

2. konference Centra klinických laboratoří

Hana Bílková Fránková

Oddělení parazitologie a lékařské zoologie



13. 10. 2011 proběhla v Seminárním centru Akademie Ostrava v letošním roce již 2. konference Centra klinických laboratoří ZÚ v Ostravě, tentokrát na téma – Problematika bakteriální rezistence. Jako již tradičně byl o konferenci nebývalý zájem, což potvrzuje 200 zaregistrovaných účastníků.

Konferenci jsme mohli tentokrát zahájit slavnostně, předáním Medaile České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně nestorovi české epidemiologie - MUDr. Vladimíru Plesníkovi. Předání se ujali naši význační hosté – MUDr. Helena Šebáková, ředitelka Krajské hygienické stanice Moravskoslezského kraje a Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., děkan Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V odborné části programu se mohli nejprve účastníci konference v přednášce Prof. MUDr. Milana Koláře, Ph.D. seznámit v obecné i konkrétní rovině s jeho bohatými zkušenostmi z oblasti bakteriální rezistence v klinické praxi či zajímavými kazuistikami z Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava Poruba – Streptokokové infekce – klinický obraz a léčba, Erysipel pendlující břišní stěny - kazuistika a Toxická spála – diferenciální diagnostika ke Kawasakiho syndromu, v příspěvcích MUDr. Petra Širůčka. Poté se již slova ujali pracovníci CKL ZÚ, aby se podělili o výsledky své práce. Jejich sdělení jsou obsahem tohoto čísla Zpravodaje.

Děkujeme za Váš zájem a dovolu, abychom Vám přislíbili, že další konference proběhne na začátku roku 2012, tentokrát se zaměřením na kongenitální infekce. Všechny Vás na ni srdečně zveme.

*Mgr. Hana Bílková Fránková,
vedoucí Centra klinických laboratoří ZÚ Ostrava*

Antibiotické středisko – historie a současnost

Eva Chmelařová
Oddělení bakteriologie a mykologie

Antibiotická střediska (AS) vznikla z původních penicilinových stanic. V bývalém Československu začala AS vznikat v roce 1979 a od tohoto roku do dnešních dní je Česká republika protkána sítí více jak 60 AS, která jsou většinou ustavena u okresních, krajských, fakultních eventuelně soukromých nemocnic.

strana 3

Aktuálně o problematice *Clostridium difficile*

Tereza Škapová
Oddělení bakteriologie a mykologie

Poprvé bylo *Clostridium difficile* izolováno ze střeva novorozence v roce 1935 Hallem a O' Toolem. Vědci tenkrát nazvali nově objevenou bakterii *Bacillus difficilis*, což mělo odrážet problémy, se kterými se setkali při její izolaci. V roce 1978 bylo *C. difficile* popsáno jako původce kolitidy spojené s užíváním antibiotik. V následujících letech pak byla problematika podrobně studována – byly vyvinuty první testy na toxicitu *C. difficile*, byly definovány rizikové faktory pro vznik *C. difficile* kolitidy a rovněž byla stanovena léčba kolitid.

strana 5

Aktuální rezistence vybraných respiračních patogenů na antibiotika

Alena Lautnerová, Kateřina Matějová
Oddělení bakteriologie a mykologie, Oddělení MB technologie

Respirační nákazy stále figurují jako jedna z nejčastějších příčin nemocnosti. Stejně tak neustále platí, že největší podíl mají respirační infekce virové etiologie, kde preskripce antibiotik není na místě. Rozhodování o užití antibiotika není jednoduchý proces, hraje zde roli klinický stav pacienta, zkušenosti lékaře, nezastupitelné místo má vyšetření zánětlivých parametrů, především CRP.

strana 4

Současné trendy v taxonomii bakterií

Eva Krejčí
Oddělení bakteriologie a mykologie

Taxonomie bakterií (přesněji prokaryot) si klade za cíl bakterie charakterizovat a určitým způsobem zařadit do taxonomických jednotek na základě průkazu jejich vlastností a vzájemného příbuzenského vztahu. Obecně se taxonomie skládá ze tří oddělených a současně navzájem propojených oblastí: klasifikace, nomenklatury a identifikace. Ve stručnosti lze říci, že klasifikace je uspořádávání organismů do skupin na základě podobnosti a příbuznosti. Nomenklatura potom znamená přiřazování jmen těmto taxonomickým skupinám na základě mezinárodních pravidel.

strana 7



1. KLÍČOVÉ INFORMACE PRO PŘEDEPISUJÍCÍ LÉKAŘE V PRIMÁRNÍ PÉČI

a) Narůstající antibiotická rezistence ohrožuje účinnost antibiotik nyní i v budoucnu

- Rezistence vůči antibiotikům je stále závažnějším problémem zdraví veřejnosti v Evropě.
- Zatímco počet infekcí způsobených rezistentními bakteriemi stále narůstá, zavedení nových antibiotik není nadějně, což jsou bezúspěšné vyhlídky, pokud jde o dostupnost účinné antibiotické léčby v budoucnosti.

b) Narůstající výskyt bakterií rezistentních k antibiotikům by se měl u pacientů v primární péči omezit podporou limitovaného a vhodného používání antibiotik

- Expozice antibiotikům je spojena s nebezpečím vzniku rezistence. Na rezistenci má vliv celková úroveň používání antibiotik v populaci, stejně jako způsob, jakým jsou užívána.
- Zkušenosti z některých evropských zemí ukazují, že snížení preskripce antibiotiku ambulantních pacientů vede ke snížení výskytu rezistence.
- V rámci primární péče je předepisováno 80% až 90% všech antibiotik, a to zejména pro infekce dýchacího ústrojí.
- Existují důkazy, že v mnoha případech infekcí dýchacích cest nejsou antibiotika nezbytná a že imunitní systém pacienta zcela dostačuje k boji s jednoduchými infekcemi.
- U pacientů s určitými rizikovými faktory, jako jsou například závažné exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN) se zvýšenou produkcí sputa je předepsání antibiotika nutné.
- Zbytečné předepisování antibiotik v oblasti primární péče je komplexní jev, ale souvisí zejména s faktory jako je chybná interpretace příznaků, diagnostická nejistota a splnění očekávání pacienta.

