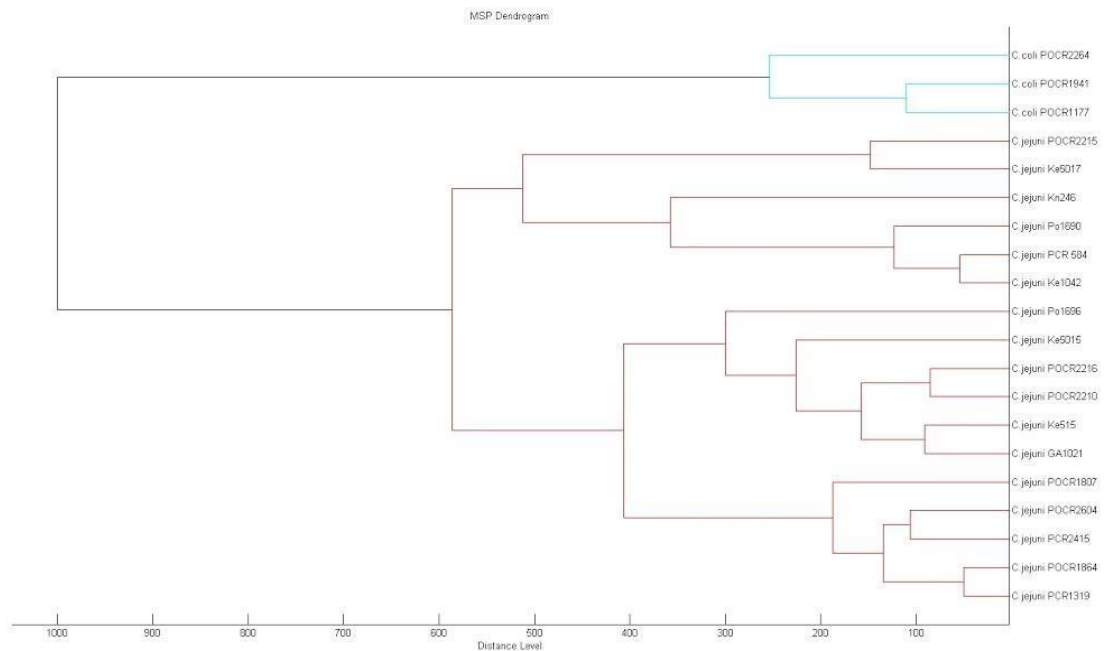
**Tab 5.** Výskyt génov rezistencie na tetracyklín, ciprofloxacín a ampicilín so sulbaktámom u vybraných multirezistentných kmeňov *Campylobacter* spp. v sledovanom súbore vzoriek.

Číslo vzorky	Druh	Gén pre rezistenciu			Gén pre toxín
KN246	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>			<i>cdtB</i>
PCR584	<i>C. jejuni</i>				<i>cdtB</i>
PCR2415	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
PCR1319	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>		
KE5015	<i>C. jejuni</i>			<i>cmeB</i>	<i>cdtB</i>
KE5017	<i>C. jejuni</i>				
KE1042	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>		<i>cdtB</i>
KE515	<i>C. jejuni</i>		<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
POCR1177	<i>C. coli</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>		
POCR2210	<i>C. jejuni</i>		<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
POCR2216	<i>C. jejuni</i>		<i>tet(O)</i>		
POCR2215	<i>C. jejuni</i>		<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
POCR1864	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
POCR1941	<i>C. coli</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
PO1696	<i>C. jejuni</i>		<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
POCR2264	<i>C. coli</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>		<i>cmeB</i>	
POCR2604	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	<i>cdtB</i>
POCR1807	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	
PO1690	<i>C. jejuni</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-61</sub>	<i>tet(O)</i>	<i>cmeB</i>	<i>cdtB</i>
GA1021	<i>C. jejuni</i>				

PO – Prešov, KE – Košice, PCR – Bratislava-Petržalka, KN – Komárno, GA - Galanta

U 20-tich multirezistentných kmeňov bola pomocou analýz MALDI-TOF stanovená biodiverzita jednotlivých kmeňov *C. jejuni* a *C. coli*. U troch *C. coli* izolovaných z prešovského regiónu vidíme dve skupiny kmeňov, zatiaľ čo vo väčšom súbore kmeňov *C. jejuni*, sú to dve veľké skupiny kmeňov. Pre epidemiologické účely sú zaujímavé dvojice príbuzných kmeňov *C. jejuni* z rôznych regiónov napr. KE515 (gény *tet(O)*, a *cmeB*) a GA1021 (bez detegovaných génov rezistencie) alebo PCR584 (bez génov rezistencie) a KE1042 (*tet(O)*,*bla*<sub>OXA-61</sub>).

U šiestich zo 17-tich vyselektovaných kmeňov *C. jejuni* sme stanovili prítomnosť génu *cdtB* (2), zodpovedného za produkciu toxínu. U troch kmeňov *C. coli* sme gén *cdtB* nedetegovali (Tab 5).



**Obr 1.** Fylogenetická príbuznosť 20-tich vyselektovaných multirezistentných kmeňov *Campylobacter* spp.

## Diskusia

Pôvodcom kampylobakteriôz u ľudí je vo väčšine prípadov *C. jejuni* a takmer všetky ostatné zostávajúce ľudské infekcie spôsobuje *C. coli*. Kampylobakterové infekcie majú sezónny charakter, postihujú najmä malé deti do 5 rokov, častejšie sa vyskytujú u mužov ako u žien.

V sledovanom súbore vzoriek výterov z rekta s vybranými diagnózami (A02 – A05, A09, K29, K30, K35 – K38, K52 a R10) v období od januára do apríla roku 2015 sme vo vybraných laboratóriách HPL spol. s r.o. vykultivovali 828 kmeňov *Campylobacter* spp. (4,8 %). 48 % izolovaných kmeňov kampylobakterov bolo vykultivovaných z výteru z rekta dieťaťa do 5 rokov, 46 % pochádzalo z výteru z rekta u žien. Poľskí autori (17) vo svojej práci uvádzajú až 84%-tný podiel izolovaných kampylobakterov u detí do 6 rokov.

Veľmi podobné výsledky rezistencie voči antibiotikám ako sú naše zverejnili vo svojej štúdií aj českí autori (19). Vo svojej práci uvádzajú 61,9 % kmeňov *C. jejuni* a 72 % kmeňov *C. coli* rezistentných k ciprofloxacínu, 32 % kmeňov *C. jejuni* aj *C. coli* rezistentných voči tetracyklínu. Podobne uvádzajú nízku frekvenciu výskytu rezistencie k erytromycínu - 0,3 % kmeňov *C. jejuni* a 2,7 % kmeňov *C. coli*. Poľskí autori (17) vo svojej práci uvádzajú 56,5% rezistenciu klinických izolátov *C. jejuni* a *C. coli* voči ciprofloxacínu a iba 14,8% rezistenciu voči tetracyklínu.

## Pôvodné práce

---

Napriek tomu, že všetkých 20 izolátov *C. jejuni* a *C. coli* bolo rezistentných voči tetracyklínu, ciprofloxacínu a ampicilínu so sulbaktámom, vybrané gény rezistencie voči týmto antibakteriálnym látkam sme nedetegovali u všetkých izolátov. Príčinou môže byť existencia iného mechanizmu rezistencie na dané antibakteriálne látky ako nami detegovaná prítomnosť génu rezistencie, kombinácia viacerých mechanizmov rezistencie alebo doposiaľ neobjasnený mechanizmus rezistencie.

CDT toxín je kódovaný tromi génmi (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) a na vytvorenie aktívneho CDT toxínu je potrebná expresia všetkých troch génov (9). Prítomnosť génu *cdtB* sme stanovili u šiestich kmeňov z 20-tich izolátov. Dánski autori (3, 9) vo svojej práci uvádzajú *cdtB* gén u všetkých izolátov *C. jejuni* a *C. coli*. AbuOun M. spolu so svojimi spolupracovníkmi (1) vo svojej štúdií poukázali na prirodzene sa vyskytujúce CDT-negatívne kmene *C. jejuni*. Výskyt takýchto kmeňov v dôsledku mutácií pravdepodobne vysvetľuje, prečo sme gén *cdtB* nedetegovali u všetkých kmeňov *Campylobacter* spp, ďalšia špekulatívna možnosť je aj vo voľbe primerov od iných autorov.

## Záver

Kampylobakterióza je od roku 2009 najčastejšie hlásené hnačkové ochorenie v rámci EÚ a od roku 2011 aj na Slovensku. Dôvodom častejšej izolácie kmeňov rodu *Campylobacter* z klinického materiálu je používanie selektívnych agarových médií a zavedenie špeciálnych kultivačných podmienok (teplota kultivácie 42°C, mikroaerofilné prostredie), ktoré si zástupcovia tohto rodu vyžadujú.

Kampylobakterióza je typická zoonóza rozšírená celosvetovo, vykazuje vyššiu incidenciu u malých detí a mladých dospelých, častejšie sa vyskytuje v letných mesiacoch. Ochorenie má podobné symptómy ako salmonelová enteritída. Jednoznačná diagnóza môže byť stanovená iba na základe dôkazu pôvodcu infekcie v klinickom materiáli.

Liečba nekomplikovanej kampylobakterovej gastroenteritídy spočíva iba v dôkladnej rehydratácii. Závažnejšie infekcie vyžadujú aj antibiotickú liečbu. Empirickým liečivom pri suspektnej bakteriálnej gastroenteritíde sú fluorochinolóny, tetracyklíny a makrolidy. Výskyt rezistencie voči fluorochinolónom v sledovanom súbore vzoriek bol až 67,6 %, proti tetracyklínom 32,4 %. Frekvencia výskytu rezistencie voči makrolidom v našom súbore vzoriek bola veľmi nízka (<1 %), preto sú v našich podmienkach liekom voľby makrolidy.

Výsledky sú prvou správou o výskyte génov rezistencie na antibakteriálne látky u *Campylobacter* spp. na Slovensku.

## PodĎakovanie:

Práca je výsledkom riešenia projektov APVV-14-0274 a LPP-0045-09. Autori ďakujú oddeleniu bakteriológie HPL Bratislava-Petržalka, HPL Galanta, HPL Komárno a HPL Prešov za zasielanie rezistentných kmeňov *Campylobacter* spp. a za poskytnuté údaje.

