



Zpravodaj Centra MPI

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

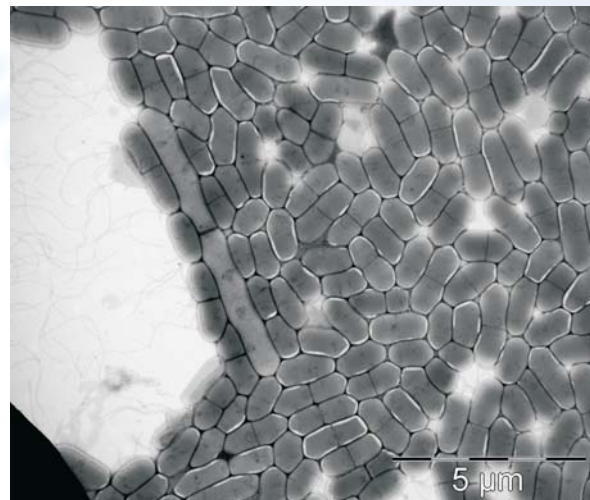
3/2007/Ročník 3
Datum vydání 20. 9. 2007.

Listeria monocytogenes- původce listeriózy

Jančová J., Škapová T., Oddělení bakteriologie ZÚ Ostrava

V loňském roce byla bakterie *Listeria monocytogenes* zmiňována téměř ve všech mediích i tisku. Škála informací o listeriích a listerióze, tj. o onemocnění jimi způsobeném, byla široká a různorodá. Bylo možné setkat se jak se zprávami velmi podrobnými a seriózními, publikovanými v odborných časopisech, tak na straně druhé se články v bulvárním tisku vyvolávajícími pouhopouhou hysterii. Nebezpečí výskytu listeriózy by nemělo být přeceňováno ani podceňováno. Listerie a listerióza totiž nejsou pro lékaře a diagnostiky žádnou novinkou.

více na str. 2



Imunologická problematika intracelulárních infekcí

Lochmanová A., Oddělení buněčné imunity

Mikroorganismy představují nejstarší, nejpočetnější a zřejmě i nejvýznamnější část živé přírody. Mikrobiální svět, který člověka během jeho života obklopuje, se vedle genetické dispozice podílí významnou měrou na utváření imunologické reaktivity. Je možno říci, že imunita je výsledkem společného vývoje mikroorganismů a imunitního systému. Významné jsou v tomto ohledu všechny mikroorganismy, které nás oklopují, ať už tvoří přirozenou mikroflóru tělních povrchů a sliznic, nebo se jedná o patogenní druhy.

Samotný vznik bakteriální infekce je poměrně složitý proces, na kterém se podílejí jak molekulární struktury bakteriálních buněk a jejich regulační mechanismy, tak strukturální a regulační složky hostitelského organismu. Bakteriální infekce je zpravidla spuštěna adhezí mikroba k hostitelské buňce, ke které dochází kontaktem specifických extracelulárních struktur bakteriální buňky (adhezínů) a receptorů (ligandů) přítomných na hostitelské buňce.

I když se na účinné eliminaci bakteriální infekce podílejí prakticky všechny složky nespecifické i specifické imunity, pro likvidaci některých patogenů je charakteristická převaha některého z typů imunitní reakce.

více na str. 5



Podmíněně patogenní mykobakteria - jejich výskyt a medicínské souvislosti

Kaustová J., Oddělení pro diagnostiku mykobakterií a Národní referenční laboratoř pro *Mycobacterium kansasii* ZÚ Ostrava

Cílem sdělení je upozornit, že podmíněně patogenní mykobakteria mohou být etiologickým agens onemocnění člověka. Jejich interhumánní přenos nebyl prokázán, zdrojem infekce je životní prostředí s nímž je člověk v trvalém úzkém kontaktu. Zahraniční autoři upozorňují zejména na nezanedbatelný podíl PPM na nosokomiálních nákazách.

V současné době je známo více než 100 podmíněně patogenních mykobakteriálních druhů (PPM).

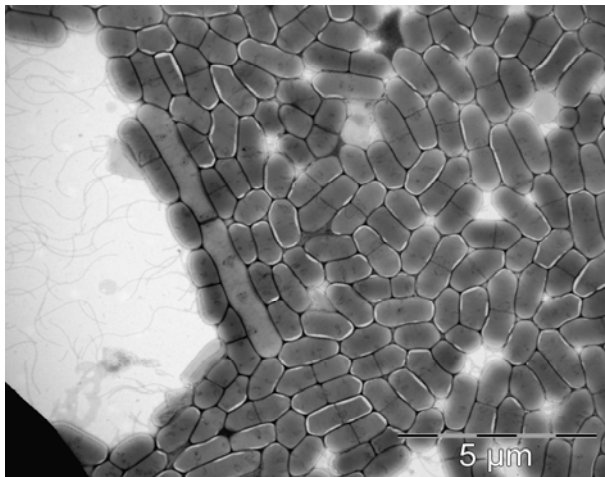
více na str. 8

Listeria monocytogenes- PŮVODCE LISTERIÓZY

MUDr. Jana Jančová, Mgr. Tereza Škapová

Oddělení bakteriologie ZÚ Ostrava

V loňském roce byla bakterie *Listeria monocytogenes* (Obr. 1) zmiňována téměř ve všech médiích i tisku. Škála informací o listeriích a listerióze, tj. o onemocnění jimi způsobeném, byla široká a různorodá. Bylo možné setkat se jak se zprávami velmi podrobnými a seriózními, publikovanými v odborných časopisech, tak na straně druhé se články v bulvárním tisku vyvolávajícími pouhopouhou hysterii. Nebezpečí výskytu listeriózy by nemělo být přeceňováno ani podceňováno. Listerie a listerióza totiž nejsou pro lékaře a diagnostiky žádnou novinkou.



Obr.1 - *Listeria monocytogenes*
na snímku z elektronového mikroskopu (zvětšeno
10 000x, foto Mgr. M.Pomiklová)

Již na začátku minulého století byla popsána lidská onemocnění, jejichž klinická symptomatologie odpovídala obrazu listeriové infekce. V roce 1926 byla u



Obr. 2 - Joseph Lister

epizoozie pokusných králíků v Cambridge izolována drobná grampozitivní tyčinka nazvaná *Bacterium monocytogenes*. O tři roky později byla popsána u pacientů s angínou a uzlinovým syndromem v hemokultuře a u pacientů s meningeálními příznaky v mozkomíšním moku. Ve čtyřicátých letech minulého století pak byla tato bakterie vyvolávající onemocnění zvířat i lidí nazvána na počest anglického chirurga Josepha Listera (Obr. 2) *Listeria monocytogenes*. Vědci se dlouho domnívali, že se v případě listeriózy jedná o zoonózu, tj. nemoc přenosnou z živočichů na člověka. Až v osmdesátých letech 20.století bylo zjištěno, že jde o nákazu alimentární, způsobenou kontaminovanými potravinami.