c) Klíčová je komunikace s pacienty

- Studie ukazují, že spokojenost pacienta v zařízení primární péče závisí více na efektivní komunikaci než na tom, zda dostane předpis na antibiotika, a že předepisování antibiotik na infekce horních cest dýchacích snižuje počet následných návštěv v ordinaci.
- Odborné rady lékaře ovlivňují vnímání pacientů, jejich postoj k vlastní nemoci a pochopení potřeby antibiotik, zejména dostane-li se jim rady, co mohou očekávat v dalším průběhu nemoci, včetně realistického času potřebného pro uzdravení a postupu samoléčby.
- Předepisující lékaři v primární péči si nemusí vymezovat více času na návštěvy, během nichž nabízejí alternativy k předepisování antibiotik. Studie ukazují, že to lze zvládnout za průměrně stejnou dobu návštěvy, a přesto je zachována vysoká míra spokojenosti pacienta.



Bližší informace viz.

<http://ecdc.europa.eu/cs/eaad/antibiotics/Pages/messagesForPrescribers.aspx>

Historie

Antibiotická střediska (AS) vznikla z původních penicilinových stanic. V bývalém Československu začala AS vznikat v roce 1979 a od tohoto roku do dnešních dní je Česká republika protkána sítí více jak 60 AS, která jsou většinou ustavena u okresních, krajských, fakultních eventuelně soukromých nemocnic. Základní náplň práce AS se mění jen málo.

- Stanovení citlivosti
- Konzultace antibiotické terapie
- Potvrzení indikace „rezervních“ (vázaných) antibiotik
- Sledování rezistence mikroorganismů k antibakteriálním látkám

V roce 1979 vzniklo AS také na mikrobiologickém odboru Krajské hygienické stanice v Ostravě. O založení AS se zasloužila jeho první vedoucí – RNDr. Pavla Urbášková. Doktorka Urbášková se od samého začátku snažila o zavedení těch nejnovějších metod stanovení citlivosti k antibiotikům. Ostravské pracoviště patřilo mezi první, které začalo stanovovat MIC - minimální inhibiční koncentraci antibiotika. Vždy bylo vybaveno nejnovějšími přístroji, které umožnily plnění vlastních destiček s antibiotiky. Stanovení MIC patří dodnes k základním pilířům testování citlivosti hlavně pro nemocniční jednotky intenzivní péče (JIP). V roce 1987 odešla Dr. Urbášková do Prahy na SZÚ a stala se vedoucí Národní referenční laboratoře pro antibiotika. Pod jejím vedením se později vytvořila skupina pro monitorování rezistence, která pracuje dodnes.

Novou vedoucí AS v Ostravě se stala RNDr. Věra Toršová, která vedla středisko do roku 2002. V devadesátých letech se významně podílela na zavedení nových antibiotik do klinické praxe, tak jak jednotlivé preparáty přicházely na náš trh. AS se pravidelně začalo zúčastňovat studií pod vedením NRL pro antibiotika SZÚ, které sledovaly rezistenci u vybraných skupin mikroorganismů. Probíhala řada seminářů a přednášek o indikacích a dávkování nových preparátů nejen v ambulantní ale i nemocniční praxi. Přednášky Dr. Toršové byly na mimořádné odborné i profesní úrovni a posluchači si vždy odnášeli řadu nových informací. Stala se v regionu i na celostátní úrovni významnou odbornou osobností. Pracoviště se zapojilo i do mezinárodních studií sledování rezistence a podílelo se dalších studiích probíhajících ve FN Ostrava. Došlo také k výraznému navýšení konzultační činnosti pro ambulantní i nemocniční praxi. Mikrobiologický odbor včetně AS byl vždy vybaven nejmodernějšími diagnostiky a přístroji, které umožňují správnou identifikaci patogenního agens a stanovení citlivosti k atb a jeho odborní pracovníci byli vždy na vysoké profesionální úrovni.



ATB středisko ZÚ Ostrava zleva: Mgr. Kateřina Matějová, RNDr. Eva Chmelařová, MUDr. Alena Seidlerová, MUDr. Alena Lautnerová, RNDr. Jana Niemczyková, Mgr. Daniela Stuchlíková

AS se od jiných AS v České republice liší hlavně regionem, ve kterém poskytuje svoje služby. Bylo tomu tak od samého začátku. Vždy byly konzultace atb terapie poskytovány nejen na základě vyšetření klinického materiálu na bakteriologickém oddělení KHS nebo nyní ZÚ. Samozřejmě, že lépe se poskytují informace na základě nahlédnutí do vlastních výsledků kultivace v laboratorním informačním systému. Pracovnice AS se však vždy snažily a dosud snaží poskytnout lékaři informaci i v případě, že vyšetření provedla jiná laboratoř. Mnohdy je to malý problém, protože výsledky jednotlivých laboratoří nejsou vždy srovnatelné a návrh terapie je na základě odborných znalostí a dlouhodobých zkušeností.

Pracovní náplň AS se po roce 1989 rozšířila o spolupráci s nemocničním hygienikem (epidemiologem) pokud takový úsek v nemocnici existuje. Rezistence mikroorganismů k antibiotikům v posledních letech výrazně stoupá a zabránit šíření rezistentních kmenů je nutnost. V současné době je v tomto směru velmi úzká spolupráce s FN Ostrava.