### Literatúra

- [1] ABUOUN M., MANNING G., CAWTHRAW S. A., RIDLEY A., AHMED I. H., WASSENAAR T. M., NEWELL D. G., 2005, Cytolethal Distending Toxin (CDT) – Negative *Campylobacter jejuni* Strains and Anti-CDT Neutralizing Antibodies Are Induced during Human Infection but Not during Colonization in Chickens, *Infect Immun.* 73(5): 3053 – 3062  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1087314/>
- [2] ASAKURA M., SAMOSORNUK W., HINENOYA A., MISAWA N., NISHIMURA K., MATSUHISA A., YAMASAKI S., 2008 Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immun Med Microbiol.* 52:260–266  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00369.x/full>
- [3] BANG D. D., MULLER NIELSEN E., SCHEUTZ F., PEDERSEN K., HANDBERG K., MADSEN M, 2003, PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates, *Journal of Applied Microbiology*, 94: 1003 - 1014  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x/full>
- [4] BOLTON D.J., 2015, *Campylobacter* virulence and survival factors, *Food Microbiology*; 48: 99-108  
Abstrakt dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790997>
- [5] HOCHÉL I., 2009, Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp., *Chem. Listy*, 103: 814-822  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_10\\_814-822.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_10_814-822.pdf)
- [6] IOVINE N. M., 2013, Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*, *Virulence*; Volume 4, Issue 3, 230 – 240  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/viru.23753>
- [7] JOSEFSEN M. H., JACOBSEN N. R., HOORFAR J., 2004, Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (6), 3588-3592  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427791/>
- [8] KALINOVÁ Z., JURÍŠ P., 2015, Kamylobakteriá (*Campylobacter jejuni*), epidemiológia, terapia a profylaxia, *Slovenský veterinársky časopis 1-2*, str. 53 – 56
- [9] LEE R. B., HASSANE D. C., COTTLE D. L., PICKETT C. L., 2003, Interactions of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Subunits CdtA and CdtC with HeLa Cells, *Infect Immun*, 71(9): 4883 - 4890  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187314/>
- [10] MISHU B., BLASER M. J., 1993, The role of *Campylobacter jejuni* infection in the initiation of Guillain-Barre syndrome, *Clin. Infect Dis.*, 17:104 – 108  
Dostupné z: <http://www.antimicrobe.org/new/b91.asp>
- [11] MURRAY P. R., ROSENTHAL K. S., PFALLER M. A., 2013, *Medical microbiology*, 7th Edition, Elsevier Saunders, ISBN 978-0-323-08692-9, str. 280 – 283
- [12] NG L. K., MARTIN I., ALFA M. & MULVEY M., 2001, Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes, *Mol. Cell. Probes*, 15: 209 – 215  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850801903639>

- [13] OBENG A. S., RICKARD H., SEXTON M., PANG Y., PENG H. & BARTON M., 2012, Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia, *J. Appl. Microbiol.* 113: 294 – 307  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05354.x/full>
- [14] OLAH P. A., DOETKOTT C., FAKHR M. K. & LOGUE C. M., 2006, Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. Isolated from freshly processed Turkeys, *Food Microbiology* 23: 453 - 460  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002005000924>
- [15] SCHARFEN J. ml., 2013, *Diferenciální diagnostika v klinickej mikrobiologii*, Praha: Nucleus HK, str. 151, ISBN: 978-80-87009-32-1
- [16] VOTAVA M. a kol., *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, 2003, str. 49 - 50, ISBN 80-902896-6-5
- [17] WARDAK S., SZYCH J., ZASADA A. A., GIERCZYNSKI R., 2007, Antibiotic Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Clinical Isolates from Poland, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, str. 1123 – 1125  
Dostupné z: <http://europepmc.org/articles/PMC1803138;jsessionid=4whqv1T5nlKHTg27mULM.1>
- [18] WIECZOREK K., OSEK J., 2013, Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*, *BioMed Research International*, article ID 340605,  
dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/340605>
- [19] ŽEMLIČKOVÁ H., JAKUBU V., MAREJKOVÁ M., URBÁŠKOVÁ P., 2014, Rezistence k erytromycinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu u humánních izolátů *Campylobacter* spp. v České republice, vyšetřená standardní metodou EUCAST, *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 63, č. 3  
Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/epidemiologie-clanek/rezistence-k-erytromycinu-ciprofloxacinu-a-k-tetracyklinu-u-humannich-izolatu-campylobacter-spp-v-ceske-50377>

Adresa pre korešpondenciu: [chokova@hpl.sk](mailto:chokova@hpl.sk), [kmetv@saske.sk](mailto:kmetv@saske.sk)

## Výskyt *Listeria monocytogenes* u pacientov Fakultnej nemocnice Nitra v rokoch 2011 – 2013

Zimmermann, M.

Ústav klinickej mikrobiológie, FN Nitra

### Úvod

#### **História:**

Už na začiatku minulého storočia boli popísané ľudské ochorenia, ktorých klinická symptomatológia, alebo patologicko - anatomické prejavy zodpovedali obrazu listérievej infekcie (cit. Bednář a kol., 1996). Prvé bakteriologicky overené ľudské infekcie vyvolané druhom *Listeria monocytogenes* popísal v roku 1929 Nyfeldt u pacientov s angínou, uzlinovým syndrómom a výraznou mononukleózou, u ktorých izoloval listérie z krvi. U pacientov s meningeálnymi príznakmi bol mikroorganizmus prítomný aj v likvore (Nyfeldt, 1929). Baktéria bola pomenovaná na počesť Josepha Listera – zakladateľa využitia sterilizácie a asepsy v chirurgii. Na jej objave sa však nepodieľal (Smíšek, 2007).

#### **Taxonómia:**

Rod *Listeria* zahŕňa 10 druhov: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, a *L. rocourtae* (Graves et al, 2010, Leclercq et al, 2010), vrátane dvoch nedávno identifikovaných druhov *L. fleischmannii*, a *L. weihenstephanensis* (Halter et al, 2013, Bertsch et al, 2013).

*L. monocytogenes* je fakultatívne intracelulárny patogén pre ľudí a zvieratá, *L. ivanovii* infikuje prevažne ovce a dobytok, len výnimočne ľudí, zatiaľ čo iné druhy *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtae*, *L. fleischmannii* a *L. weihenstephanensis* sú v podstate saprofyty (Liu, 2013).

V rámci druhu *L. monocytogenes* sa na základe antigénnej štruktúry somatických O antigénov rozlišuje 13 sérotypov. Na vzniku humánnych listerióz sa však podieľajú predovšetkým sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b (Karpíšková et al., 2008).

#### **Klinický význam *Listeria monocytogenes***

Inkubačný čas je 1 – 4 týždne. Ochorenie môže prebiehať v rozličných formách.

Pri **vrodenej forme** ide o intrauterinnú infekciu, ktorá môže mať za následok potrat, predčasný pôrod, pôrod mŕtveho plodu alebo živého plodu, u ktorého sa prejaví včasná adnatna septická infekcia – „granulomatosis infantiseptica“. Na koži, slizniciach, pečeni, slezine, pľúcach a v nadobličkách vznikajú miliárne nekrózy – granulómy. Ak sa plod infikuje počas pôrodu v pôrodných cestách matky, začínajú sa u neho koncom prvého týždňa života rozvíjať neskoré príznaky infekcie, najčastejšie ako purulentná meningitída. Po novorodeneckých meningitídach sú časté psychomotorické retardácie alebo epilepsia. U tehotnej ženy má infekcia často inaparentný priebeh, alebo prebieha pod obrazom mierneho horúčkovitého ochorenia (Bálint et al., 2000).

Získanú formu možno rozdeliť podľa klinických príznakov na:

- **Latentnú formu**, ktorá sa klinicky nemusí prejavovať.
- **Purulentnú meningitídu, meningoencefalitídu, mozgové abscesy, rhomboencefalitída** – vyskytujúcu sa často u oslabených jedincov s príznakmi-bolesti hlavy, teplota, nevoľnosť, zvracanie, deficity hlavových nervov, stuhnutosť šije, mozočkové príznaky, poruchy vedomia, epileptické záchvaty.
- **Oroglandulárnu uzlinovú formu** s nekrotickou angínou, pri ktorej vzniká febrilné zdurenie podčelústnych lymfatických uzlín.
- **Septikotýfóznú formu**, ktorá vzniká po použití kontaminovanej vody alebo potravy; v klinickom obraze dominuje teplota, „splenomegália, exantém“ a v krvnom obraze je leukopénia.
- **Septickú formu**, ktorá je častejšia u imunokompromitovaných pacientov. Postihnuté sú rozličné orgány. Ochorenie prebieha pod obrazom sepsy a má zlú prognózu (Bálint a kol., 2000, Disson et al., 2012, Goldenberg, 2002).

Menej časté formy ako „keratokonjunktivitis, endophtalmitis, lymphadenitis, endometritis“ – majú pri včasnej liečbe dobrú prognózu. Lokalizované formy infekcie sú abscesy a „panaricium“. Kožná listerióza sa môže vyhojiť aj spontánne (Bednár et al., 1996).

### **Rozšírenie a prenos:**

Rezervoárom *Listeria monocytogenes* sú domáce a voľne žijúce zvieratá, cicavce, vtáky aj plazy. Na človeka sa infekcia prenáša pri styku s chorým zvieratkom, jeho ošetrovaní, nepriamo surovým mliekom, pri kúpaní vo vodách znečistených výkalmi a tepelne nedostatočne spracovaným mäsom. Prameňom pôvodcu nákazy môže byť aj zdravý nosič, ktorý vylučuje listérie stolicou. Novorodenecké infekcie spôsobuje transplacentárny prenos nákazy na plod alebo infekcia v pôrodných cestách počas pôrodu. Novorodenci môžu byť infikovaní aj nosičmi pôvodcu nákazy z nemocničného personálu. Vstupnou bránou infekcie je dýchací a tráviaci trakt, porušený kožný kryt, spojovky, sliznice a placenta (Bálint et al., 2000). Predpokladá sa, že infekčná dávka u zdravých osôb je pomerne vysoká asi  $10^8$  buniek, u rizikových skupín je výrazne nižšia  $10^2 - 10^3$  buniek (Demnerová et al., 2008).

### **Faktory patogenity u listérií:**

*Listeria monocytogenes* je podmieneným intracelulárnym patogénom u ľudí aj u zvierat (Bálint a kol., 2000). Bunky, do ktorých sa dostáva, sú jednak fagocytujúce makrofágy ale aj nefagocytujúce hostiteľské bunky. Pre vstup listérií do nefagocytujúcich hostiteľských buniek, je dôležitá prítomnosť špeciálnych povrchových proteínov, ktoré sú schopné fagocytózu indukovať. Ide predovšetkým o internalín A a internalín B. Receptory pre internalíny sú popisované v intestinálnom epiteli čreva, pri hepatocytoch a fibroblastoch (Nikitas et al., 2011). Internalíny a ich receptory sú popisované ako možný spôsob prestupu listérie cez hematoencefalitickú bariéru (Disson et al., 2012). Ďalším proteínom podieľajúcim sa na internalizácii baktérie je p60 (Blažková et al., 2005). Na úniku baktérie z fagocytárnej vakuoly sa podieľa virulentný proteín Listeriolyzín O (hemolyzín). Druhou jeho funkciou je, že uvoľňuje železo z feritínu a tým urýchľuje množenie baktérii v bunke. Je leukocídny. Virulencia listérií je viazaná na produkciu hemolyzínov. Iba hemolytické kmene *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* sú schopné vyvolať ochorenie (Bednár et al., 1996). Po úniku z fagozómu sa baktéria v cytoplazme hostiteľskej bunky množí a premiestňuje k jej cytoplazmatickej membráne. Jej pohyb je sprostredkovaný proteínom ActA, ktorý polymerizuje bunkový aktín a vytvára za baktériou akýsi chvost, ktorý sa predlžuje (Blažková et al., 2005).



## **Pôvodné práce**

---

Súčasťou plazmatickej membrány je MPA (monocytosis producing agent), ktorý nepriamo zvyšuje tvorbu nových monocytov v dreni a ich prílív do infikovaného ložiska. Tým sa zvyšuje počet makrofágov v dreni, krvi a slezine.

Medzi faktory virulencie patrí tolerancia voči menej kyslej žalúdočnej šťave novorodenca, vnútrobunkovo uložená časť baktérií, aktívne prenikanie do rôznych tkanív (Bálint et al., 2000).