Listerie jsou všudypřítomné. Vyskytují se v půdě, vodě, na rostlinách, v siláži, ale také v zažívacím traktu zvířat i člověka (až 20% bezpříznakových nosičů). *Listeria monocytogenes* se může vyskytovat v mase a masných výrobcích, mléce, zrajících sýrech, v syrové zelenině i jiných potravinách.

TAXONOMIE A PATOGENITA

Rod *Listeria* zahrnuje 6 druhů: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. Pro člověka a zvířata je potenciálně patogenní druh *L. monocytogenes*. *L. ivanovii* vyvolává převážně onemocnění ovcí a onemocnění lidí pak pouze výjimečně. Patogenita ostatních druhů je nízká nebo prakticky nulová.

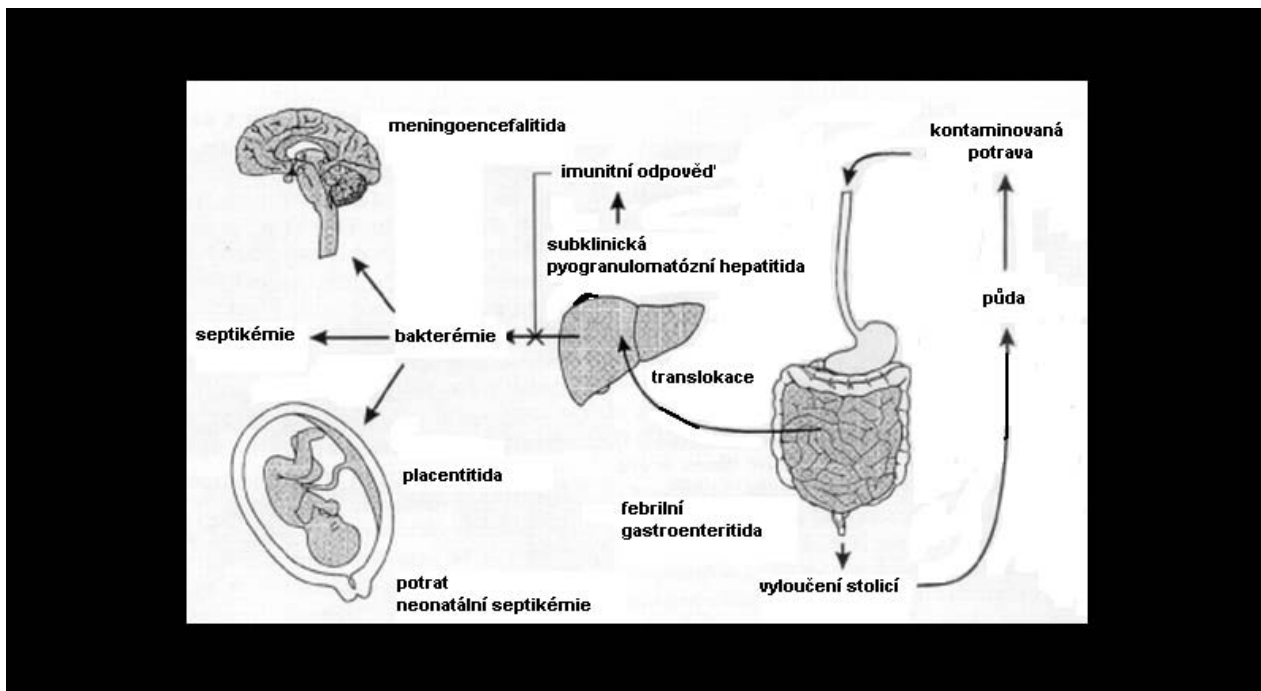
Podle typu tělových O- antigenů a bičíkových H- antigenů řadíme listerie do sérotypů. Znalost příslušného sérotypu je nutná pro epidemiologické účely. 90 % listerióz u člověka je vyvoláno sérotypy 1/2 a, 1/2b a 4b.

Většina listeriových infekcí probíhá bezpříznakově. Vážné onemocnění hrozí zejména příslušníkům rizikových skupin. Mezi tyto patří imunodeficitní pacienti (u osob s onemocněním AIDS se listerióza vyskytuje až 300x častěji, než u lidí s normálním imunitním systémem), nemocní s rakovinou, diabetem a onemocněním ledvin, lidé užívající glukokortikoidy nebo anacida, pacienti s hypoaciditou žaludeční šťávy, starší osoby, novorozenci a těhotné ženy. Ty onemocní až 20x častěji než ostatní dospělí lidé a hrozí u nich riziko potratu nebo postižení plodu. Možné nebezpečí představují listerie i pro chovatele domácích zvířat a zaměstnance podniků, kteří pracují s rizikovými potravinami, u nichž mohou způsobovat např. infekce ran.

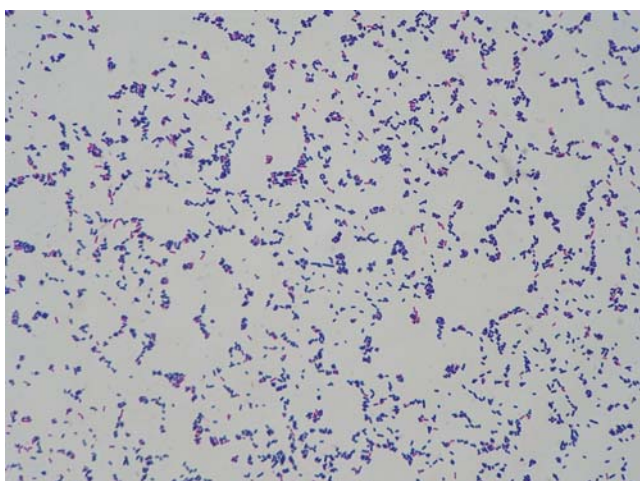
Cesta přenosu listeriózy je nejčastěji alimentární. Předpokladem vzniku invazivní generalizované infekce je překonání střevní bariéry hostitele. *Listeria monocytogenes* jako intracelulární patogen invaduje ze střeva do buněk střevních plaků, do jater, CNS nebo placenty. Z toho vyplývají klinické symptomy- sepse, meningitidy, febrilní gastroenteritidy, příp. subklinická pyogranulomatozní hepatitida, neonatální septikémie, abortus aj. (Obr. 3). U těhotných žen může listerióza probíhat pod obrazem cystitidy. Jak je tedy patrné, listerióza může probíhat pod různými klinickými obrazy a klinik by měl v diferenciální diagnostice na toto onemocnění pamatovat.