Rezistence k antibiotikům

Sledování rezistence vybraných patogenů patří k pravidelné činnosti AS.

V současné době je pozornost soustředěna především na rezistentní kmeny v nemocnicích, ale také v komunitě dochází k zvyšování rezistence hlavně u močových infekcí. Pod vedením NRL pro antibiotika probíhají pravidelné celostátní studie sledování rezistence u vybraných respiračních patogenů a kmenů *E.coli* izolovaných z močových infekcí v ambulantní praxi. U izolátů *E.coli* z močových cest jsou nové výsledky z roku 2010 z České republiky a ostravského regionu velmi stručně porovnány v tabulce č.1. Zvýšení rezistence k ampicilinu proti roku 2010 není významné, protože v literatuře se popisuje zhruba 50 % rezistence *E.coli* k ampicilinu. V léčbě močových infekcí je hodně využíván kotrimoxazol a celostátní údaje ukazují zvýšení rezistence na 24 %, což

znamená, že u čtvrtiny pacientů může dojít k selhání léčby. Největší problém je ale dvojnásobné zvýšení rezistence k chinolonům (ciprofloxacin, pefloxacin, norfloxacin, ofloxacin). Tyto preparáty by v ambulantní praxi měly být užívány pouze na základě vyšetření citlivosti a podávány jen v případě, že nelze vybrat ampicilin event. v kombinaci s inhibitorem (alergie) nebo nesnášenlivosti u cotrimoxazolu.

Tab.1: Rezistence *E.coli* v %

Rok	Ampicilin		Cotimoxazol		Chinolony	
	ČR	OV	ČR	OV	ČR	OV
2005	36	55	17	13	6	6
2010	43	47	24	26	12	13

V nemocničním prostředí je situace samozřejmě závažnější. Díky důslednému dodržování izolačních a desinfekčních režimů se podařilo zabránit šíření kmenů *S.aureus* MRSA.

Velký problém ale působí kmeny *K.pneumoniae* s produkcí širokospektré betalaktamázy –ESBL. Tyto kmeny v současné době tvoří téměř polovinu izolátů. V léčbě jsou vyřazena všechna betalaktamová antibiotika a citlivost je zatím zachována u karbapenemů. Tato nepříznivá situace není jen v nemocnicích našeho regionu, ale stejné problémy jsou ve všech fakultních nemocnicích a řadě i menších nemocnic v ČR. Pro léčbu těchto infekcí se velmi často užívají karbapenemy a selekční tlak zvyšuje možnost záchytu kmenů s rezistencí k těmto preparátům, tak jak už se to děje v okolních zemích. Ve spádové oblasti bakteriologického oddělení ZÚ v Ostravě zatím kmeny klebsií s rezistencí ke karbapenemům izolovány nebyly.

Současnost

V roce 2008 po reorganizaci ZÚ Ostrava se AS stalo součástí oddělení bakteriologie CKL (Centrum klinických laboratoří) stejně jako i laboratoře bakteriologie v Havířově a Bruntále. Obě pracoviště provádí kultivační vyšetření infekčního materiálu včetně stanovení citlivosti k atb. V Bruntále poskytuje konzultační činnost pro lékaře v ambulancích MUDr. Alena Seidlerová, laboratoř v Havířově se soustřeďuje na stanovení citlivosti a interpretaci mikrobiologického nálezu (RNDr. Jana Fránková, RNDr. Jana Niemczykova a Mgr. Daniela Stuchlíková). V současné době poskytuje konzultační služby na AS v Ostravě tým ve složení RNDr. Eva Chmelařová, MUDr. Alena Lautnerová a Mgr. Kateřina Matějová. Konzultační služby jsou poskytovány nejen přímo pro ambulantní a nemocniční zařízení na území města Ostravy, ale také pro nemocnice a ambulance v širším regionu (Karviná, Havířov, Orlová, Vsetín, Valašské Meziříčí a další). Do týmu patří také MUDr. Linda Stryjová, která je v současné době na mateřské dovolené.

Konzultační činnost kromě odborných znalostí a zkušeností vyžaduje dlouhodobé kontakty s ošetřujícími lékaři a spolupráci a důvěru na obou stranách telefonní linky. Pracovnice AS se snaží vždy konzultujícím lékařům z terénu i z nemocnice vyjít maximálně vstříc a odpovědět jim na všechny jejich otázky. Nesmírně si vážíme této velmi úzké spolupráce a i v dalších letech se budeme snažit tuto praxi zachovat. U všech konzultací atb terapie není možné použít „medicínu založenou na důkazech“. U nejtěžších konzultací se musí často experimentovat a je snaha „ušít“ atb terapii pacientovi „na míru“. To vyžaduje odborné znalosti, dlouhodobé zkušenosti, zodpovědnost a často i osobní odvalu.

Ještě jednou Vám všem děkujeme za dlouholetou spolupráci a důvěru a těšíme na další konzultace antibiotické léčby vašich pacientů.