*Listeria monocytogenes* ľahko kolonizuje celý rad substrátov, často vo forme biofilmu (Travier et al., 2013). Pretrvávajúce listérii v prostredí na spracovanie potravín je prisudzované najmä ich schopnosti tvoriť biofilm. Proteíny spojené s biofilmom sú predmetom veľkého záujmu. Uplatňujú sa pri bunkovej signalizácii, patogenéze a remodelácii biofilmu (Lourenco et al., 2013).

### **Patogenéza a imunita:**

Vlastný rozvoj klinicky manifestného ochorenia prebieha v dvoch na seba nadväzujúcich fázach. V prvej dochádza k prieniku listérií do buniek hostiteľa, kde sa množia. V druhej fáze, po predchádzajúcej bakteriémii, sú postihnuté cieľové orgány, predovšetkým centrálny nervový systém a placenta.

Zo začiatku je infekcia kontrolovaná makrofágmi a monocytmi, ktoré prenikajú k ložisku z krvi. Imunita je sprostredkovaná predovšetkým T bunkami, ktoré aktivujú makrofágy. Pokiaľ pomer monocyt/parazit zostane priaznivý do doby nástupu bunkovej imunity, infekčné ložisko sa ohraničí. V opačnom prípade sa infikované bunky rozpadajú, listérie prenikajú do subepiteliálnych tkanív a do krvného riečiska a infekcia sa generalizuje. S rozvojom oneskorenej precitlivelosti sa tvoria v postihnutých orgánoch špecifické granulómy, makroskopicky viditeľné ako drobné belavé uzlíky (Bednár et al., 1996).

### **Prevencia:**

Starostlivá pozornosť venovaná bezpečnosti potravín je obzvlášť dôležitá pre ochranu zraniteľnej skupiny obyvateľov. Dozor nad alimentárnymi infekciami ako je listerióza spočíva v identifikácii nedostatkov v oblasti bezpečnosti potravín, ktoré možno riešiť v priemysle regulačnými orgánmi, v potravinárskych, spracovateľských a spotrebiteľských zariadeniach (Silk et al., 2013).

### **Terapia:**

*Listeria monocytogenes* je obvykle citlivá na účinok penicilínu G, ampicilínu, erytromycínu, sulfametoxazolu-trimetoprimu, chloramfenikolu, rifampicinu, tetracyklínov a aminoglykozidov (Bednár et al., 1996). Všeobecne je odporúčaný ako liek voľby ampicilín (Staňková et al., 2000). *Listeria monocytogenes* je prirodzene rezistentná proti cefalosporínom (Demnerová et al., 2008).

## **Laboratórna diagnostika**

V súčasnosti sú možnosti laboratórnej diagnostiky listerióz nasledovné:

### **Sérologické vyšetrenie:**

Sérologické odpovede na celé bunkové antigény nie sú príliš vhodné, pretože majú skříženú reaktivitu medzi *L. monocytogenes* a stafylokokmi, enterokokmi, *Bacillus spp.* (Allerberger, 2003). ELISA metodiky sa nepoužívajú.

### **Kultivačné vyšetrenie:**

Kultivačná náročnosť listérií nie je veľká. Za 24 hodín vyrastú na krvnom agare priesvitno-biele kolónie s  $\beta$  hemolýzou (Bednár et al., 1996). Rozdelenie podľa hemolytickej aktivity v rámci rodu *Listeria* je nasledovné: *Listeria monocytogenes* tvorí podobne ako *Listeria seeligeri* diskretnú zónu hemolýzy. Výraznú zónu tvorí iba *Listeria ivanovii*, ostatné druhy listérií hemolytickú aktivitu nemajú (Blažková et al., 2005). Pre odlišenie hemolytických druhov listérií sme použili modifikovaný CAMP test. Maximálna teplota pre rast listérií je 45 °C, optimum je 30 až 37 °C a najnižšia teplota je 2 °C. Listérie prežijú aj teplotu 62 °C po dobu 35 minút. Chladiarenské teploty sú pre listérie priaznivé, prežívajú taktiež mrazenie (Erban, 2007). S teplotou prostredia súvisí tvorba peritracheálnych bičiek, ktoré sa vytvárajú pri teplotách 20- 25 °C. Na farbenie sa používa farbenie podľa Grama. Morfológicky sú to grampozitívne paličky so zaoblenými koncami. V mikroskopii vzorky majú často tvar kokobacilov. Väčšina buniek môže byť gramlabilná až gramnegatívna. Kataláza je u listérií pozitívna (Bednár et al., 1996). Na kultiváciu sa môžu použiť aj chromogénne kultivačné médiá. Založené sú na detekcii fosphatidylinositol fospholipasy a na xylózovej fermentácii (Allerberger, 2003).

*Biochemické komerčné testy* používané na identifikáciu *Listeria monocytogenes* a rozlíšenie od iných druhov listérií, využívajú schopnosť fermentovať rôzne sacharidy (D-xyloza, L-rhamnosa,  $\alpha$ -methyl-D-mannosid a D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát, D-tagatosa (Allerberger, 2003).

*PCR diagnostika.* Špecifická amplifikovaného úseku DNA determinuje diagnostikovaný druh baktérie a vďaka jedinečnosti genetického kódovania je táto metóda jednou z najviac špecifických vôbec. Novšie aplikácie multiplexových PCR testov umožňujú diferenciáciu šiestich druhov *Listeria* real- time vyšetrením, pomocou dvoch triplexov (Hage et al., 2014).

Diagnostika pomocou prístroja MALDI-TOF. Vyšetrované baktérie po narastení na živných pôdach, sa nanesú na diagnostický terčik prístroja. Na terčiku je bakteriálna vzorka ožiarená laserom. Energia laseru vzorku rozkladá – ionizuje molekuly, predovšetkým prítomné ribozomálne proteíny. Ionizáciou vzniknú nabité ionty, ktoré sa pohybujú vo vytvorenom elektrickom poli podľa svojej molekulovej hmotnosti. Namerané hmotnostné spektrá molekúl sú pre jednotlivé mikroorganizmy druhovo špecifické a tým dochádza k identifikácii mikroorganizmu. Táto metodika je omnoho rýchlejšia ako tradičné metódy (Jadhav et al., 2013).

Rýchle testy na dôkaz antigénu *Listeria spp.* zo stolice. Táto metóda je veľmi obľúbená pre svoju rýchlosť a technickú jednoduchosť prevedenia. Využíva dva typy protilátok. Prvý typ protilátky je imobilizovaný na povrchu membrány, druhá protilátka je konjugovaná s farebnými latexovými časticami a je nanesená spolu so vzorkou na začiatok membrány. Táto zmes sa pohybuje membránou pôsobením kapilárnych síl. Pokiaľ je vo vzorke prítomný antigén, špecificky interaguje s označenou protilátkou. Vzniknutý imunokomplex sa následne naviaže na imobilizovanú protilátku, čo sa prejaví vznikom farebnej čiary v testovacej oblasti (Blažková et al., 2005).

Kmene *Listeria monocytogenes* možno pre epidemiologické účely charakterizovať pomocou typizačných metód – sérotypizáciou- sklíčkovou aglutináciou a makroreštrikčnou analýzou – založenou na štiepení bakteriálneho genómu reštrikčnými endonukleázami a následnej separácie fragmentov v pulznom poli- zistenie pulzotypov (Karpíšková et al., 2008).

### Praktická časť:

Na našom pracovisku sa použili na laboratórnu diagnostiku listerióz tri metódy:

- dôkaz protilátok aglutinačnou reakciou zo séra,
- kultivačný dôkaz a stanovenie citlivosti na antibiotiká z nasledujúcich materiálov – hemokultúra, likvor, žalúdočný obsah, ster z kože, obsah cysty,
- rýchly test na dôkaz antigénu *Listeria spp.* zo stolice.

**1. Dôkaz protilátok aglutinačnou reakciou zo séra:** Vyšetrovaným materiálom bolo sérum. Ako antigén sa použila inaktivovaná suspenzia výrobných kmeňov *Listeria monocytogenes* (Bioveta a.s.), proti ktorým sa zisťovala prítomnosť protilátok vo vzorke séra a stanovila sa ich kvantita.

**2. Kultivačný dôkaz baktérie *Listeria monocytogenes* v biologických vzorkách a stanovenie citlivosti na antibiotiká:** Za 24 hodín vyrástli na krvnom agare priesvitno- biele kolónie s  $\beta$  hemolýzou. *Listeria monocytogenes* vytvorila úzke jasné priesvitné zóny  $\beta$  – hemolýzy. Pre odlíšenie hemolytických druhov listerií sme použili modifikovaný CAMP test. Vyšetrované kmene sme inkubovali pri 37°C. Z vyšetrovaného kmeňa farbením podľa Grama boli v mikroskopickom obraze prítomné grampozitívne paličky. Niekedy sa časť baktérií zafarbila gramlabilne. Kataláza bola pozitívna. Konečná diagnostika bola realizovaná komerčným identifikačným testom - API- strep test a API- Listeria test (Biomérieux). Citlivosť na antibiotiká bola zistená kvalitatívnou diskovou metódou – diskovým difúznym testom, s použitím štandardných diskov (Oxoid). Po inokulácii bakteriálnej suspenzie 0,5 McFarland na Mueller- Hintonovej agare boli priložené testované antibiotické disky: ampicilín (2 $\mu$ g), meropenem (10 $\mu$ g), erytromycin (15 $\mu$ g), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 $\mu$ g). Po 24-hodinovej kultivácii pri 37 °C sme odčítali citlivosť. Veľkosť inhibičných zón bola stanovená v súlade s pokynmi European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST, 2014).

**3. Dôkaz antigénu imunochromatograficky zo stolice:** Vyšetrované boli vzorky stolice na prítomnosť antigénu *Listeria spp.* imunochromatografickou metódou. V komerčnom testovacom prúžku - Rapid signal Listeria cassette (Orgenics) sú naviazané protilátky proti listérii, ktoré reagujú s antigénom zo stolice za vzniku detekčných prúžkov. Senzitivita testu je 96 % a špecificita testu je 93 %.

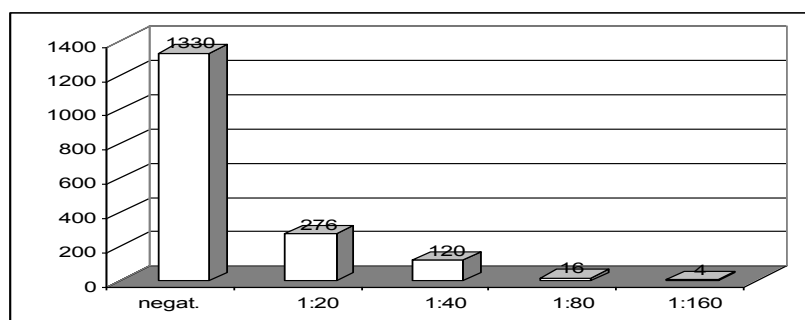
### Výsledky:

**Dôkaz protilátok aglutinačnou reakciou zo séra:** V roku 2011 – 2013 sme vyšetřili séra od 1746 pacientov. Pacienti boli z infekčnej, internej, novorodeneckej kliniky a z kožných ambulancií. Pacienti mali najčastejšie diagnózy: Iná baktériová meningitída- G00.8. Baktériová meningitída, bližšie neurčená- G00.9. Iná a bližšie neurčená infekčná choroba- B99. Horúčka bližšie neurčená- R50.9. Bakteriová sepsa u novorodenca, bližšie neurčená- P36.9. Iné lokálne infekcie kože a podkožného tkaniva-L08.0. Pozitivita vo všetkých titroch bola v 416 prípadoch, čo je v 23 %. Konkrétne pozitívne titre boli 1:20 u 16 % , 1:40 u 7 % a 1:80 u 1 % , 1:160 u 0,25 % pacientov.