LISTERIE Z POHLEDU BAKTERIOLOGA

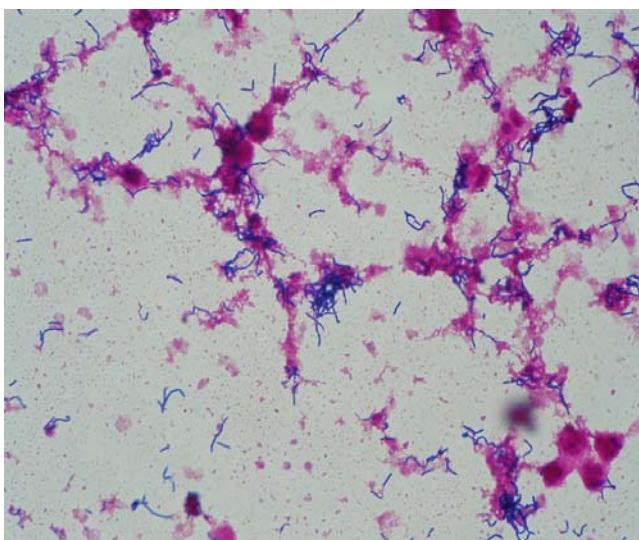
Listeria je grampozitivní, aerobní tyčinka (Obr. 4). Tvoří bičíky a při pokojové teplotě je pohyblivá. Netvoří pouzdra ani spory, ve starších bujónových kulturách se vyskytuje ve formě vláken (Obr. 5). Na kultivačních půdách s přidavkem krve (krevním agaru) roste při teplotách 25- 37 °C, ale je rovněž odolná proti mrazu a nízkému pH a má schopnost pomalu se množit i při teplotě 4 °C.



Obr. 3 – Schéma možného průběhu listeriové infekce



Obr. 4 - *Listeria monocytogenes* na snímku ze světelného mikroskopu (zvětšeno 1 500x, foto RNDr.V. Holec)



Obr. 5 *Listeria monocytogenes* v hemokultuře na snímku ze světelného mikroskopu (zvětšeno 1 500x, foto RNDr. V. Holec)

Isolace a identifikace listerií z klinického materiálu není zvláště obtížná. K izolaci používáme krevní agar (Obr. 6). Zde rostou kolonie *Listeria monocytogenes* obklopené zónou beta-hemolýzy. U silně kontaminovaného materiálu jako jsou stolice, poševní výtěry, stěry z dutiny ústní apod. využíváme selektivní půdy (např. *Listeria selective agar*), na kterých je růst ostatních mikroorganismů potlačen (Obr. 7). V mikroskopickém preparátu pozorujeme drobné grampozitivní až gramlabilní kokotyčky.

Klinicky nejvýznamnější druh *Listeria monocytogenes* je přirozeně rezistentní k cefalosporinům. Produkuje katalázu, hydrolyzuje eskulin a obdobně jako *Streptococcus agalactiae* má pozitivní CAMP test. Biochemicky lze listerie identifikovat v komerčně dodávaných soupravách *apiListeria* nebo *apiCoryne*. Pro rychlý průkaz DNA druhu *Listeria monocytogenes* lze využít metodu polymerázové řetězové reakce (PCR). Případná sérotypizace je prováděna v Národní referenční laboratoři pro problematiku listerie v potravinových řetězcích v Brně.



Obr. 6 - *Listeria monocytogenes* na krevním agaru (foto Mgr. R. Dobiáš)



Obr. 7 *Listeria monocytogenes* na selektivní půdě na bázi žluč-
eskulinu (foto Mgr. R. Dobiáš)

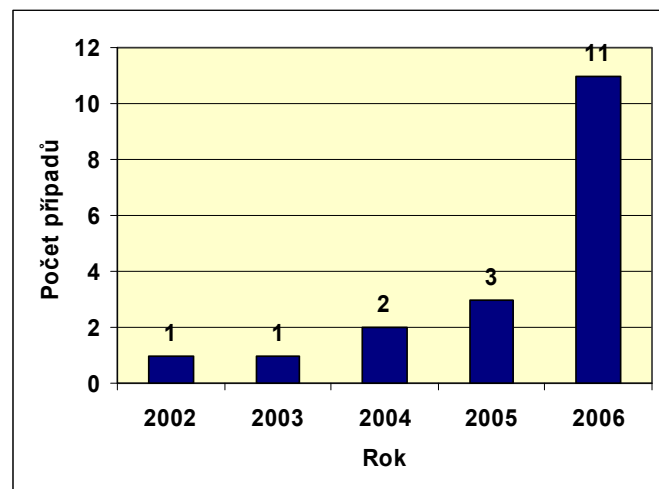
Laboratorní průkaz listerií lze provést z těchto typů
klinického materiálu:

- Likvor
- Hemokultura
- Lochie
- Stolic
- Hnis
- Výtěr z krku
- Plodová voda
- Moč
- Spojivkový vak
- Punktát

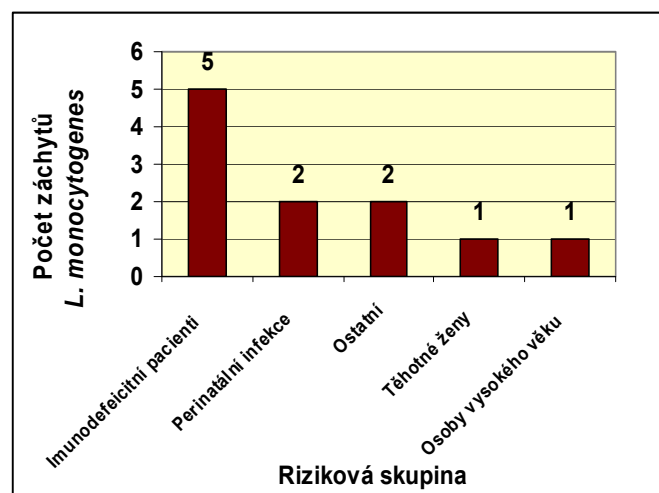
Pro rychlou mikrobiologickou diagnostiku je nutná
spolupráce klinika s mikrobiologem! Ta spočívá zejména
ve správném odběru materiálu (má-li kliník podezření
např. na vrozenou listeriózu u novorozence, odebere
také matčiny očištění, moč, stolic apod.). Je vhodné, když
klinik krátkou anamnézou (např. telefonicky,
poznámkou na žádance) upozorní mikrobiologickou
laboratoř na své podezření. Pracovníci laboratoře pak
mohou do standardní sestavy kultivačních půd cíleně
zařadit selektivně- diagnostickou půdu pro kultivaci
listerií.

Laboratoře CMPI nabízejí rychlou diagnostiku *Listeria
monocytogenes* jako původce bakteriální meningitidy
metodou PCR z likvoru, nebo, v případě septikémie, z
plné krve (EDTA nebo citrátové). V tomto případě
doporučujeme telefonicky ohlásit, že byl odebrán vzorek
pro PCR a označit žádanku poznámkou STATIM. Je nutné
mít neustále na paměti, že listerióza je onemocnění
s vysokou úmrtností a včasná diagnostika a zahájení
terapie jsou velice důležité!!!