Za všechny pracovnice AS

RNDr. Eva Chmelařová

Kontakty

Antibiotické středisko ZÚ Ostrava

RNDr. Eva Chmelařová

Tel.: 596 200 315, 317, 320, 413; Mobil: 603 535 751

MUDr. Alena Lautnerová

Tel.: 596 200 315, 317, 320; Mobil: 731 749 345

Mgr. Kateřina Matějová

Tel.: 596 200 315, 260

Laboratoř bakteriologie Havířov:

RNDr. Jana Fránková Tel.: 596 491 680

RNDr. Jana Niemczykova Tel.: 596 491 676, 675

Mgr. Daniela Stuchlíková Tel.: 596 491 244

Laboratoř bakteriologie Bruntál:

MUDr. Alena Seidlerová Tel.: 554 774 155

Aktuální rezistence vybraných respiračních patogenů na ATB

Alena Lautnerová, Kateřina Matějová

Oddělení bakteriologie a mykologie, Oddělení MB technologie

Respirační nákazy stále figurují jako jedna z nejčastějších příčin nemocnosti. Stejně tak neustále platí, že největší podíl mají respirační infekce virové etiologie, kde preskripce antibiotik není na místě. Rozhodování o užití antibiotik není jednoduchý proces, hraje zde roli klinický stav pacienta, zkušenosti lékaře, nezastupitelné místo má vyšetření zánětlivých parametrů, především CRP. Neměli bychom také zapomínat na odběr biologického materiálu k mikrobiologickému vyšetření včetně stanovení citlivosti na antibiotika a kde je to možné, preferovat cílenou léčbu.

Mezi nejčastější původce bakteriálních respiračních onemocnění řadíme: *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, dále *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, za zmínku také stojí *Moraxella catarrhalis*.

Rezistencí bakterií rozumíme schopnost bakterií odolávat účinku antibiotik nebo antimikrobiálních chemoterapeutik. Jedná se o celosvětový závažný problém. Z hlediska rizika vzniku a šíření rezistentních kmenů bakterií nás zajímá především rezistence bakterií

sekundární, kdy původně citlivá populace mikroba nebo populace s velmi nízkým počtem rezistentních mikroorganismů se stává pod vlivem podávaného antibiotika rezistentní. K sekundární rezistenci dochází mutacemi nebo přenosem genetické informace. K takovému přenosu může docházet mezi buňkami téhož druhu i mezidruhově. Při vzniku rezistence bakterií hraje významnou roli tzv. selekční tlak podávaného antibiotika. Znalost stavu a vývoje rezistence je základní podmínkou pro empirickou volbu účinného antibiotika a je důležitá pro prevenci šíření rezistentních kmenů. Je nutno se orientovat dle regionálních dat, nelze brát v úvahu výsledky ze zahraničí.

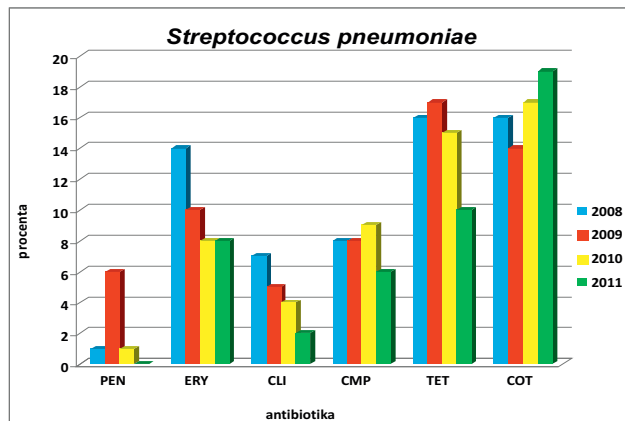
U *S. pneumoniae* sledujeme dlouhodobě rezistenci k penicilinu a makrolidům, u *H. influenzae* rezistenci k ampicilinu, u *S. pyogenes* rezistenci k makrolidům.

Jako „nové“ fenomény se objevují kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní k oxacilinu (tzv. MRSA), výskyt kmenů *Escherichia coli* produkujících širokospektrou betalaktamázu (tzv. ESBL) v komunitě, a dále např. *H. influenzae* rezistentní k ampicilinu

neprodukující betalaktamázu (BLNAR).

Na uvedeném **grafu č.1** je patrná situace v Moravskoslezském kraji v letech 2008 až 2011. Je zde uvedeno procento rezistentních kmenů *S. pneumoniae* k jednotlivým antibiotikům. Údaje za rok 2011 jsou za období 1.1. až 30.9. 2011.

Je patrný pokles počtu rezistentních kmenů *S. pneumoniae* k makrolidům a clindamicinu v posledních letech, což hodnotíme jako pozitivum.



Graf č.1: Rezistence *Streptococcus pneumoniae* k antibiotikům 2008 – 2011 vyšetřených na ZUOVA

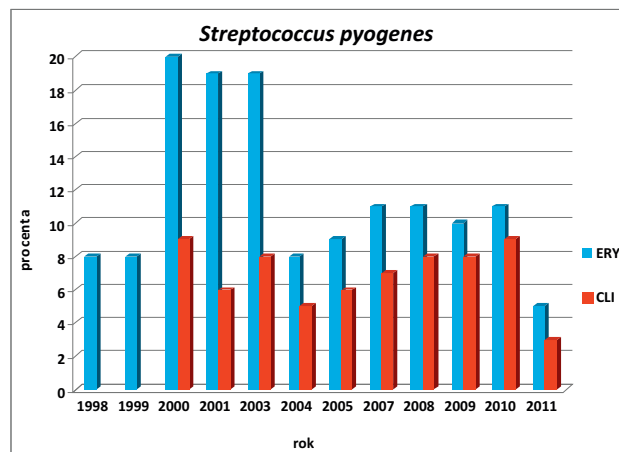
Graf č.2 zachycuje procento rezistentních kmenů *S. pyogenes* k makrolidům a clidamicinu.

V letech 1999-2003 došlo k prudkému vzestupu počtu rezistentních kmenů *S. pyogenes* k makrolidům. Jako příčina se uplatnilo především nadužívání makrolidů jako léků první volby při léčbě akutních respiračních infekcí, dále ne zcela správně stanovené dávkovací režimy určitých léčiv. Po intenzivních intervencích ve prospěch penicilinu a úpravě dávkovacích režimů došlo v r. 2004 k poklesu počtu rezistentních kmenů *S. pyogenes*. V dalších letech můžeme situaci hodnotit jako celkem příznivou.