## Pôvodné práce

**Tabuľka č.1:** Prítomnosť protilátok v sére pacientov.

titer	pacienti No	pacienti %
negat. titre	1330	76 %
všetky pozit. titre	416	23 %
1:20	276	16 %
1:40	120	7 %
1:80	16	1 %
1:160	4	0,25 %



**Graf č. 1:** Prítomnosť protilátok v sére pacientov.

Pacienti vyšetrení aglutinačne mali v niektorých prípadoch súčasne vyšetrenú listériu aj inými laboratórnymi metódami. Konkrétne dvaja sérologicky pozitívni pacienti boli súčasne kultivačne vyšetrení, pričom bola potvrdená prítomnosť *Listeria monocytogenes* v biologickej vzorke. Dôkaz antigénu zo stolice bol u nich negatívny. Pozri tabuľku č.3.

**Kultivačný dôkaz baktérií *Listeria monocytogenes* v biologických vzorkách a stanovenie citlivosti na ATB :** Z likvoru bola identifikovaná *Listeria monocytogenes* u štyroch pacientov z 983 vzoriek. Z hemokultúry u jedného pacienta z 10 145 vzoriek. Zo sterov z kože a žalúdočných obsahov bola identifikovaná *Listeria monocytogenes*: jedenkrát zo steru z kože a žalúdočného obsahu u toho istého novorodenca. Stery z kože boli vyšetované v 1778 vzorkách. Žalúdočný obsah bol vyšetrený u 969 vzoriek. Z cysty mozgu u jednej pacientky.

**Tabuľka č.2:** Pozitivita biologických vzoriek vyšetrených kultivačne:

vzorka	spolu	Pozit.
likvor	983	4
hemokultúra	10 145	1
stery z kože	1 778	1
žalúdočný obsah	969	1
cysta z mozgu	1	1
všetky vzorky	13 876	8

Celkovo možno skonštatovať, že kultivačne bola listéria dokázaná u šiestich pacientov v ôsmich biologických vzorkách, ktoré sú uvedené v tabuľke č.2. Dvaja pacienti mali dokázanú listériu z dvoch rôznych vzoriek. Údaje o spomínaných pacientoch vidíme v tabuľke č.3.

Tabuľka č.3: Pacienti s pozit. kultivačným dôkazom listérie.

pacient/ vek	vzorka	diagnóza/ *pozit. dôkaz protilátok	klinika
1. A.C. 55 rokov	likvor	G 00. Zápal mozgových plien. *sérum 1:80	Infekčná klinika
2. S.S. 25 rokov	likvor	G00.9 Nešpecifikovaný bakteriálny zápal mozgových plien.	Infekčná klinika
3. M.M 51 rokov	likvor + cysta z mozgu	C 71. Zhubný nádor mozgu. *sérum 1:20	Infekčná klinika
4. H.M. 1 deň	ster z kože + žalúdočný obsah	P 07.1 Iná nízka pôrodná hmotnosť.	Novoro- denecká klinika
5. I.N. 55 rokov	hemokul-túra	R 50.9 Bližšie neurčená horúčka.	Infekčná klinika
6. G.H. 69 rokov	likvor	B 99. Iná a bližšie neurčená infekčná choroba.	Infekčná klinika

U kultivačne pozitívnych pacientov sa jednalo o cieleňé vyšetrenia aj na prítomnosť listérie, v rámci diferencielnej diagnostiky meningitíd, sepsí a perinatálneho skríningu.

Stanovenie citlivosti na antibiotiká. Testovali sme citlivosť na *Listeria monocytogenes* u šiestich pacientov, v ôsmich biologických vzorkách. Použili sme kvalitatívnu diskovú difúznú metódu. Veľkosť inhibičných zón bola stanovená v súlade s pokynmi EUCAST. Testované antibiotiká boli vo všetkých prípadoch citlivé. Nevyskytovali sa žiadne intermediárne citlivosti na antibiotiká.

Tabuľka č.4: Citlivosť na testované antibiotiká.

Anti-biotikum	ampicilín 2 µg	meropenem 10 µg	erytromycin 15µg	trimetoprim/ sulfametoxazol 1,25-23,75µg
citlivé	8	8	8	8
rezistent.	0	0	0	0

#### Dôkaz antigénu imunochromatograficky zo stolice:

Test nie je špecifický na *Listeria monocytogenes*. Dvanásť pacientov bolo vyšetrených touto metodikou, po dohovore s ošetrujúcim lekárom. Test bol pozitívny u dvoch pacientov, to je 14% vyšetovaných. Vyšetrení boli pacienti z infekčnej kliniky, z novorodeneckej kliniky – matky a ich novorodenci. Pacienti mali diagnózy: Bližšie neurčená horúčka R50.9, Iná respiračná tvrdza novorodenca P22.8.

**Tabuľka č.5:** Vyšetrenia antigénu *Listeria spp.* zo stolice.

roky	celkový počet vyšetrených	počet pozitívnych
2011- 2013	12	2 (novorodenci)

Ako vidíme z tabuľky č.5 - listériový antigén sme dokázali u dvoch novorodencov zo stolice. U týchto novorodencov neboli klinické príznaky ochorenia. U ich matiek sa nepodarilo laboratórne listeriózu potvrdiť – kultivačným dôkazom z tampónu z rekta, dôkazom protilátok aglutinačnou reakciou zo séra, dôkazom antigénu imunochromatograficky zo stolice.

### Diskusia:

Z našich sérologických vyšetrení vyplýva, že 23% pacientov, ktorých vzorky k nám boli poslané na vyšetrenie, prišli do styku s listériou. Pre antigénnu príbuznosť *Listeria monocytogenes* s grampozitívnymi kokmi (mikrokoky, enterokoky) je potrebné pozitívitu sérologickej reakcie hodnotiť opatrne. Za významné sa považujú iba také výsledky, kde je aglutinácia pozitívna od titra 1 : 160 a vyššie. Treba sledovať aj zmeny titra, preto je potrebné aglutináciu niekoľkokrát po sebe zopakovať v 1-2-3 týždenných intervaloch, aby sme zistili, či titer protilátok má vzostupnú alebo zostupnú tendenciu. Dôležitý je vzostup titra protilátok svedčiaci o čerstvom styku makroorganizmu s mikróbom, proti ktorému sa v období medzi odbermi krvi vytvorili nové protilátky. Test nie je dostatočne senzitívny a špecifický. Bolo by v budúcnosti vhodné tento test nahradiť inou metodikou.

Kultivačný dôkaz *L. monocytogenes* sa nám podaril za tri roky u šiestich pacientov v 8 vzorkách. Dvaja pacienti mali kultivačne dokázanú listériu z dvoch rôznych vzoriek. Pacient M.M. mal dokázanú listériu z likvoru a cysty z mozgu, pričom sa jednalo o ten istý kmeň. Pacient H.M. mal dokázanú listériu zo steru z kože a žalúdočného obsahu, tiež jedným kmeňom. Spolu bolo kultivačne vyšetrených 13876 vzoriek. Pozitívnych bolo 0,06% vzoriek. Z toho vyplýva, že len v niektorých prípadoch sa kontakt s listériou dostane do klinicky závažného štádia, kedy sa dá listéria dokázať už aj kultivačne z materiálov v cieľových orgánoch. Priemerná ročná incidencia listériových infekcií v USA v rokoch 2009- 2011 bola 0,29 prípadov na 100.000 obyvateľov (Silk et al., 2013). Zo správy Európskeho centra pre choroby, prevenciu a kontrolu (ECDC) za rok 2011, vyplýva, že ročná incidencia bola 0,31 prípadov na 100 000 obyvateľov (Danielsson et al., 2013).

Zistili sme, že sa jedná o pacientov starších a novorodenca, u ktorých je predpoklad nižšej výkonnosti imunitného systému. Jedna pacientka bola vo veku 25 rokov s imunodeficitom. To potvrdzuje aj odborná literatúra - k ochoreniu dochádza častejšie u osôb so zníženou obranyschopnosťou (novorodenci, tehotné ženy, geronti, diabetici, onkologickí pacienti, pacienti liečení imunosupresívami (Staňková a kol., 2000). Podobne sa píše aj v správe CDC z roku 2013: Väčšina prípadov listeriózy sa vyskytla u dospelých vo veku  $\geq 65$  rokov (58%) a v 14% boli spojené s tehotenstvom. Najmenej 74% pacientov veku  $<65$  rokov bolo imunodeficitných. V porovnaní s celkovou populáciou, výskyt bol výrazne vyšší u dospelých vo veku  $\geq 65$  rokov a tehotných žien (Silk et al., 2013).

U novorodenca sme zistili kultivačným dôkazom listériu zo žalúdočného obsahu. To zodpovedá tvrdeniu, že medzi najpodstatnejšie faktory virulencie listérií patrí tolerancia voči menej kyslej žalúdočnej šťave novorodenca. (Bálint et al., 2000).

U štyroch pacientov bol pozitívny kultivačný dôkaz listérie z likvoru. To zodpovedá tvrdeniu, že v druhej fáze, po predchádzajúcej bakteriémii sú postihnuté cieľové orgány, predovšetkým centrálny nervový systém a placenta (Bednář et al., 1996). Fakt, že sa listéria často vyskytuje u starších pacientov a spôsobuje meningitídy, vidieť aj z práce španielskych autorov. U seniorov bola listéria v poradí tretím najčastejšie sa vyskytujúcim patogénom pri meningitídach po *Streptococcus pneumoniae* a *Neisseria meningitidis* v období rokov 1997- 2006 (Cabellos et al., 2009).

Dvaja nami sledovaní pacienti zomreli. Pacientka S.S. kvôli listériovej infekcii. Pacientka M.M bola polymorbídna, listéria nebola priamo príčinou úmrtia. V USA bolo celoštátne hlásených 1651 prípadov listeriózy, ku ktorým došlo počas rokov 2009-2011. Prípady úmrtia boli v 21% (Silk et al., 2013).

Bakterémiu mal zistenú jeden pacient (pozitívna hemokultúra). Nemali sme pacienta, ktorý by mal súčasne, likvor aj hemokultúru kultivačne pozitívne. Pre porovnanie uvádzame retrospektívnu štúdiu inváznej listeriózy z rokov 2008 – 2010 španielskych autorov. Zistili 98 prípadov inváznej listeriózy. Bakteriémia bola v 58% prípadoch. Centrálny nervový systém bol postihnutý v 31% prípadoch (Macias et al., 2012).

V jednom prípade sme kultivačne potvrdili listériu z cysty v mozgu, zároveň pacientka mala listériu kultivačne dokázanú aj z likvoru. Jednalo sa o ten istý kmeň, mali rovnaké biochemické vlastnosti a citlivosť. Podobný prípad popisujú aj nemeckí autori u onkologickej pacientky. U nej bol na CT mozgu zistený nádor. V rámci diferenciálnej diagnostiky sa u nej zistilo, že sa jedná o abscesové ložisko, z ktorého sa vykultivovala *Listeria monocytogenes* (Stove et al., 2013).