Závěrem je třeba zdůraznit, že navzdory
loňskému zvýšenému výskytu listeriózy, který jsme
zaznamenali i v naší laboratoři (Grafy 1 a 2) je toto
onemocnění stále řazeno mezi spíše sporadické, na které
je nutné pamatovat, zároveň však přílišné obavy nejsou
na místě.



Graf 1 - Počet záchytů *Listeria monocytogenes* na ZÚ Ostrava
v letech 2002-2006



Graf 2 - Záchyt *L. monocytogenes* u jednotlivých rizikových

Použitá literatura:

**Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra
J. (1999): Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha, str.
221-224.**

IMUNOLOGICKÁ PROBLEMATIKA INTRACELULÁRNÍCH INFEKČÍ

Lochmanová A., Oddělení buněčné imunity

Mikroorganismy představují nejstarší, nejpočetnější a zřejmě i nejvýznamnější část živé přírody. Mikrobiální svět, který člověka během jeho života obklopuje, se vedle genetické dispozice podílí významnou měrou na utváření imunologické reaktivity. Je možno říci, že imunita je výsledkem společného vývoje mikroorganismů a imunitního systému. Významné jsou v tomto ohledu všechny mikroorganismy, které nás obklopují, ať už tvoří přirozenou mikroflóru tělních povrchů a sliznic, nebo se jedná o patogenní druhy.

Podle vzájemného vztahu mikroba a hostitele dělíme mikroorganismy do několika skupin:

- Komensální a saprofytické organismy využívají hostitele jako vhodné prostředí a zdroje výživy, přičemž hostitel není poškozován. Příkladem mohou být příslušníci běžné střevní mikroflóry člověka.
- Potenciální patogeny se mohou uplatnit jako původci onemocnění u jedinců, jejichž funkce imunitního systému je nějakým způsobem narušena (primární, sekundární imunodeficity).
- Poslední skupinu tvoří tzv. patogenní mikroorganismy, neboli mikroorganismy, které mají schopnost poškozovat hostitele a vyvolávat onemocnění. Jedná se o ty mikroby, u nichž se vyvinuly dědičné znaky, které jim umožňují proniknout do makroorganismu a udržet se v něm. Tyto znaky se nazývají faktory patogenity nebo též faktory virulence.

Obecně lze patogenitu charakterizovat jako multifaktoriální proces závislý na stavu imunitního systému hostitele, povaze bakteriálního rodu nebo druhu (faktory virulence) a velikosti infekční dávky.

Samotný vznik bakteriální infekce je poměrně složitý proces, na kterém se podílejí jak molekulární struktury bakteriálních buněk a jejich regulační mechanismy, tak strukturální a regulační složky hostitelského organismu. Bakteriální infekce je zpravidla spuštěna adhezí mikroba k hostitelské buňce, ke které dochází kontaktem specifických extracelulárních struktur bakteriální buňky (adhezínů) a receptorů (ligandů) přítomných na hostitelské buňce.

I když se na účinné eliminaci bakteriální infekce podílejí prakticky všechny složky nespecifické i specifické imunity, pro likvidaci některých patogenů je charakteristická převaha některého z typů imunitní reakce.

Usmrcení extracelulárních patogenů probíhá převážně prostřednictvím jednoho z hlavních mechanismů vrozené resistance - fagocytózy. Ačkoliv jistou schopnost fagocytózy má celá řada buněk makroorganismu, efektivita tohoto procesu mezi jednotlivými buněčnými typy značně kolísá. Účinně eliminovat a zabít pohlcené bakterie dovedou pouze tzv. profesionální fagocyty, mezi které patří neutrofilové buňky monocyto-makrofágové linie. Jimi pohlcené

bakterie jsou zabíjeny intracelulárními mikrobicidními systémy, které tvoří především reaktivní produkty kyslíku a dusíku, antimikrobiální proteiny (katelicidiny, defenziny), proteolytické enzymy, lysozym, laktoferin aj. Intracelulární patogeny (jak obligatorní tak fakultativní) však vyvinuly různé molekulární mechanismy které umožňují tyto obranné mechanismy obejít a umožnit jim přežít v různých nitrobuněčných prostorách a organelách. Eliminace intracelulárních mikroorganismů je tak realizována především mechanismy specifické, buňkami zprostředkované imunity, resp. cytotoxickými T lymfocyty. Ačkoliv profesionální fagocyty patří nesporně k hlavním buněčným typům, které umožňují intracelulárním bakteriím přežít a množit se, existuje řada bakterií, která je schopna vstoupit a množit se i v neprofesionálních fagocytech, např. epiteliálních buňkách. Jedná se zejména o střevní patogeny rodu *Salmonella*, *Shigella* a patogenní *E. coli*, ale týká se i *S. aureus* a *S. pyogenes*. Schopnost těchto bakterií vstoupit do nitra buňky zpravidla výrazně zvyšuje jejich virulenci.

Fagocytóza je poměrně složitý, komplexní děj, sestávající z několika na sebe úzce navazujících fází. Během fáze adheze, dochází pomocí specifických receptorů k vazbě mikroba na povrch fagocytující buňky. Následuje fáze pohlcení, neboli ingesce, při které membrána fagocytu vysílá výběžky, které postupně fagocytovaného mikroba obklopují. Tento proces se obecně nazývá endocytóza a konečným výsledkem je vytvoření fagocytární vakuoly (fagozomu). Pro usmrcení mikroba a jeho degradaci je nutné, aby fagozom splýnul s obsahem buněčných granúl, lysozomy, za vzniku fagolysozomu - trávicí vakuoly. Kromě lysozomálních enzymů se podílí na usmrcení mikroba řada dalších metabolických systémů a buněčných struktur fagocytů. Jedná se hlavně o mikrobicidní systémy závislé na kyslíku, které umožňují vznik toxických kyslíkatých produktů jako je superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, singletový kyslík ale také o antimikrobiální faktory na kyslíku nezávislé jako jsou proteázy, kyselá hydrolázy, antimikrobiální proteiny buněčných granúl, kathepsin G, lysozym, laktoferin aj. Důležitým faktorem je kyselá pH, které je výsledkem výše uvedených metabolických pochodů a výraznou měrou přispívá k usmrcení mikroorganismu. Pro intracelulární patogeny je charakteristické to, že tyto útvary buď minou nebo lyzují a zůstávají volně v cytoplazmě, nebo volně přežívají ve fagozomech. Tato situace může nastat důsledkem inhibice fúze fagozomu s lysozomem nebo v případě resistance mikroorganismu k účinkům degradačních enzymů.