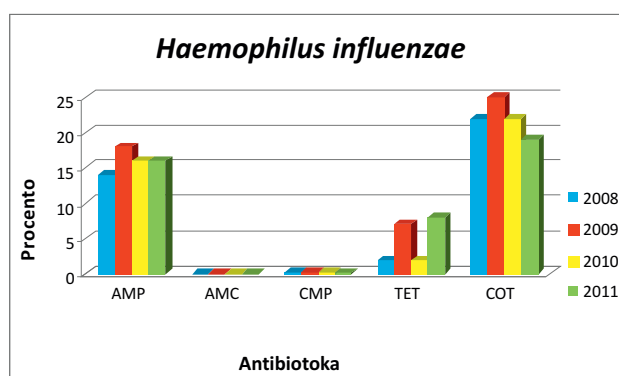
Při léčbě infekcí způsobených *S. pneumoniae* a *S. pyogenes* stále zůstává lékem první volby penicilin! Makrolidy pouze v odůvodněných případech (alergie na peniciliny atd.).

Graf č.3 znázorňuje situaci týkající se rezistence *H. influenzae*. Počty kmenů *H. influenzae* rezistentní

k ampicilinu se v posledních letech 2008-2011 výrazně nemění a udržují se na poměrně nízkých hodnotách.



Graf č.2: Rezistence *Streptococcus pyogenes* k makrolidům a clindamicinu 1998 – 2011 vyšetřených na ZUOVA



Graf č.3: Rezistence *Haemophilus influenzae* k antibiotikům 2008 – 2011 vyšetřených na ZUOVA

Závěr

Hlavní zásady antibiotické léčby bakteriálních infekcí můžeme shrnout jako včasné podání antibiotika, podání antibiotika s ohledem na klinický stav pacienta a podání adekvátní antibiotické léčby na základě výsledků bakteriální rezistence.

Aktuálně o problematice *Clostridium difficile*

Tereza Škapová

Clostridium difficile je grampozitivní, striktně anaerobní tyčinka. Produkuje terminální až subterminální rezistentní spory. V prostředí se přirozeně vyskytuje v půdě a zažívacím traktu zvířat i člověka.

Poprvé bylo *Clostridium difficile* izolováno ze střeva novorozence v roce 1935 Hallem a O'Toolem. Vědci tenkrát nazvali nově objevenou bakterii *Bacillus difficilis*, což mělo odrážet problémy, se kterými se setkali při její izolaci. V roce 1978 bylo *C. difficile* popsáno jako původce kolitidy spojené s užíváním antibiotik. V následujících letech pak byla problematika podrobně studována – byly vyvinuty první testy na toxicitu *C. difficile*, byly definovány rizikové faktory pro vznik *difficile* kolitidy a rovněž byla stanovena léčba kolitidy.

Faktory virulence *C. difficile* jsou tvorba rezistentních

Oddělení bakteriologie a mykologie

spor a produkce toxinů. Spory jsou, na rozdíl od vegetativních buněk klostridií, acidorezistentní, což umožňuje po požití jejich průchod žaludkem do tenkého střeva. Tam spory germinují a vegetativní buňky pak produkují toxiny, které jsou hlavním faktorem virulence *C. difficile*. Nejvýznamnějšími toxiny jsou toxin A – enterotoxin, a toxin B, který působí jako cytotoxin. Působením toxinů dochází k poškození enterocytů, zvýšení zánětlivé odpovědi, ve střevě vznikají ulcerace a pseudomembrány. V krajních případech může vést poškození střeva až k jeho perforaci a smrti pacienta. Některé kmeny *C. difficile* produkují binární toxin. Jeho role v patogenezi zůstává stále nejasná, uvažuje se o možnosti, že binární toxiny mění povrch epitelů střeva a tak ovlivňuje adheenci klostridií.

Hlavním rizikovým faktorem vzniku *difficile* infekce je antibiotická léčba nebo profylaxe, a to zejména širokospektrými antibiotiky (cefotaxim, ceftazidim, klindamycin, fluorochinolony aj.). Dále mezi rizikové faktory patří imunosuprese, onkologická onemocnění, hospitalizace a věk pacienta nad 65 let. V posledních letech se tato škála „tradičních“ rizikových faktorů rozšířila o další: polymorbiditu, chirurgické zákroky v gastrointestinálním traktu, endoskopické procedury, používání antacid, opiátů a léčivých látek ze skupiny inhibitorů protonové pumpy a byly popsány rovněž případy vážných infekcí v těhotenství.

Diagnóza infekce *C. difficile* by měla být stanovena za základě dvou kritérií. Prvním z nich je endoskopické zjištění pseudomembranózní kolitidy. Ta bývá ve většině případů způsobena právě *C. difficile*, proto je pro diagnózu *difficile* postaćující. Ve všech ostatních případech by diagnóza měla být založena na přítomnosti klinických projevů charakteristických pro infekci *C. difficile* a na průkazu toxigenního kmene ve stolici pacienta. Hlavními klinickými projevy *difficile* jsou průjem, ileus a toxické megakolon. Průjem je v případě infekce *C. difficile* definován jako řídká stolice ve vysoké frekvenci odpovídající svým tvarem typům V-VII v Bristolské škále typů stolice. Ileus zde popisujeme jako narušení střevní průchodnosti s radiologickými známkami rozšíření střev, toxické megakolon pak jako známky rozšíření střeva spolu s těžkou systémovou zánětlivou odpovědí. U závažných infekcí *C. difficile* můžeme pozorovat další klinické příznaky, např. horečku, známky šoku, známky peritonitidy, leukocytózu (> 15 000), posun krevního obrazu doleva, zvýšený kreatinin aj.