Všetkých osem kmeňov kultivačne dokázaných listérií bolo citlivých na ampicilín, meropenem, erytromycín a trimetoprim/sulfametoxazol. Pre porovnanie podobné výsledky sú popisované v literatúre. Všetkých 90 testovaných kmeňov z retrospektívnej štúdie bolo citlivých na ampicilín (Macias et al., 2012). Podobne českí autori testovali citlivosť listériových kmeňov: Všetky testované kmene (678), boli citlivé na ampicilín, penicilín, gentamycín, trimetoprim, vankomycín a chloramfenikol. Sporadicky bola zistená rezistencia na tetracyklín a erytromycín (Gelbičová et al., 2013).

Dôkaz antigénu imunochromatograficky zo stolice sme robili u 12 pacientov, z toho dvaja boli pozitívni. Kultivačným vyšetrením sme u nich nezistili listériu. Výrobca týchto testov z Českej republiky testoval vzorky stolice od 32 pacientov s rovnakými príznakmi. Všetky pozitívne vzorky boli testované imunochromatograficky a porovnané s výsledkami získanými pri kultivácii. Výsledky vykazovali 99% zhodu ([www.vidia.cz](http://www.vidia.cz)).

### Záver:

Mikroorganizmus nie je vykultivovaný často v biologických vzorkách, ale na druhej strane jeho prítomnosť môže mať pre pacienta, najmä imunokompromitovaného, závažné následky. Včasná diagnostika a cieľená terapia následne môžu zlepšiť prognózu pacienta.

### Literatúra:

1. ALLERBERGER, F., 2003. Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. In: *Imunology and Medical Microbiology*. Roč.35,č.3, s.183-189
2. BALINT, O., et al., 2000. *Infektológia a antiinfekčná terapia*. Martin: Osveta. ISBN 80-8063-034-8.
3. BEDNÁŘ, M., et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil.
4. BERTSCH, D., et al., 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. In: *International journal systematic evolutionary microbiology*. Roč.63,č.2,s.526-532
5. BLAŽKOVÁ, M., et al., 2005. *Listeria monocytogenes*- nebezpečný patogén a jeho detekcia v potravinách. In: *Chemické listy*. Roč. 99, č.7,s.467-473
6. CABELLOS, C., et al., 2009. Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years. In: *Medicine (Baltimore)*. Roč. 88, č.2, s.115-9
7. DANIELSSON, N., et al., 2013. Listeriosis. In: *Annual epidemiological report. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data*. s. 99-102 Dostupné na internete: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-epidemiological-Report-2013.pdf>
8. DEMNEROVÁ, K., et al., 2007. Mikrobiologická bezpečnosť potravín: *Listeria monocytogenes* a *Enterobacter sakazakii*. In: *Výživa a potraviny*. Roč. 63, č.1, s. 9-11
9. DISSON, O., et al., 2012. Targeting of the central nervous system by listeria monocytogenes. In: *Virulence*. Roč.3, č.2, s.213- 221
10. ERBAN, V., 2007. Listerie a jimi, spôsobená onemocnení. In: *Výživa a potraviny*. Roč. 62, č.2, s. 43-44
11. LIU, D., 2013. Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae. In: *Microbiology Insights*.6: 59-69
12. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4,0, valid from 2014-01-01, <http://www.eucast.org/>
13. GELBIČOVÁ, T., KARPÍŠKOVÁ, R., 2013. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains of human and food origin in the Czech Republic. In: *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Roč. 19,č.2, s.32-35
14. GOLDENBERG, Z., 2002. Akútne infekcie centrálného nervového systému. In: *Neurologie pro prax*. Roč.3, č.6, s. 305-307
15. GRAVES, L., et al., 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, finger lakes national forest. In: *International journal systematic evolutionary microbiology*. Roč. 60,č.6, s.1280–1288
16. HAGE, E., et al., 2014. Identification of six *Listeria* species by real – time PCR assay. In: *Letters in applied microbiology*. Roč.58,č.6,s.535-40
17. HALTER, E., et al., 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* in a freshwater pond. In: *International journal systematic evolutionary microbiology*. 63: 641–647
18. JEDHAV, S., et al., 2013. Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: *J Proteomics*. 97:100-106
19. KARPÍŠKOVÁ, R., GELBIČKOVÁ, T., 2008. Charakteristika a prevalence klonu *Listeria monocytogenes* izolovaných od pacientu v letech 2001 – 2008 v České republice. In: *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Roč.57,č.4, s.137-140
20. LECLERCQ, A., et al., 2010. *Listeria rocourtiae*. In: *International journal systematic evolutionary microbiology*. Roč. 60, č.9,s. 2210–2214



21. LOURENCO, A., et al., 2013. Comparison of *Listeria monocytogenes* exoproteomes from biofilm and planktonic state: Lmo 2504, a protein associated with biofilms. In: *Applied and environmental microbiology*. Roč.79, č.19, str.6075-6082
22. MACIAS, M., et al., 2012. Invasive listeriosis in Valencian community, Spain, during period 2008- 2010. In: *Revista espanola de salud publica*. Roč. 86, č.6, s. 645-51
23. NIKITAS, G., et al., 2011. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. In: *The journal of experimental medicine*. Roč. 208, č.11, s. 2263-77
24. NYFELDT, A.,1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. In: *Soc. Biol.* 101: 590 – 591
25. SILK, J., et al., 2013. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).: Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks – United States, 2009-2011. In: *Morbidity and mortality weekly report*. Roč.62, č.22, s.448-52
26. SMÍŠEK, J.,2007. Rod *Listeria*. Prezentácia pre odbor všeobecné lékařství. Dostupné na internete: <http://www.mikrobiologie.unas.cz/soubory/listeria.pdf>
27. STAŇKOVÁ, M., et al., 2000. *Infekční lékařství minimum pro prax*. Praha:Triton. ISBN 80-7254-115-3.
28. STOVE, S., et al., 2013. Cerebral listeria abscess in patient with gastric cancer. In: *Deutsche mesizinshe wochenshrift*. Roč.138, č.14, s. 737-9
29. TRAVIER, L., et al., 2013. Acta Promotes *Listeria monocytogenes* aggregation. Intestinal Colonization and Carriage. In: *PLoS Pathog*. Roč.9,č.1,s. 1-16
30. Rapid–viditest listeria. Dostupné na internete: <http://www.vidia.cz/images/stories/Nove-navody-CZ/Navod-RAPID-Listeria-kazeta.pdf>

### Diagnostické postupy a terapia hepatitídy C

Loduhová, I<sup>1</sup>., Liptáková A. <sup>2</sup>, Kristian, P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

<sup>2</sup>Katedra laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve FZ KU, Ružomberok & Abbvie s.r.o., Bratislava

<sup>3</sup>Klinika infektológie a cestovnej medicíny UNLP a UPJŠ LF, Košice

#### Úvod

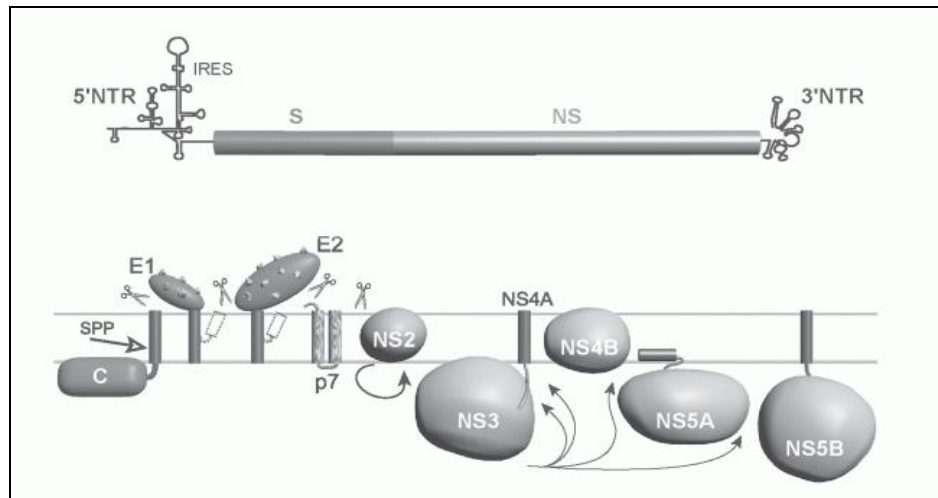
Pod pojmom „hepatitída“ rozumieme zápalovo-nekrotické pečenevé ochorenie, kedy dochádza ku kumulácii zápalových markerov s následnou deštrukciou hepatocytov a narušeniu pečenevých funkcií. Podľa vyvolávajúceho činiteľa môžeme klasifikovať hepatitídy do niekoľkých skupín (vírusové, autoimunitné, toxické, metabolické, kryptogénne, a i.) Vírusové hepatitídy sú spôsobené vírusmi, ktoré majú afinitu k pečenevým bunkám. Z nich medzi najrozšírenejšie a zároveň najnebezpečnejšie patrí hepatitída typu C. O hepatitíde C sa hovorí ako o „tichej epidémii“, pretože jej priebeh je zväčša asymptomatický aj desaťročia po nakazení. (Tan, 2006). Z hľadiska kliniky predstavuje vírus HCV závažný problém, pretože ochorenie má trend progredovať z akútnej fázy do chronicity a je významným faktorom pre vznik hepatocelulárneho karcinómu či pečenevej cirhózy. Vzhľadom na počet infikovaných, komorbidity asociované s ochorením, stúpajúci trend nárastu komplikácií, priamu mortalitu a náklady spojené s liečbou, je terapia hepatitídy typu C významným problémom v celospoločenskom meradle.

#### Charakteristika a epidemiológia vírusu hepatitídy C

Vírus hepatitídy C je obalený vírus veľkosti 30-80 nm tvorený pozitívnym RNA vláknom o 9600 bázach. Je ohraničený dvoma netranslatovanými oblasťami na jeho 5' a 3' koncoch a predstavuje exkluzívny čítací rámec, ktorý kóduje polyproteín zložený z cca 3000 aminokyselín. Polyproteín podlieha proteolýze **hostiteľskou peptidázou** v štruktúrnej oblasti **a vírusom kódovanými proteázami** v neštruktúrnej oblasti na 10 známych jednotlivých proteínov. Pod štruktúrne proteíny patrí hlavný (tzv. core) proteín a obalové glykoproteíny E1 a E2. Neštruktúrne proteíny sa označujú ako p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B (Tan, 2006). **Mechanizmus replikácie HCV** procesuje syntézu negatívnych medziproduktov, ktoré katalyzujú syntézu nových pozitívnych RNA vlákien. Replikačná produkcia môže dosahovať až  $10^{19}$  viriónových častíc za jeden deň počas aktívnej fázy infekcie. (Horák, 1999; Urbánek, 2004). Veľké množstvo mutácií je spôsobené veľkým množstvom chýb RNA polymerázy pri replikácii.