Mezi nejznámější zástupce intracelulárních patogenů patří mykobakterie komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, zástupci rodů *Brucella*, *Francisella* a *Rickettsia*, ale i *Salmonella* a *Shigella*. Zejména během posledních let se dostávají do centra pozornosti zástupci rodů *Legionella* a *Listeria*, resp. *Legionella pneumophila* a *Listeria monocytogenes*. I když zdroj nákazy i cesta přenosu je u obou patogenů naprosto odlišná,

predispozice nákazy a projev onemocnění je vázán především na osoby s pozměněnou funkcí imunitního systému v důsledku základního onemocnění nebo terapie. Jedná se zejména o osoby s primárními imunodeficity, pacienty se syndromem AIDS, ale i o pacienty po transplantaci a onkologické pacienty.

Legionella pneumophila byla objevena v souvislosti s vypuknutím pneumonie mezi účastníky sjezdu legionářů ve Philadelphii v roce 1976, i když jako „rickettsia-like“ bakterie byla popsána již v roce 1943. *Legionella* patří mezi fakultativní intracelulární patogeny a je častou příčinou nozokomiálních a komunálně získaných infekcí. Vyskytuje se především jako saprofytický druh v přirozených vodách, kde ke své existenci využívají jiné jednobuněčné organismy, např. améby, ve kterých se rozmnožují. Optimální podmínky ke svému růstu nacházejí ve vodovodních potrubích a nádržích, kde jsou schopny se držet na různých materiálech plastických, gumových či dřevěných ve formě biofilmu. Vzhledem k odolnosti vůči chloru nejsou legionely odstraněny v úpravách pitné vody a mohou tak procházet do potrubní sítě, a kolonizovat domovní rozvody.

Onemocnění může probíhat ve dvou formách. Mírnější forma onemocnění je známa jako Pontiacká horečka, závažnější průběh nemoci provázený vysokou horečkou ústící v těžký zápal plic, který může končit i smrtí je charakteristický pro legionářskou nemoc. K infekci může dojít vdechnutím vody z aerosolu nebo aspirací kontaminované vody při pití.

Patogenní mechanismus popsali v roce 1980 Horowitz a Silverstein, kteří zjistili, že po vstupu dýchacími cestami dochází k internalizaci mikroba plicními makrofágy, kde dochází k intracelulárnímu množení. Bezprostředně poté, kdy je legionela fagocytována makrofágem, zablokuje fúzi fagozomu s lyzozomem, čímž zabrání kontaktu s mikrobicidními systémy fagocytující buňky a poklesu pH. Dochází k asociaci s některými dalšími buněčnými organelami, např. endoplazmatickým retikulem, a tvorbě vlastního kompartmentu umožňujícího nejen růst, ale i množení bakterií. Po vyčerpání zásob hostitelských buněk, které už nemohou poskytovat bakteriím vhodně prostředí pro jejich existenci, bakterie hostitelskou buňku zabíjejí, opouštějí a infikují další fagocyty. Infekce intracelulárními patogeny vyvolává řadu interakcí mezi buňkami imunitního systému, především T lymfocyty, které vedou k sekreci cytokinů a toxických produktů (extracelulární proteázy, metaloproteázy), které se mohou výraznou měrou podílet na průběhu infekčního procesu jak v pozitivním, tak i negativním smyslu.

Listeria monocytogenes se řadí rovněž k fakultativním intracelulárním patogenům, infekce se však šíří alimentární cestou. Primárně se listerie vyskytují ve vodě, půdě, gastrointestinálním traktu zvířat, sekundárně jako kontaminace zejména v tepelně neupravených potravinách jako např. v měkkých zrajících sýrech a lahůdkářských výrobcích. Ke klinickým příznakům patří gastroenteritidy, avšak po překonání bariéry tenkého střeva je schopna listerie proniknout

lymfatickou a krevní cestou do sleziny a jater a vyvolat septikémie, meningitidy a meningoencefalitidy. Ohroženi jsou zejména jedinci s oslabeným imunitním potenciálem a těhotné ženy, protože listerie je schopna překonávat i bariéru placentární a vyvolat potrat nebo infikovat plod.

Stejně jako legionela, i listerie je primárně pohlcena profesionálním fagocytom a následně lokalizována ve fagocytární vakuole, fagozomu, a stejně jako ona musí vyvinout účinný systém obrany proti mikrobicidním mechanismům hostitelské buňky. V tomto případě však nedochází k inhibici fúze fagozomu s lyzozomem, ale lýze samotného fagozomu, která je způsobena listeriolysinem (LLO). Jedná se o protein produkovaný především virulentními kmeny listerií, jehož úloha spočívá nejen v perforaci membrány výše zmíněného fagozomu, ale rovněž v udržení vhodného pH, které zastaví maturaci fagozomu a tím i aktivaci mikrobicidních systémů buňky. Z rozpadlého fagozomu se pak bakterie dostávají do buněčného cytozolu, kde se množí a jsou obalovány aktinem, proteinem buněčného cytosketu. Aktinová vlákna posunují nejdříve bakterie k buněčné membráně hostitelské buňky a následně jim usnadňují průnik do sousedních, dosud neinfikovaných buněk.

Z hlediska závislosti imunitní odpovědi mezi patogenem a hostitelem je úlohou úspěšného patogena vyvinout takové mechanismy, které brání usmrcení hostitelské buňky, a tím i ztrátě schopnosti získávat v tomto prostředí živiny a odolávat obranným mechanismům hostitele. Na druhé straně přirozené a adaptivní obranné mechanismy hostitele směřují především k usmrcení infikované buňky, nebo alespoň lokalizaci infekce. Jak již bylo výše řečeno, hlavním obranným mechanismem podílejícím se na eliminaci intracelulárních infekcí jsou mechanismy buňkami zprostředkované imunity. Imunitní reakce je realizována především prostřednictvím cytotoxických CD8+ T lymfocytů, které jsou schopny rozpoznat a lyzovat infikované buňky. Vzhledem k tomu, že i životní cyklus intracelulární bakterie probíhá v určitých fázích provázených různou intenzitou exprese faktorů virulence, rozpad infikované buňky způsobený cytotoxickými T lymfocyty tak vede k předčasněmu přerušení tohoto cyklu a vyplavení bakterií s nízkým stupněm virulence, které jsou odstraňovány dalšími imunitními mechanismy. Významná je rovněž spolupráce T lymfocytů a antigen prezentujících buněk, které umožní rozvoj specifické adaptivní imunity a následně i tvorbu protilátek. U infekcí způsobených *L. monocytogenes* je úloha protilátek zanedbatelná a jak bylo zjištěno, podání usmrcených mikroorganismů k tvorbě protektivní imunity nevede. To je důvod, proč se ani neuvažuje o možnosti vakcinace proti této infekci. Na druhé straně se *Listeria monocytogenes* jako fakultativní intracelulární bakterie dokonale adaptovala na přežití v buněčném cytozolu, prostřednictvím fagocytózy je aktivně vychytávána buňkami prezentujícími antigen, a tudíž se uvažuje o jejím využití jako ideálního vektoru TSA (Tumor Associated Antigens) v imunoterapii nádorových onemocnění.