V epidemiologii *difficile* hraje důležitou roli asymptomatické nosičství *C. difficile*. U zdravé populace se jeho míra pohybuje mezi 1-3 % (vyšší je u novorozenců a malých dětí), u hospitalizovaných osob může vzrůst až na 11 %. Asymptomatické nosiči jsou spolu s nemocnými osobami primárním zdrojem infekce, vylučují velké množství spor stolicí. Přenos infekce *C. difficile* je fekálně-orální, děje se tak prostřednictvím kontaktu s nemocným pacientem, rukama zdravotnického personálu nebo kontaminovanými povrchy a prostředím. Infekce *C. difficile* patří mezi typické nozokomiální nákazy, v posledních letech ale vzrůstá počet tzv. komunitních infekcí, které definujeme jako infekce s počátkem v komunitě nebo v nemocnici do 48 hodin od přijetí u člověka, který nebyl hospitalizovaný v předchozích 12 týdnech. Vzhledem k množství nesourodých dat vyplývajících z doposud uskutečňovaných studií, nelze přesněji odhadnout četnost komunitních *difficile*. Pátrá se rovněž po jejich zdroji. Uvažuje se o možné roli zvířecích rezervoárů, je diskutována míra provázanosti zvýšeného vzrůstajícího výskytu infekcí *C. difficile* v nemocnicích a v komunitě. Za hlavní faktor narůstajícího výskytu *difficile* je obecně považován zvýšený výskyt hypervirulentních kmenů *C. difficile*. Nejznámějším hypervirulentním kmenem je ribotyp 027, který v uplynulých letech způsobil epidemie v několika zemích světa. Poslední studie ale naznačují, že jeho výskyt v Evropě klesá.

Laboratorní diagnostika *difficile* je založena na průkazu toxinů A a B ze stolice pacienta. Nejčastěji jsou v mikrobiologických laboratořích využívány tzv. clearview testy na principu membránové imunochromatografie. Pomocí těchto testů je možné stanovit produkci obou hlavních toxinů A a B. Nejnovější soupravy umožňují rovněž stanovení glutamátdehydrogenázy (GDH) –

enzymu specifického pro *C. difficile*. Pozitivní výsledek testu potvrzuje přítomnost *C. difficile* ve stolici. Za zlatý standard je dnes považována tzv. toxigenní kultivace, kdy prokazujeme toxiny z kolonií, resp. bujónové kultury kmene *C. difficile*. Toto stanovení toxinů in vitro je prováděno u kmenů izolovaných ze vzorků stolice, u nichž bylo první stanovení toxinů negativní.

V laboratoři bakteriologie Ostrava Zdravotního ústavu jsou stanovovány toxiny A a B *C. difficile* enzymovou imunoanalýzou s konečným zjištěním pomocí fluorescence. Každý vzorek stolice je podroben kultivaci, u vyzolovaného kmene *C. difficile* stanovujeme citlivost k antibiotikům (vankomycin, metronidazol). V současné době pracujeme na zavedení toxigenní kultivace, která by přispěla k dalšímu zkvalitnění poskytovaných služeb. V laboratoři bakteriologie Havířov je k diagnostice *difficile* využívána komerční souprava umožňující současně stanovení GDH a toxinů. U vykultivovaných kmenů je rovněž stanovována citlivost k antibiotikům.

K testování toxinů by měla být zasílána pouze průměrná stolice. Od každého pacienta by měl být testován pouze jeden vzorek, rovněž opakované testování v průběhu jedné epizody nemoci není doporučováno. Výsledek stanovení toxinů by měl sloužit ke stanovení diagnózy infekce *C. difficile*, nikoli jako test léčby.

V roce 2009 vydala Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) doporučení pro léčbu infekcí *C. difficile*. Základem léčby nadále zůstávají metronidazol a vankomycin podávané perorálně. Konkrétní schémata léčby jsou k dispozici v daných doporučeních.

Největším problémem při terapii *difficile* jsou relapsy infekce. Relaps je definován jako znovuobjevení se identických, více či méně závažných, symptomů v průběhu dvou měsíců od úspěšné standardní terapie. Často se jedná o téměř identický proces, onemocnění se stejným průběhem a klinickými příznaky. Relapsy se vyskytují až u 20 % pacientů a jsou způsobeny dozráváním perzistujících spor ve střevě pacienta.

Zejména rostoucí počet těžce probíhajících infekcí a velká četnost relapsů vedou ke zkoušení nových typů léčby. Ve fázi klinických zkoušek je nové antibiotikum fidaxomycin, je testována léčba monoklonálními protilátkami proti toxinům *C. difficile* a byly prováděny rovněž pokusy s transplantací stolice od zdravého dárce.

Literatura:

1. Bartlett, J. G. 2010. Clostridium difficile: progress and challenges. Ann N.Y. Acad Sci;1213:62-69
2. Bauer, M. P., E. J. Kuijper, J. T. van Dissel. 2009. European society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID): treatment guidance document for Clostridium difficile. CMI;15 (12):1067-1079.
3. Cohen, S. H., D. N. Gerding, S. Johnson, C. P. Kelly, V. G. Loo, L. C. McDonald, J. Pepin, M. H. Wilcox. 2010. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 Update by the Society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the Infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol; 31(5):000-000

Taxonomie bakterií (přesněji prokaryot) si klade za cíl bakterie charakterizovat a určitým způsobem zařadit do taxonomických jednotek na základě průkazu jejich vlastností a vzájemného příbuzenského vztahu. Obecně se taxonomie skládá ze tří oddělených a současně navzájem propojených oblastí: klasifikace, nomenklatury a identifikace. Ve stručnosti lze říci, že klasifikace je uspořádávání organismů do skupin na základě podobnosti a příbuznosti. Nomenklatura potom znamená přiřazování jmen těmto taxonomickým skupinám na základě mezinárodních pravidel. Výsledná identifikace je proces prokazující, že izolovaný bakteriální kmen patří do jednoho z již dříve ustanovených a pojmenovaných taxonů. Základní jednotkou v taxonomii bakterií je druh, jednoznačné pojmenování daného druhu bakterie se skládá ze jména rodového a druhového (např. *Escherichia coli*).