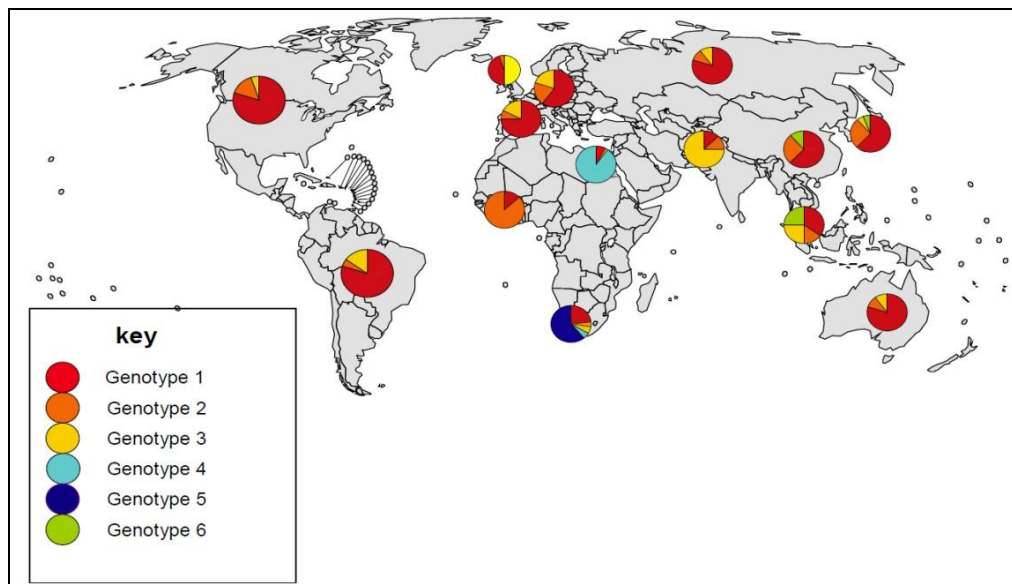
Tie na základe prirodzenej selekcie prežívajú v rámci jedného hostiteľa ako kvázidruhy alebo v rámci celej ľudskej populácie ako genotypy, príp. subtypy. Toto manifestuje **extrémnu heterogenitu genómu**. Najvyššiu variabilitu preukazujú práve neštruktúrne gény. Vírus HCV existuje vo forme 7 hlavných genotypov líšiacich sa vo viac ako 15% nukleotidovej sekvencie (každý je ešte diverzifikovaný na niekoľko subtypov (Smith et al., 2014).

## Prehľadové práce



Obrázok 1: Genóm vírusu HCV (Tan, 2006).

Na základe Simmondsovej nomenklatúry označujeme genotyp arabskou číslicou a subtyp malým písmenom abecedy. Obr.2 odzrkadľuje výskyt jednotlivých genotypov na základe jeho geografickej **prevalencie**. V USA a západnej Európe prevláda genotyp 1a a 1b. Epidemiologicky je infekcia HCV rozšírená po celom svete a predstavuje závažný problém verejného zdravotníctva, vrátane jeho sociálno-ekonomického impaktu. Jeho prevalencia podľa WHO predstavuje 3,1%, čo predstavuje približne 130-210 miliónov chronicky chorých osôb (Marinho, Barreira 2013).



Obrázok 2: Globálne rozdelenie genotypov vírusu HCV (WHO, 2014)

### Prenos a priebeh ochorenia

Vírus HCV sa **prenáša** parenterálne kontaktom s kontaminovanou krvou. Infekcia sa prenáša injekčným podávaním drog, pohlavným stykom; a ak sa nedodržia hygienické štandardy, sú rizikové aj tetovanie či piercing. Za rizikový sa považuje aj pobyt v zdravotníckom prostredí. Ohrození boli v minulosti aj pacienti liečení dialýzou. Od zavedenia povinného skríningu darovanej krvi v roku 1992 dochádza k prenosu infekcie pri transfúziách vo vyspelých krajinách len veľmi zriedka (Urbánek, 2004). Je dokázaný aj vertikálny prenos z matky na dieťa, aj keď v porovnaní s HBV je menej častý (Urbánek, 2014). Približne u polovice infikovaných sa nepodarí zistiť zdroj nákazy a chýba parenterálna expozícia (Horák, 1999).

**Klinický priebeh** ochorenia môže mať obraz akútnej hepatitídy (so symptómami ako únava, nechutenstvo, ikterus), častejší je však subklinický priebeh ochorenia s prechodom do chronicity (65-85% prípadov). **Chronická hepatitída C (CHC)** je definovaná ako závažné ochorenie pečene s perzistenciou vírusu HCV viac ako 6 mesiacov od začiatku akútneho ochorenia, kedy nedochádza k eliminácii vírusu, s možnými extrahepatálnymi prejavmi (Urbánek, 2014; Helcl, 1997). Jej klinický obraz je necharakteristický. Chronická CHC môže prebiehať roky asymptomaticky, prípadne sa môžu objavovať stavy únavy či dyspepsia. Zdá sa, že prognózu ochorenia ovplyvňujú faktory najmä zo strany hostiteľa, nie vírusu. Priebeh ochorenia ovplyvňuje trvanie infekcie HCV, mužské pohlavie, alkoholový abuzus, sprievodná steatóza a obezita, koinfekcia s HBV alebo HIV (Husa, 2005). Naopak je preukázané, že interleukín 28B (IL28B) resp. polymorfizmus tohto génu ovplyvňuje odpoveď na liečbu pegylovaným interferénom v kombinácii s ribavirinom (Suppiah, 2009). Ďalej sa uvádza, že priaznivé genové varianty inozín-trifosfatázy (ITPA) sú preventívnym faktorom proti ribavarinom indukovanej hemolytickej anémii u pacientov s CHC (Fellay et al., 2010).

### Diagnostické metódy

**Diagnóza** chronickej HCV infekcie je založená na pozitívnom dôkaze sérovej HCV RNA a anti-HCV protilátok v prítomnosti známk chronickej hepatitídy, tj. elevácie sérovej aktivity ALT alebo histologických známk chronickej hepatitídy (Helcl et al., 1997).

**Laboratórne diagnostické postupy** sa podľa hepatologických odporúčaní dajú vymedziť do troch kategórií: **a, sérologické b, molekulárne c, genetické vyšetrenie** (Urbánek, 2014).

U sérologického vyšetrenia sa detekujú **anti-HCV protilátky** po expozícii vírusom. Využívaná je metóda EIA, prípadne niektorá z jej variant.

Molekulárne genetické metódy, napríklad **technológia amplifikácie nukleových kyselín** (Nucleic Acid Amplification Technology „NATs“), dokážu rozpoznať v sére alebo tkanive infikovanej osoby vírusovú RNA. Najčastejšie sú založené na **polymerázovej reťazovej reakcii** (PCR). Za štandardný detekčný limit sa považuje citlivosť použitej techniky 15 IU/ml a menej. Súčasťou vyšetrenia by malo byť aj stanovenie genotypu a subtypu HCV. HCV genotypizácia je dôležitý faktor v stratifikácii liečby (Castera et al., 2005, Chevaliez et al., 2009). Nedávne úspechy pri vývoji inovatívnych molekulárnych technológií prinášajú potenciálny prísľub aj pre diagnostiku HCV. Na detekciu rôznych biomarkerov boli použité testy založené na **nanočasticiach**. Z nich najznámejšie sú „quantum dots, QD“, vyrobené z polovodičových materiálov, ktoré dokážu emitovať svetlo s rôznymi spektrami v závislosti od ich veľkosti. Ďalšou inovatívnou technológiou je využitie **aptamérov**, krátkych 3D jednovláknových oligonukleotidov, ktoré sú schopné rozoznávať targetové molekuly, či dokonca bunky.

## Prehľadové práce

V oblasti virológie sa často skloňuje využitie **DNA sekvenčných techník**, ktoré bývajú označované ako „next generation“ sekvenovanie (NGS) a dokážu poskytnúť množstvo aplikácií. Vo výskume či v diagnostike sa dajú použiť na detekciu celogenómovej variability, či skúmanie kvázidruhov, prípadne na monitoring rezistencie antivirových liečiv.

Genetické vyšetrenie infikovanej osoby so stanovením genotypu IL28B s nastupujúcim režimom vysoko účinných priamych antivirových liečiv DAA stratilo svoju prediktívnu hodnotu (EASL Recommendations of Hepatitis C, 2015).

## Terapia ochorenia CHC

**Cieľom terapie** je zabrániť progresii hepatálnych ako aj extrahepatálnych komplikácií infekcie, čo je podmienené eradikáciou infekcie. To je vyjadrené dosiahnutím trvalej virologickej odpovede (SVR, tabuľka č.1), kedy sa dosiahne zníženie počtu hepatálnych komplikácií. Za posledné desaťročie sa stala liekom voľby kombinácia **pegylovaného interferónu alfa (PEG-IFN) s ribavirinom (RBV)**. Táto liečba bola však problematická z dôvodu vedľajších nežiaducich účinkov. Pacienti s genotypmi 2, 3 a 6 mali lepšiu terapeutickú odpoveď ako pacienti infikovaní genotypmi 1, 4 a 5 (Antaki et al., 2010).

V roku 2011 sa v praxi začali využívať nové skupiny liečiv, ktoré sú charakterizované ako **priamo pôsobiace antivirových liečiv** (DAA, Directly Acting Antivirals). Ich mechanizmom účinku je priama inhibícia niektorého z enzýmov počas replikačného cyklu HCV (najčastejšie proteázy alebo RNA polymerázy). Prvú generáciu virostatík predstavujú liečivá **boceprevir** a **telaprevir**, ktoré sa používajú v kombinácii s pegylovaným interferónom a ribavirinom. Účinnosť danej trojkombinácie sa uvádza okolo 65-70% SVR, avšak nevýhodou sú nasledujúce obmedzenia: znížená compliance pacienta z dôvodu zvýšenej záťaže v podobe počtu tabliet, vedľajšie nežiaduce účinky lieku ako výrazky, svrbenie, kovová chuť v ústach a kontinuálne užívanie interferónu (Bacon et al., 2011; Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011; Zeuzem et al., 2011).

**Tabuľka č. 1** Definícia virologickej odpovede v priebehu HCV terapie a po jej skončení (Skladany et al., 2013)

Null response (NR)	Pokles HCV RNA v 12. týždni liečby o < 2log <sub>10</sub> proti pôvodným hodnotám.
Relaps	Znovuobjavenie sa sérovej HCV RNA po skončení terapie.
Breakthrough (fenomén prelomu)	Počas liečby, po dosiahnutí virologickej odpovedi, dôjde ku znovuobjaveniu sa sérovej HCV RNA.
Parciálna odpoveď	Vo 12. týždni liečby je HCV RNA detekovateľná, ale oproti pôvodným hodnotám je v 12. týždni pokles HCV RNA > 2log. V 24. týždni liečby je HCV RNA aj naďalej detekovateľná.
Virologická odpoveď na konci liečby (ETR)	Nedetekovateľná sérová HCV RNA metódou PCR s detekčným limitom < 15 IU/ml v okamžiku ukončení protívirusovej liečby.
Trvalá virologická odpoveď (SVR)	Negatívna sérová HCV RNA metódou PCR s detekčným limitom < 15 IU/ml v 12. týždni (SVR <sub>12</sub> ) po liečbe