Infekce *Legionella pneumophila* vyvolává tvorbu značného množství protilátek a to i v případě, že infekce

proběhne inaparentně a laboratorní stanovení těchto protilátek nemá s diagnostického hlediska velký význam. Výše uvedení původci intracelulárních infekcí byli vybráni jako modeloví zástupci, na kterých byl demonstrován současný pohled na vznik a patogenizi těchto onemocnění, a který lze aplikovat prakticky na většinu onemocnění vyvolaných intracelulárními patogeny. Vzhledem k tomu, že účinná obrana proti těmto infekcím je realizována především mechanismy adaptivní imunity, predispozicí k těmto infekcím je zejména imunodeprese, ať již jako součást léčby (pacienti po transplantaci, onkologičtí pacienti) nebo projev onemocnění (AIDS, hemato-onkologické projevy). Riziko listerióvé infekce u těhotných žen je dáváno do souvislosti se změnami cytokinového spektra produkovaného T lymfocyty, které je v té době směřováno především k tzv. protizánětlivému Th2 typu imunitní odpovědi (charakterizován produkcí IL 4, IL 5), který je sice pozitivní z hlediska tolerance plodu mateřským organismem, na druhé straně však může zvýšit vnímavost vůči těmto infekcím. Změny cytokinového spektra ve smyslu Th2 odpovědi nejsou charakteristické jen pro těhotenství, ale mohou se vyskytovat u celé řady patologických stavů a k Th2 typu je směřována imunitní odpověď i ve stáří.

Literatura:

1. Macela A. a kol.. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií, Grada 2006, ISBN 80-247-0664-4
2. Roy C.R., Tilney L.G.: The road less traveled: transport of Legionella to the endoplasmic reticulum J.Cell Biology, 2002, 158, 3, 415-419
3. Singh R., Paterson Y.: Listeria monocytogenes as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy, ExpertRevVaccines, 2006, 5(4), 541-552
4. Smith J.L.: Foodborne infections during pregnancy, J.Food.Prot., 1999, 62(7), 818-29
5. Strugill-Koszycski S., Swanson M.S.: Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles, J.Exp.Med., 2000, 192,9, 1261-1272
6. Tilney L.G., Portnoy D.A.: Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes, J.CellBiol., 1989, 109, 597-608
7. Vieira O.V., Botelho R.J., Grinstein S.: Phagosome maturation: aging gracefully, Biochem.L., 2002, 366, 689-704
8. Votava M. : Lékařská mikrobiologie obecná, Neptun, 2001, ISBN 80-902896-2-2



Obr. 1 : Legionella uvnitř hostitelské buňky

PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍ MYKOBAKTERIA - JEJICH VÝSKYT A MEDICÍNSKÉ SOUVISLOSTI

MUDr. Jarmila Kaustová, Oddělení pro diagnostiku mykobakterií a Národní referenční laboratoř pro *Mycobacterium kansasii* ZÚ Ostrava

V současné době je známo více než 100 podmínečně patogenních mykobakteriálních druhů (PPM). Jsou přirozenou součástí životního prostředí.

Zdrojem infekce člověka je nejčastěji voda, a to jak vodovodní - studená nebo teplá: *M.gordonae*, *M.kansasii*, *M.xenopi*, mykobakteria komplexu *M.avium-intracellulare*, *M.haemophilum*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, tak přírodní vodní rezervoáry-jezera, řeky, mořská voda, přírodní koupaliště a bazény- *M.marinum*, rychle rostoucí PPM.

Zájmová činnost - styk s infikovanou vodou, živočichy, rostlinami, ranné infekce-půda, prach: *M.marinum*, *M.simiae*, komplex *M.avium-intracellulare*, *M.ulcerans*, *M.fortuitum*, *M.mucogenicum*, *M.malmoense*, *M.bohemicum*.

Nosokomiální infekce - kontaminovaná voda, roztoky, katétry, instrumentaria - bronchoskopy, endoskopy, kontaminované přístroje - dialýza, dentální zákroky, implantáty -umělé nebo živočišného původu: *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.xenopi*, *M.terrae*, *M.gordonae*, *M.avium*, *M.lentiflavum*, *M.haemophilum*, *M.smegmatis*, *M.neoaurum*, *M.peregrinum*, *M.szulgai*, *M.aurum*, *M.neoaurum*, *M.thermoresistibile*, *M.brumae*, *M.mageritense*, *M.goodii*.

Kosmetické zákroky - kontaminovaná voda, instrumentaria, sérové a jiné přípravky: *M.smegmatis*, *M.cosmeticum*, event. další PPM druhy.

Profesionální infekce - kontakt se zvířaty, infikovanými PPM komplexu *M.avium-intracellulare*, event. konzumace jejich produktů (např.vajec), rybolov a akvaristika- *M.marinum*, event. i rychle rostoucí PPM, práce v prašných prostředích - těžký průmysl - hutě, kamenouhelné i povrchové doly, úpravy prašných vozovek - *M.kansasii*, rychle rostoucí druhy PPM.

Výše uvedené mykobakteriální druhy mohou být u infikovaného jedince příčinou dlouhodobé kolonizace, ale také - zejména u imunokompromitovaných jedinců - lokalizovaného nebo i víceorgánového onemocnění s problematickou terapií, vzhledem k časté primární rezistenci těchto druhů na antibakteriální léky.

K onemocnění po kontaktu se zdrojem PPM dochází většinou u osob s oslabenou celkovou nebo lokální imunitou, zejména HIV pozitivních, u pacientů léčených imunosupresivními léky po transplantacích a z jiných indikovaných terapeutických důvodů (steroidy, aj.).

Kolonizace:

přechodná nebo dlouhodobější - je nejčastější u osob s chronickým plicním onemocněním, zdrojem je nejčastěji voda - teplá nebo pitná. Jedná se o osídlení společných míst PPM s ostatní mikroflórou, bez invaze do tkání.

Pseudoinfekce:

kultivační průkaz PPM ve vyšetřovaném vzorku, který byl odebrán do kontaminované odběrové nádoby kultivační průkaz PPM ve vyšetřovaném vzorku sputa - vypláchnutí dutiny ústní před expektorací vodovodní vodou kontaminovanou PPM (nejčastěji *M.gordonae*) PPM kontaminované roztoky, pomůcky a instrumentaria: hemodialýza - vodní a jiné roztoky použité pro promytí filtrů, injekční roztoky, roztoky pro označení místa chirurgického řezu, spray pro anestézii, infikované implantáty a transplantáty, endoskop nebo bronchoskop kolonizovaný PPM, jiné pomůcky a instrumentaria použité při vyšetření nebo chirurgickém zákroku, akupunktura. Kanyly, permanentní katétry, apod., PPM kontaminovaná pitná voda - zejména na jednotkách JIP a ARO. Onemocnění (u člověka i zvířete): postižení různých orgánů.