Taxonomie, jakož i taxonomie bakterií, není statická vědní disciplína – neustále se mění na základě nových poznatků. Dotčena je tak i taxonomie klinicky významných druhů bakterií. Jsou popisovány stále nové druhy či rody. Druhy, které byly dříve považovány za homogenní, mohou být díky nově zavedeným taxonomickým přístupům označeny jako heterogenní a rozpadají se. S ohledem na nově vznikající taxony je třeba zajistit, aby bakteriální druhy považované za patogenní byly stále identifikovány na potřebné taxonomické úrovni.

K jakým změnám a jak rychle dochází lze demonstrovat na příkladu rodu *Staphylococcus*. V roce 1920 byly popsány pouze dva druhy tohoto rodu: *S. aureus* a *S. epidermidis*. Dnes je známo 45 platných druhů. Neexistuje již tedy pouze jeden „nepatogenní druh“ stafylokoka: místo známého *S. epidermidis* existuje několik desítek druhů jiných, tzv. koaguláza-negativních stafylokoků; téměř u každého z nich můžeme najít informaci o možném patogenním působení v lidském organismu.

Obecně lze říci, že počty popsaných druhů bakterií narůstají. Změny se týkají všech bakteriálních rodů, tedy i gramnegativních tyčinek. Neexistuje tak již pouze jeden druh rodu *Escherichia* – *E. coli*, rod *Escherichia* zahrnuje v současnosti 5 druhů, dále např. rod *Klebsiella* 8 druhů, rod *Citrobacter* 11 druhů, rod *Enterobacter* 18 druhů, rod *Serratia* 15 druhů a tak bychom mohli ve výčtu pokračovat.

Výrazné změny proběhly v posledních letech i v taxonomii gramnegativních nefermentujících tyčinek. V současné době například existuje 160 druhů rodu *Pseudomonas* či 25 druhů rodu *Acinetobacter*. Od roku 1973, kdy bylo na základě výsledků srovnání ribozomální RNA popsáno pět tzv. rRNA homologických skupin pseudomonád, se rod *Pseudomonas* rozpadl, vzniklo několik nových rodů – např. *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Commamonas*, *Delftia*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* aj.

Pokud jednotlivé změny v taxonomii bakterií shrneme, dá se zjednodušeně říci, že v lékařské mikrobiologii se u bakterií nejčastěji setkáváme s těmito taxonomickým změnami:

- 1) Pokud jsou rozdíly mezi dosud popsanými bakteriálními druhy považovány za významné, dochází k vytvoření nového rodu - vznikají nová rodová jména - např.: *Leclercia* (dříve

Escherichia adecarboxylata, *Raoultella* (dříve *Klebsiella*) *terrigena*, *Pantoea* (dříve *Enterobacter*) *agglomerans*, *Aggregatibacter* (dříve *Haemophilus*) *aphrophilus* aj.

- 2) Pokud se stávají rozdíly mezi jednotlivými bakteriálními druhy minimálními a nelze tyto druhy v rutinní laboratoři jednoduše odlišit, bývá vždy několik druhů daného rodu zařazeno do tzv. komplexů (např.: *Enterobacter cloacae* komplex, *Citrobacter freundii* komplex, *Burkholderia cepacia* komplex).
- 3) Někdy nelze izolovaný kmen s jistotou identifikovat na úroveň druhu, protože v rámci jednoho rodu bylo popsáno větší množství obtížně či nespolehlivě odlišitelných druhů – výsledná identifikace se omezuje pouze na rodové jméno; lze předpokládat, že byl izolován jakýkoliv druh daného rodu (např.: *Pantoea* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp.).

Každý mikroorganismus můžeme charakterizovat řadou metod, které popisují jeho vlastnosti. Zjištěné vlastnosti – jsou-li srovnány s dosud známými – vedou ke správné identifikaci. Některé metody identifikace bakterií jsou vhodné pro rutinní využití, jiné nikoliv. Běžnou, nejstarší a dobře propracovanou metodou identifikace je identifikace bakterií na základě posouzení fenotypových vlastností (často ne zcela správně označovaná podle povahy nejčastěji používaných testů také jako biochemická identifikace).

Mezi další metody identifikace, které nám mohou poskytnout cenné informace, patří identifikace podle výsledků analýzy mastných kyselin. Analýza mastných kyselin jako jedna z chemotaxonomických metod využívá k identifikaci bakterií přítomnosti či absence nebo poměrného zastoupení mastných kyselin, specifických pro určité taxony nebo skupiny bakterií. V naší laboratoři je dostupný automatizovaný systém plynové chromatografie - mikrobiologický identifikační systém Sherlock (MIDI), který využívá této metody a je vhodný pro rutinní laboratoře.

S výhodou lze také využít identifikaci bakterií porovnáním částečné sekvence genu pro 16S rRNA. Analýza sekvencí 16S rRNA je založena na porovnávání krátkých sekvencí bazí vyskytujících se u jedné skupiny organismů a chybějících u jiných. Výhodou této metody je, že je univerzální; sekvencí bazí genu kódujícího 16S rRNA lze stanovit pro všechny druhy bakterií. Také tuto metodu využívá naše laboratoř prostřednictvím systému MicroSeq (Applied Biosystems).