## Prehľadové práce

V priebehu rokov 2013 až 2015 boli registrované ďalšie preparáty, predovšetkým *sofosbuvir*, *simeprevir*, *daclatasvir* alebo kombinácia *ombitasviru*, *ritonavirovom potencovaného paritapreviru a dasabuviru*. Vzájomné kombinácie týchto molekúl alebo ich kombinácie s ribavirínom bez pegylovaného interferónu sú označované ako tzv. „Interferon-free“ alebo bezinterferónové režimy. Ich výhodou je vysoká účinnosť. SVR pri liečbe kombináciou ombitasvir, paritaprevir/r s dasabuvirom s alebo bez ribavirínu v širokej populácii pacientov zahrňujúcej aj pacientov s kompenzovanou cirhózou dosahuje 97%. Bezinterferónové režimy umožňujú skrátiť dĺžku liečby na 12 týždňov, v niektorých skupinách pacientov pri liečbe kombináciou sofosbuvir a ledipasvir dokonca na 8 týždňov. Veľkou výhodou je dobrá znášanlivosť liečby a absencia nežiaducich účinkov spojených s liečbou interferónom, čím je liečba umožnená aj pacientom, ktorí liečbu interferónom netolerujú alebo je pre nich z rôznych dôvodov kontraindikovaná. Negatívami sú liekové interakcie a pomerne vysoká cena limitujúca použitie bezinterferónových režimov v mnohých krajinách len pre pacientov s vysokou potrebou liečby. Vzhľadom k prudkému vývoju a komplikovanej situácii s registráciou nových preparátov je v hepatologických odporúčaní vrátane EASL uvedených niekoľko racionálnych variantov liečby zohľadňujúcich podskupiny pacientov s HCV infekciou. (EASL, 2015)

**Tabuľka č.2: Odporúčané schémy pre liečbu chronickej hepatitídy C u pacientov s HCV monoinfekciou alebo HCV/ HIV koinfekciou bez cirhózy, vrátane pacientov doteraz neliečených alebo pacientov, ktorí zlyhali v liečbe PEG IFN $\alpha$  a ribavirínom (RBV).**

Liečba/Pacient	genotyp 1a/ 1B	genotyp 2	genotyp 3	genotyp 4	genotyp 5 a 6
PegIFN- $\alpha$ , RBV a sofosbuvir	12 týždňov	12 t	12 t	12 t	12 t
PegIFN- $\alpha$ , RBV a simeprevir	12 t*, 48t**	Nie	Nie	12 t*, 48t**	Nie
Sofosbuvir a RBV	Nie	12 t	24 t	Nie	Nie
Ritonavirom-potencovaný paritaprevir, ombitasvir a dasabuvir	12 t s RBV/ 12 t bez RBV	Nie	Nie	Nie	Nie
Ritonavirom potencovaný paritaprevir a ombitasvir	Nie	Nie	Nie	12 t s RBV	Nie
Sofosbuvir a daclatasvir	12 t bez RBV	12 t bez RBV	12 t bez RBV	12 t bez RBV	12 t bez RBV

## Prehľadové práce

**Tabuľka č.3: Odporúčané schémy pre liečbu chronickej hepatitídy C u pacientov s HCV monoinfekciou alebo HCV/ HIV koinfekciou s kompenzovanou cirhózou (Child-Pugh A), vrátane pacientov doteraz neliečených alebo pacientov, ktorí zlyhali v liečbe PEG IFN $\alpha$  a ribavirínom (RBV).**

Liečba/Pacient	genotyp 1a/ 1B	genotyp 2	genotyp 3	genotyp 4	genotyp 5 a 6
PegIFN- $\alpha$ , RBV a sofosbuvir	12 týždňov	12 t	12 t	12 t	12 t
PegIFN- $\alpha$ , RBV a simeprevir	12 t*, 48t**	Nie	Nie	12 t*, 48t**	Nie
Sofosbuvir a RBV	Nie	12-20 t	Nie	Nie	Nie
Ritonavirom-potencovaný paritaprevir, ombitasvir a dasabuvir	12 alebo 24 s RBV	Nie	Nie	Nie	Nie
Ritonavirom potencovaný paritaprevir a ombitasvir	Nie	Nie	Nie	24 t s RBV	Nie
Sofosbuvir a daclatasvir	12 t s RBV alebo 24 t bez RBV	Nie	Nie	12 t s RBV alebo 24 t bez RBV	Nie

(\*Pacienti s HCV genotypu 1 alebo 4, bez ohľadu na predchádzajúcu liečbu. Liečba simeprevirom sa musí začať v kombinácii s peginterferónom alfa a ribavirínom a musí sa podávať 12 týždňov, potom má nasledovať ďalších 12 týždňov liečby peginterferónom alfa a ribavirínom.)

\*\*Pacienti s HCV genotypu 1 alebo 4, ktorí v minulosti nereagovali na liečbu (vrátane čiastočných a nulových respondentov). Liečba simeprevirom sa musí začať v kombinácii s peginterferónom alfa a ribavirínom a musí sa podávať 12 týždňov, potom má nasledovať ďalších 36 týždňov liečby peginterferónom alfa a ribavirínom.)

Jednou z nedostatočne zodpovedaných otázok spojenou s bezinterferónovými režimami je absencia liečebných stratégií pre pacientov, ktorí nedosiahnu odpoveď na túto liečbu (EASL, 2015). Z dôvodu vysokého mutačného potenciálu vírusu hepatitídy C dochádza ku generovaniu tzv. s rezistenciou spojených variant (RAV – resistance associated variants) vírusu, ktoré vďaka mutáciám v exónoch kódujúcich kľúčové ciele liečby, vírusovú RNA polymerázu NS5B, multipotentný proteín NS5A a vírusovú proteázu a helikázu NS3/4A, strácajú senzitivitu na priamo pôsobiace antivirotiká. Varianty rezistentné voči NS3/4A nie sú natoľko vitálne a v priebehu 48 týždňov od pôsobenia selekčného tlaku prostredia miznú. NS5A a NS5B rezistentné varianty pretrvávajú dlhodobo. Jednou z možností by mohlo byť zavedenie testovania RAV po zlyhaní bezinterferónovej liečby aj do klinickej praxe, čo by umožnilo následne vybrať režim, na ktorý je daný mutant HCV citlivý (Krishnan et al., 2015).

### Záver

Preferujúcim trendom pri terapii HCV sa stal tzv. bezinterferónový režim (ideálne aj režim bez ribavirinu). Táto liečba však predstavuje ekonomicky najnáročnejšiu variantu a aj napriek tomu, že ide o preukázateľne bezpečnejšie a účinnejšie metódy terapie, stále majú svoje postavenie aj staršie liečebné varianty (Urbánek, 2014). Tento stav si vyžaduje diskusiu medzi odborníkmi a nájdenie riešenia tejto zložitej situácie. Limitujúcim faktorom úspešnej terapie sa teda stáva exponenciálny nárast antivirových, ich etablovanie do praxe, dostupnosť daných preparátov na trhu a v neposlednom rade predovšetkým správne indikovanie liečby, čo priamo závisí od **správnej diagnostiky pacienta**. Včasná diagnostika ochorenia a správna liečba má rozhodujúci vplyv na osud pacienta. Avšak práve v tejto oblasti ostávajú rezervy, ktoré sú príčinou poddiagnostikovania a tým aj neadekvátnej starostlivosti o pacienta.

### Použitá literatúra:

1. ANTAKI, N. et al. (2010) The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6: an international consensus report. *Liver Int.* 30:342–355.
2. BUNCHORNTAVAKUL, C., CHAVALITDHAMRONG, D., TANWANDEE, T. (2013) Hepatitis C genotype 6: A concise review and response-guided therapy proposal. *World J Hepatol.* 5: 496-504.
3. CASTERA, L. et al. (2005) Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 128:343–350.
4. FELLAY, J. et al. (2010) ITPA gene variants protect against anemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature.* 464: 40540–40548
5. JACOBSON, I.M. et al. (2011) Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 364:2405–2416
6. HELCL, J. et al. (1997) Chronické hepatitidy v ordinaci praktického lékaře. Praha Maxdorf; 63 s.
7. HORÁK, J., STRÍTESKÝ, J. (1992) Chronické hepatitidy. 1. vyd. Praha: Grada Publishing; 192. ISBN 80-7169-775-3.
8. HUSA, P. (2005) Virové hepatitidy. 1. vyd. Praha: Galén; 247 s. ISBN 80-7262-304-4.
9. CHEVALIEZ, S., BOUVIER-ALIAS, M., BRILLET, R., PAWLOTSKY, J.M. (2009) Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLoS One* ;4:e8209
10. KREKULOVÁ, L., ŘEHÁK, V. (2002) Virové hepatitidy - prevence, diagnostika a léčba. 2. vyd. Praha: Triton; 167 s.
11. KRISHNAN, P. et al. (2015) Long-term follow-up of treatment-emergent resistance-associated variants in NS3, NS5A and NS5B with paritaprevir/r-, ombitasvir- and dasabuvir-based regimens. *J Hepatol.* 62:S220
12. MANOS, M.M. et al. (2012) Distribution of hepatitis C virus genotypes in a diverse US integrated health care population. *J Med Virol.* 84: 1744-1750.
13. MARINHO, R.T., BARREIRA, D.P. (2013) Hepatitis C, stigma and cure. *World J Gastroenterol.* 19: 6703-6709.
14. SKLADANÝ Ľ, OLTMAN M, JARČUŠKA P. (2013) Diagnostika a liečba hepatitídy c dvojkombináciou – 2K. Štandardný diagnostický a terapeutický postup. 16(4-6).



15. STRADER, D.B., WRIGHT, T., THOMAS, D.L. et al. (2004) Diagnosis, Management, and treatment of hepatitis C. AASLD Practice Guideline, *Hepatology*. 39(4): 1147–1171
16. SMITH, D.B et al. (2014) Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology*. 59:318-327.
17. SUPPIAH, V. et al. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 41:1100–1104.
18. TAN, S.L. (2006) Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology, Norfolk (UK): <http://www.horizonpress.com/backlist/horizonbioscience/>
19. URBÁNEK, P. (2014) Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). [www.ces-hep.cz](http://www.ces-hep.cz); [www.infekce.cz](http://www.infekce.cz)
20. URBÁNEK, P. (2004) Infekce virem hepatitidy C. 1. vyd. Praha: Galén. 221 s.
21. WHO (2014) [Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection](http://www.who.int/publications/i/item/9789241548532)
22. ZEUZEM, S et al. (2011) Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med.* 364:2417–2428.
23. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. (1998) *MMWR Recomm Rep.* 47 (RR-19): 1-39
24. European Association for the Study of the Liver. (2015) EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol.* 63(1):199-236

## **Zápisnica**

### **zo zasadnutia Výboru SSKM SLS zo dňa 25. novembra 2015 v miestnosti B126 Ústavu mikrobiológie SZÚ Bratislava**

Prítomní: MUDr. R. Botek, MUDr. M. Czirfuszová, MUDr. J. Hanzen, RNDr. D. Lacková, PhD., doc. MUDr. M. Nikš, CSc., MUDr. A. Purgelová, RNDr. L. Slobodníková, PhD., doc. RNDr. D. Staneková, CSc.

Ospravedlnení: prof. MUDr. A. Líšková, PhD., doc. RNDr. F. Ondriska, PhD.