Pro zajištění optimálního výsledku mykobakteriologického vyšetření je nutné:

zajistit správný odběr vzorku do sterilní odběrové nádoby a rychlý transport do laboratoře s dodržением podmínek předepsaných pro transport dostatečná kvantita vzorku u mimoplicních vzorků je nutné uvedení lokalizace onemocnění.

Proč?

Ve vzorcích z kůže, podkoží, event. z periferních lymfatických uzlin je možno očekávat přítomnost *M.marinum*: vzorek musí být paralelně kultivován při 37 a 30-33°C. Ve vzorcích z kůže, podkoží, lymfatických uzlin, punktátů z kloubů je možno očekávat přítomnost *M.haemophilum*: je nutná paralelní kultivace vzorku při 37°C aerobně a při 30-33°C s přidáním heminu za mikroaerofilních podmínek. Pokud nejsou dodrženy výše uvedené kultivační podmínky, není možno přítomnost těchto mykobakteriálních druhů ve vzorku detekovat. Paralelně provedené histologické vyšetření může prokázat přítomnost acidorezistentních tyčinek ve vzorku tkáně, ale neurčí mykobakteriální druh, jeho citlivost na antituberkulotika a další antimykobakteriální léky - důležité informace pro nasazení adekvátní terapie.

V České republice byl od konce šedesátých let minulého století zaznamenáván vzestupný trend onemocnění vyvolaných *M.kansasii*. Ze 650 infikovaných osob v letech 1984-1989 bylo 468 léčeno pro plicní onemocnění, a po jednom pro onemocnění kůže, uteru a epididymitis. Nejvyšší incidence byla v SM kraji. V centru endemické oblasti - okrese Karviná- byla na začátku 90tých let incidence onemocnění vyšší než incidence tuberkulózy. *M.kansasii* bylo opakovaně izolováno ze vzorků vody a z biofilmů odebraných v domácnostech a na pracovištích pacientů (např. v r.1997 Chobot a spol. popsali izolaci *M.kansasii* ve 43,7% ze 1 231 vzorků odebraných na dolech a v železárnách).

V souboru nemocných převažovali zaměstnanci důlních a hutnických profesí.

V posledních letech dochází k pozvolnému poklesu počtu onemocnění v ČR i Moravskoslezském kraji (MSk), který však nadále vykazuje nejvyšší procento onemocnění hlášených do Registru tuberkulózy ČR.

Ve světové literatuře jsou popsána onemocnění různých lokalizací: kromě plicních forem, které jsou nejčastější, onemocnění kloubů, kůže, osteomyelitidy, perikarditidy, fatální septikémie, lymfadenitidy.

Od poloviny 90tých let se v MSk se postupně zvyšuje počet osob, u nichž je izolováno mykobakterium komplexu *M.avium - intracellulare*. Onemocnění jsou rovněž nejčastější v plicní lokalizaci, setkali jsme se však i s onemocněním lymfatických uzlin, kůže, nosu. V zahraniční literatuře byla popsána kromě plicních onemocnění také onemocnění středního ucha, retrofaryngeální abscesy, lymfadenitidy. Na rozdíl od *M.kansasii*, které je poměrně dobře citlivé na antituberkulotika (AT) základní i doplňkové řady, vykazují mykobakteria komplexu *M.avium-intracellulare* většinou rezistenci s dosti vysokými hodnotami minimálních inhibičních koncentrací (MIC) in vitro na AT i další antibakteriální léky, jejich terapie je problematická, dlouhodobá a v řadě případů i neúspěšná. Zdrojem nákazy mohou být nejen zvířata, ale také voda, a to nejen v přírodě, ale také vodovodní, což uvádí nejen zahraniční literatura, ale také naše výsledky vyšetření.

Dalším mykobakteriálním druhem, s nímž se setkáváme často ve vzorcích pacientů z okresu Ostrava od počátku devadesátých let, je *M.xenopi*. Přestože se počet osob s jednorázovou nebo opakovanou izolací v průběhu dalších let postupně zvyšoval, procento onemocnělých je podstatně nižší, než u osob s izolací *M.kansasii*. Jeho citlivost na AT in vitro je poměrně dobrá, terapeutické výsledky však nejsou vždy stejně uspokojivé. Onemocnění byla popsána v ČR rovněž v Severočeském kraji (v devadesátých letech) a na území Prahy v devadesátých a dalších letech. Ve světové literatuře je *M.xenopi* popsáno jako původce plicních onemocnění, méně často mimoplicních a diseminovaných infekcí.

V okrese Ostrava bylo *M.xenopi* izolováno opakovaně ze vzorků teplé vody a biofilmů odebraných ve výměňkových stanicích, v domácnostech pacientů, v nemocnicích a v poliklinických zdravotnických zařízeních. Vzhledem k tomu, že tento mykobakteriální druh preferuje při růstu in vitro teploty nad 37°C a může dlouhodobě přežívat i při teplotě 65°C, je možnost jeho eliminace z vodovodní vody poměrně složitým problémem.



kožní onemocnění vyvolané *M.kansasii*
foto - Tyl R.: 2004



růst *M.kansasii* na
Löwenstein Jensenově půdě

Zvýšený zájem o akvaristiku v posledních letech se projevuje v laboratorní diagnostice izolací *M.marinum*. Několik případů, s nimiž jsme se setkali, nás vedlo k závěru, že frekvence onemocnění vyvolaných *M.marinum* je pravděpodobně častější, ale při diferenciální diagnostické úvaze se často nemyslí na tuto možnou etiologii, a také nejsou vždy dodržovány v laboratořích podmínky kultivace suspektních vzorků.



kožní onemocnění vyvolané
M.marinum na noze pacienta



kožní onemocnění vyvolané
M.marinum na horní končetině
pacienta. foto- M.Canibal



Löwenstein Jensenově půdě

S rychle rostoucími mykobakteriálními druhy (RRM) jsme se v minulosti v naší laboratoři setkávali ve vzorcích pacientů zřídka, a jejich nález byl považován dle konzultace s ošetřujícím lékařem za pseudoinfekci.