Novinkou posledních let se stává identifikace porovnáním hmotnostních spekter získaných metodou MALDI-TOF. Jde o metodu hmotnostní spektrometrie, díky které lze rozdělovat nabitě částice podle jejich molekulových hmotností v elektrickém nebo magnetickém poli. Pro účely identifikace bakterií se ke stanovení molekulových hmotností používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Výhodou metody je její vysoká citlivost a rychlost měření.

Rozlišovací možnosti metod užívaných v taxonomii jsou různé, většinou se zvolené metody identifikace vhodně

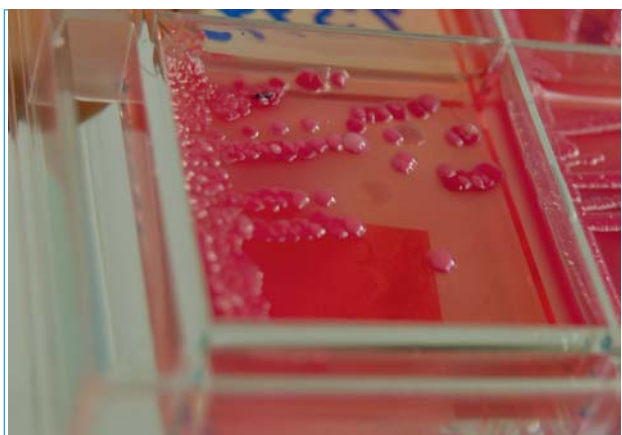
kombinují. Výsledek identifikace bakteriálního kmene vzniká posouzením všech výsledků zvolených metod.

Správná identifikace bakteriálních kmenů izolovaných z klinického materiálu je velmi důležitá pro zhodnocení významnosti nálezu. Identifikace bakterií je vlastně proces dokazování. Správná identifikace zpřesňuje znalosti o frekvenci, místech a souvislostech záchytu daného bakteriálního druhu. Identifikace ve shodě s aktuální taxonomií nám zajišťuje nejnovější informace týkající se daného nálezu, bakteriálního druhu (lze snáze interpretovat závažnost nálezu, zda byly popsány případy patogenního působení či nikoliv). Lze získat informace o tom, kde se daný bakteriální druh běžně vyskytuje, jaká je jeho přirozená rezistence k antimikrobiálním látkám. Jen tak lze rozhodnout o vhodném terapeutickém postupu. Je proto nutné, aby se nové přístupy v taxonomii bakterií odrazily

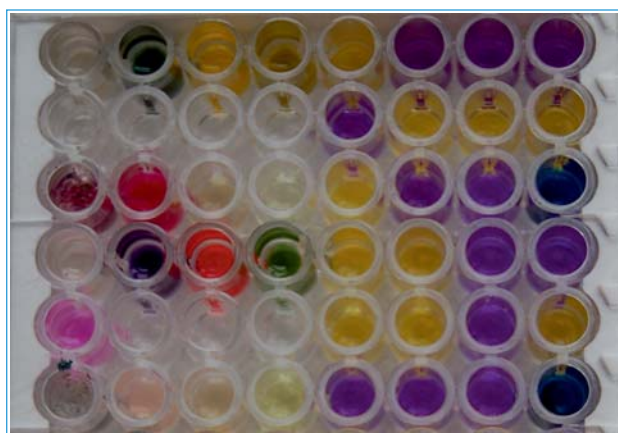
ve vhodné a potřebné míře i v rutinní diagnostice.

Literatura:

1. Havliš J.: Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, Vesmír 78, 448, 1999/8
2. Julák J.: Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy. Karolinum, Praha, 1998
3. Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M.: Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*, Int J Syst Bact, 1973, p. 333-339
4. Sedláček I.: Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno, 2007
5. <http://www.bacterio.cict.fr/>



Obrázek č.1: Identifikaci bakteriálních kmenů i případné stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám je možné provést až po izolaci čisté bakteriální kultury – příklad směsné kultury gramnegativních tyčinek na MacConkey agaru.



Obrázek č.2: Příklad identifikace bakterií na základě posouzení fenotypových vlastností – identifikace v soupravě NEFERMtest 24 (Erba Lachema); nahoře *Acinetobacter baumannii*, dole *Pseudomonas aeruginosa*



22. října 2011

zemřel po těžké nemoci ve věku 68 let

MUDr. Jiří Januška,

dlouholetý vedoucí NRL pro arboviry
a vedoucí virologického oddělení Zdravotního ústavu v Ostravě.

Jiří Januška se narodil 22. března 1943 v Ostravě, kde prožil své dětství. Vystudoval LF UP v Olomouci a v roce 1966, jako čerstvý absolvent, začíná pracovat na KHES Ostrava na virologickém oddělení. Koncem téhož roku nastupuje základní vojenskou službu u vojenské posádky v Hranicích jako lékař útvaru. Po roce se vrací zpět na KHES v Ostravě jako sekundární lékař virologického oddělení. V roce 1975 s úspěchem skládá atestační zkoušku z mikrobiologie a o čtyři roky později atestační zkoušku z oboru lékařská virologie. V roce 1983 je jmenován do funkce vedoucího NRL pro arboviry a v tomtéž roce nastupuje také do funkce vedoucího virologického oddělení.

Po celá léta se věnoval problematice diagnostiky arbovirových onemocnění, především klíšťové encefalitidy. Byl autorem a spoluautorem řady odborných publikací zabývajících se touto tematikou. Na tomto poli odvedl veliký kus práce s vysokou odborností, nadšením a láskou. Při odchodu do důchodu na konci roku 2010 se těšil na to, jak rozdělí svůj čas mezi své milované vnučky, zahradu a akvariijní rybičky. Bohužel přišla těžká nemoc, která ho o všechno připravila. Zůstává po něm veliká mezera, která se bude velmi obtížně zacelovat.