Prizvaní: doc. MUDr. S. Bazovská, CSc., RNDr. Ľ. Perďochová

#### Program:

1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadania
2. Členská základňa a aktuálny zoznam členov SSKM SLS
3. Návrh ocenení v roku 2016
4. Časopis Správy klinickej mikrobiológie
5. Informácia o konferencii XIII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dni
6. Návrh odborných podujatí 2016
7. Rôzne

#### 1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadnutia:

Uznesenie 01-06-15 splnené

Uznesenie 02-06-15 splnené

Uznesenie 03-06-15 splnené

Uznesenie 04-06-15 splnené

(Návrh „Dohoda o vykonaní práce“ bol pripravený doc. D. Stanekovou a schválený výborom SSKM SLS, sekretariát SLS vystaví „Dohodu“ na mesiac december 2015 )

Uznesenie 05-06-15 splnené

Uznesenie 06-06-15 splnené

Uznesenie 07-06-15 plní sa

Uznesenie 08-06-15 splnené

Uznesenie 09-06-15 nesplnené

(zmenil sa termín konania Prowazekových dní z októbra 2015 na marec 2016, z tohto dôvodu sa termín jesenného zasadnutia výboru posunul na 25. novembra 2015)

#### 2. Členská základňa a aktuálny zoznam členov SSKM SLS:

Dr. Lacková informovala výbor o aktuálnom zozname členov SSKM SLS. Členská základňa odbornej spoločnosti zostáva stabilná a počet jej členov sa v posledných rokoch významne nemení. V roku 2015 bol celkový počet členov 234, ich aktuálny zoznam aj s emailovými adresami je dostupný na webovej stránke SSKM SLS: [www.sskm.tym.sk](http://www.sskm.tym.sk). V prípade akýchkoľvek zmien v údajoch členov odporúčame kontaktovať okrem SLS aj vedeckého tajomníka SSKM SLS, adresa [lackova@hpl.sk](mailto:lackova@hpl.sk).

## Zo zasadnutia výboru

---

### 3. Návrh ocenení v roku 2016:

Vedecký tajomník SSKM SLS pripraví zoznam jubilantov z členov SSKM SLS, ktorí dosiahnu v nasledujúcom kalendárnom roku 2016 okrúhle životné jubileum. Pripravený zoznam v elektronickej forme pošle všetkým členom výboru SSKM SLS, ktorí následne podajú svoj návrh na ocenených. Malo by ísť o členov SSKM SLS, ktorí významne prispeli k daniu v spoločnosti ako aj zvyšujú kvalitu odboru klinická mikrobiológia. Návrhy ocenených osôb aj s odôvodnením svojho výboru odošlú členovia výboru vedeckému tajomníkovi SSKM SLS.

### Uznesenie 01-11-15:

Členovia výboru SSKM SLS pripravia svoje návrhy na ocenenia členov SKKM SLS za rok 2016 a zašlú vedeckému tajomníkovi spoločnosti.

**Termín: 15. december 2015**

### 4. Časopis Správy klinickej mikrobiológie:

Na zasadnutí výboru predseda redakčnej rady SKM doc. MUDr. M. Nikš nastolil otázku budúcnosti a perspektívy vydávania časopisu, pričom zazneli 2 návrhy: 1. vzhľadom na iné možnosti získavania odborných informácií (napr. internet) a pri absencii kvalitného obsahového materiálu je možné ukončiť existenciu časopisu alebo 2. časopis by pokračoval vo svojej existencii, bol by vydávaný 2x ročne na webovej stránke spoločnosti a mal by zachovaný odborný aj informačný charakter. Jednotlivé čísla by boli vopred plánované a zostavované pomocou hosťujúcich editorov. Členovia výboru sa vyjadrili jednoznačne za zachovanie časopisu s tým, že sa k návrhu 2 doc. Nikša musí najskôr vyjadriť redakčná rada časopisu.

### Uznesenie 02-11-15:

O budúcnosti odborného časopisu Správy klinickej mikrobiológie sa rozhodne na najbližšom zasadnutí výboru SSKM SLS s prihliadnutím na názor redakčnej rady časopisu.

**Termín: najbližšie zasadnutie výboru**

### 5. Informácia o konferencií XIII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dni:

XIII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dni prebehli v dňoch 1. – 3. júna 2015 v hoteli Átrium v Novom Smokovci. Na konferencií sa zišli okrem odborníkov zo Slovenska aj kolegovia z Českej republiky, pričom program bol bohatý po odbornej aj spoločenskej stránke. Výbor pozitívne zhodnotil odborný aj organizačný priebeh XXIII. Moravsko-slovenských odborných dní.

### 6. Návrh odborných podujatí 2016:

V termíne 14. – 15. marca 2016 je pripravené podujatie XIV. Prowazekove dni, ktoré sa uskutočnia vo Wellness hoteli Patince. MUDr. Czirfuszová ako členka organizačného výboru konferencie informovala členov výboru o odbornom programe, program je pripravený a príprava podujatia prebieha podľa stanoveného harmonogramu. MUDr. Botek tlmočil návrh MUDr. Jelínkovej z Prahy, ktorá chce predniesť na podujatí príspevok venovaný osobe Stanislava Prowazeka. Výbor predložený návrh MUDr. Boteka jednomyselne schválil. Výbor prijal informáciu, že podujatie je predbežne zabezpečené po odbornej aj finančnej stránke a bude sa realizovať prostredníctvom spoločnosti Lekár a.s.

### Uznesenie 03-11-15:

Výbor v korešpondenčnej diskusii zvolil MUDr. E. Mitrovú, ktorá bude v marci 2016 počas podujatia Prowazekove dni v Patinciach ocenená Prowázkovou medailou.

**Termín: marec 2016**

## Zo zasadnutia výboru

---

### 7. Rôzne:

a. Výbor SSKM SLS prerokoval žiadosť SEVS o podporu „stanoviska ku prípadu vyšetrovania príčin vzniku ochorenia na botulizmus v auguste 2015 v Banskej Bystrici“. Doc. MUDr. M. Nikš na základe doručených korešpondenčných stanovísk členov výboru odoslal v mene výboru SSKM SLS stanovisko, v ktorom výbor podporuje názor a postup kolegov epidemiológov s tým, že postupovali v zmysle platnej legislatívy a ich postup bol správny. Výbor zobral na vedomie, že stanovisko v takomto znení bolo odoslané v novembri 2015 doc. MUDr. Z. Krištúfkovej, PhD.

V tejto súvislosti sa MUDr. Hanzen ponúkol osloviť po jednaní so štátnym tajomníkom MZ SR hlavného hygienika SR so žiadosťou o vypracovanie oficiálneho postupu, akým treba riešiť diagnostiku botulizmu a podobných raritných infekčných ochorení na Slovensku, prípadne o ustanovenie kompetentnej osoby na Úrade verejného zdravotníctva SR, ktorá by bola v trvalom kontakte s odbornými pracoviskami v Európe zaoberajúcimi sa diagnostikou takýchto ochorení.

#### Uznesenie 04-11-15:

MUDr. Hanzen po konzultácii na MZ SR osloví v mene SSKM SLS hlavného hygienika SR so žiadosťou o doriešenie diagnostiky botulizmu a podobných raritných infekčných ochorení na Slovensku.

#### **Termín: najbližšie zasadnutie výboru**

b. RNDr. Slobodníková L., PhD. pripravila materiály k pregraduálnej výuke v odbore klinická a technická mikrobiológia, ktorých obsahom je sústava odborov vedy a techniky a číselník odborov vedy a techniky. Výbor prijal predkladané materiály a prejednal otázky o kvalite a zameraní pregraduálnej výchovy, ktoré podmieňujú atraktivitu odboru lekárskej mikrobiológie na lekárske fakultách v SR.

c. MUDr. Hanzen J. oznámil členom výboru, že na jarnom zasadnutí výboru chce abdikovať z funkcie člena výboru. Vedecký tajomník spoločnosti by mal na základe posledných volieb do výboru SSKM SLS pozvať náhradníka (náhradníkov), ktorí dostali najväčší počet hlasovacích lístkov na jarné zasadnutie výboru SSKM SLS.

#### Uznesenie 05-11-15:

Vedecký tajomník korešpondenčne informuje členov výboru, ktorí členovia spoločnosti boli určení ako náhradníci vzhľadom na počet získaných hlasovacích lístkov. Náhradníka s najvyšším počtom hlasov osloví a po jeho súhlase ho pozve na nasledujúce zasadnutie výboru.

#### **Termín: december 2015**

- dátum nasledujúceho zasadnutia výboru SSKM SLS bude v termíne 14. - 15. marec 2016 počas XIV. Prowazekových dní v Patinciach

Zapísala: RNDr. Daniela Lacková, PhD.  
vedecká tajomníčka SSKM SLS

Overila: MUDr. Anna Purgelová  
člen výboru SSKM SLS

Doc. MUDr. Milan Nikš, CSc.  
predseda SSKM SLS

v Leviciach, dňa 30. 11. 2015

## **Pokyny pre autorov:**

Správy klinickej mikrobiológie uverejňujú pôvodné práce, prehľadové články, metodické postupy, diskusné príspevky a pod. so zameraním na problematiku lekárskej a klinickej mikrobiológie. Všetky práce sú recenzované oponentom.

Príspevok píšete v elektronickej forme a zasielajte do redakcie e-mailom. Píšete v slovenskom, českom, alebo anglickom jazyku. Pôvodné práce a prehľadové články by nemali presahovať rozsah najviac pätnásť normovaných strán formátu A4 (typ písma **Times New Roman**, veľkosť **12, 45 riadkov**). Rukopis môže obsahovať fotografie, prehľadné grafy a obrázky v čiernobielym a aj vo farebnom prevedení. Príspevky majú mať obvyklú štruktúru (súhrn, úvod, materiál a metódy, výsledky, diskusia, závery a zoznam použitej literatúry). Citácie musia spĺňať požiadavky CSN 010197. Texty majú byť písané jasne, stručne, štylisticky aj jazykovo správne. Cudzíe slová musia byť uvádzané v zhode so slovníkom cudzích slov. Za jazykovú úpravu textu zodpovedá autor. V nadpise autor uvedie plný názov pracoviska, z ktorého práca pochádza. Ak má práca viacerých autorov z viacerých pracovísk, uvedú sa všetci autori a všetky pracoviská. Pokiaľ pri pôvodných prácach vedúci pracoviska nie je autorom, ani spoluautorom práce, redakcia môže vyžiadať jeho súhlas s uverejnením textu (imprimatur).

Príspevky posielajte na adresu predsedu redakčnej rady alebo technického redaktora v jednom výtlačku výlučne v elektronickej forme. Uvedte telefonický a e-mailový kontakt na toho z autorov, kto bude komunikovať s redakciou. Všetky uverejnené príspevky sú nehonorované.

## SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

Vydávajú :

Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej spoločnosti a  
Sekcia klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej komory

ako informačný bulletin pre svojich členov.

Redakčná rada :

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava

[bojnansky@hpl.sk](mailto:bojnansky@hpl.sk)

RNDr. V. Boldiš, PhD.

[boldiš@hpl.sk](mailto:boldiš@hpl.sk)

MUDr. Juraj Hanzen , Bratislava

[hanzen@hpl.sk](mailto:hanzen@hpl.sk)

prof. MVDr. V. Kmeť, DrSc., Košice

[kmetv@saske.sk](mailto:kmetv@saske.sk),

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava

[niks.m@gmx.at](mailto:niks.m@gmx.at)

RNDr. L. Slobodníková, CSc., Bratislava

[livia.slobodnikova@fmed.uniba.sk](mailto:livia.slobodnikova@fmed.uniba.sk)

Doc. RNDr. Danica Staneková, CSc., Bratislava

[danica.stanekova@szu.sk](mailto:danica.stanekova@szu.sk)

MUDr. V. Takáčová, Košice

[viktoria.takacova@unlp.sk](mailto:viktoria.takacova@unlp.sk)

Čestný člen:

MUDr. Anna Petrovičová, CSc., Bratislava

[anna.petrovicova@szu.sk](mailto:anna.petrovicova@szu.sk)

Vedúci redaktor :

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava

Technický redaktor:

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava

Adresa redakcie :

Ústav mikrobiológie SZU,

Limbová 12, 833 03 Bratislava