Během posledních 5let jsme však izolovali u jednoho pacienta s permanentním katérem opakovaně *M.abscessus* ze vzorků moči a sput - nález byl považován za klinicky signifikantní a vývoj plicního onemocnění byl infaustní. U další pacientky, která rovněž zemřela, bylo opakovaně z rány izolováno *M.chelonae*. Jednalo se o hospitalizované pacienty z různých lůžkových zařízení MSk. U dvou dívek, jedné 12leté a jedné 13leté, jsme izolovali z krční lymfatické uzliny *M.chelonae*. V obou případech se jednalo o onemocnění po extrakci zubu úspěšně zvládnuté extirpací postižené uzliny s následnou AT terapií. Sdělení zahraničních autorů, kteří se zabývají problematikou kontaminace vodovodních systému PPM, upozorňují na zvýšené riziko, kterému je vystaven pacient a zdravotnický personál na dentálních jednotkách s vodovodním systémem kontaminovaným PPM. U 28leté pacientky s plicním nálezem bylo izolováno *M.mucogenicum*. Zdroj infekce nebyl prokázán. Hypoteticky by bylo možno uvažovat o dvou možnostech: kontaminaci vodovodního systému v domácnosti, která nebyla při jednorázovém odběru vody potvrzena nebo kontakt s kontaminovanou vodou v maďarských termálních lázních, kde pacientka pobývala několik měsíců před začátkem onemocnění. Terapie AT a dalšími antibakteriálními léky, která trvala 12 měsíců vedla k regresi plicního nálezu.

Terapie onemocnění vyvolaných RRM je velmi problematická vzhledem k vysokým hodnotám rezistence na většinu AT, ale také na celou řadu dalších antibakteriálních léků. Na nebezpečí těchto nákaz, jejich nárůst a problematickou terapii upozorňuje řada zahraničních pracovišť. Nejčastěji jsou popisovány nosokomiální a posttraumatické infekce.

Rozvoj vyšetřovacích metod v oboru mikrobiologie tuberkulózy a mykobakterióz, zaměřený

během posledních let zejména na molekulárně biologické metody, umožnil nejen zrychlení identifikace izolovaných mykobakteriálních kmenů, ale také rozšířil spektrum poznaných druhů.

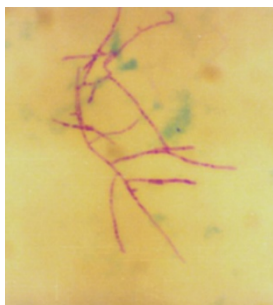
Na Oddělení pro diagnostiku mykobakterií a NRL pro *M.kansasii* ZÚ Ostrava byly identifikační genové metody GEN Probe (fa BioMérieux) a sety firmy HAIN, Lifescience, zaváděny do rutinní praxe průběžně po zveřejnění jejich nabídky. I když spektrum mykobakteriálních druhů, které je jimi možno identifikovat (včetně kmenů komplexu *M.tuberculosis*) neumožňuje identifikaci všech dosud známých mykobakteriálních druhů (které je pak nutno identifikovat klasickými metodami - v některých případech nelze kmen druhově spolehlivě zařadit), představují tyto metody podstatné zkvalitnění diagnostiky mykobakterií. Spolehlivou identifikaci všech kmenů umožňuje metoda spoligotyping, pro kterou je nutné adekvátní přístrojové vybavení, které je finančně náročné. Bylo by adekvátní v podmínkách ČR na jednom centrálním pracovišti, které by metodu provádělo. V minulosti jsme využívali možnosti identifikace touto metodou při spolupráci s Univerzitním pracovištěm v Regensburgu, SRN. V jednom případě byl touto metodou identifikován také nový - do té doby neznámý - mykobakteriální druh - *M.bohemicum*. V naší laboratoři jsme *M.bohemicum* izolovali ze vzorků sput nebo bronchiálního sekretu šesti pacientů, z nichž u jednoho byla izolace kmene hodnocena jako klinicky signifikantní, léčba AT byla úspěšná. Námi používanými genovými identifikačními metodami jsme druhově určili několik mykobakteriálních druhů, s nimiž jsme se v minulosti v klinickém materiálu nesetkali:

M.celatum:

pomalou rostoucí nonchromogenní PPM jsme izolovali u dvou pacientů ze vzorků z dýchacích cest: u pacienta s AIDS, jednorázově-před zahájením preventivní AT terapie; pacient zemřel na základní onemocnění, a u pacienta s klasickou tuberkulózou v anamnéze, kde byla před aktinoterapií karcinomu zahájena preventivní AT terapie, k rozvoji mykobakteriálního onemocnění nedošlo, pacient zemřel na karcinom.



růst *M.celatum* na Löwenstein Jensenově půdě



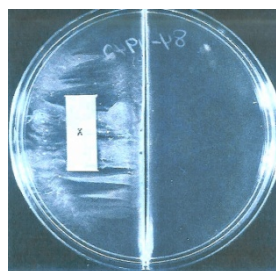
M.celatum - mikroskopický obraz, barvení dle Ziehl Neelsena, zvětšení 1 000x

M.malmoense

je pomalu rostoucí PPM, které je častěji izolováno u pacientů v západních a severních evropských státech. Ze 4 pacientů, u nichž jsme tento druh izolovali, nevycestoval nikdo mimo hranice ČR. Dva pacienti s plicním nálezem zemřeli, přestože byli léčeni AT, u jednoho, který změnil bydliště, jsme se výsledek terapie nedověděli, u jedné pacientky s onemocněním krčních lymfatických uzlin byla terapie-exstirpace postižené uzliny + aplikace AT- úspěšná.

M.haemophilum

bylo izolováno poprvé v ČR - u 12letého chlapce s bydlištěm v Ostravě z exstirpované krční lymfatické uzliny v roce 2000. U 43leté pacientky s dvouletou anamnézou kožní eflorescence ve spánkové oblasti došlo po 12měsíční AT terapii k vymizení všech příznaků onemocnění. 32letý muž měl po otevřeném poranění v oblasti kotníku otoky kolenního a hlezenního kloubu. Materiál z punkce kolena prokázal přítomnost *M.haemophilum*. Po 12měsíční terapii AT došlo k úplnému vyhojení procesu bez funkčního postižení kloubů. Další onemocnění jsme prokázali u 49leté pacientky, která měla kožní eflorescenci na obličeji a zvětšenou submandibulární uzlinu. Exstirpace postižené uzliny a léčba AT vedly k úspěšnému vyléčení onemocnění.



M.haemophilum - růst na Middlebrookově půdě s X-faktorem



M.haemophilum - mikroskopický obraz - barvení dle Ziehl Neelsena zvětšení 1 000x

Cílem sdělení je upozornit, že podmíněně patogenní mykobakteria mohou být etiologickým agens onemocnění člověka. Jejich interhumánní přenos nebyl prokázán, zdrojem infekce je životní prostředí s nímž je člověk v trvalém úzkém kontaktu. Zahraniční autoři upozorňují zejména na nezanedbatelný podíl PPM na nosokomiálních nákazách.

Problematické nález vyvolaných PPM je věnována v naší odborné literatuře poměrně malá pozornost. Literaturu zahraniční (která není v textu citována z důvodu omezení rozsahu sdělení) je autorka ochotna zájemcům na vyžádání poskytnout.

Za spolupráci děkuje autorka p. Zdeňce Navrátilové.