

# Nokardie — smrtící krásky

Josef Scharfen jr.

Bakteriologie je obor náročný pro svou pracnost, variabilitu zkoumaných mikrobů a komplexnost interpretace nálezu zejména v souvislosti s klinickými případy onemocnění. Barevnost a tvarová rozmanitost objektů v mikroskopických preparátech, kolonií vyrostlých na kultivačních půdách a změny barev biochemických testů používaných k identifikaci bakterií přitahují podobně jako jiné původně morfologicky orientované obory (histologie) zejména lidi s vizuální představitostí. Milovníci aktinomycet (název aktinomycety sice navozuje představu mykotických organismů, nejde však o houby, ale o větvičky se bakterie) si z estetického hlediska přijdou na své. Tvary a barvy vláknitých bakterií a obzvláště nokardií jsou velmi pestré. Morfologické studium však k identifikaci nokardií příliš nepřispívá pro značnou variabilitu znaků silně ovlivněnou okolními podmínkami (zejména složením kultivačních médií).

Fylogenetická klasifikace řadí vláknité bakterie do řádu *Actinomycetales*, který obsahuje 10 podřádů — medicínsky zajímavé jsou především podřady *Actinomycineae* a *Corynebacterineae*, kam patří i čeleď *Nocardiaceae* s rodem *Nocardia*.

Nokardie se svými vlastnostmi řadí mezi tzv. aerobní aktinomycety (vyžadující kyslík). Kromě aerobních, které se většinou vyskytují v přírodě (streptomycety, nokardie, rhodokoky), existují ještě mikroaerofilní (rostoucí při sníženém obsahu kyslíku v kultivační atmosféře) nebo anaerobní aktinomycety rodu *Actinomyces*, které se běžně vyskytují v ústní dutině člověka a mohou vyvolat onemocnění — aktinomykózu. Na rozdíl od těchto patogenních aktinomycet jsou nokardie přísně aerobní a vyskytují se všude v přírodě, zejména v půdě či v odpadních vodách. Mohou však být i patogeny zvířat, např. ryb či mlžů. Některé druhy nokardií vyvolávají často smrtelné onemocnění u pacientů s oslabenou imunitou (jde o infekci pocházející z vnějšího prostředí), a to zejména u osob po orgánových trans-

plantacích, kde byla imunita uměle potlačena, aby se zabránilo odhojení transplantátu. Právě v těchto případech je velmi důležitá rychlá diagnostika nokardiózy spojená se správným určením druhu, protože různé druhy nokardií mají typický vzorec rezistence (odolnosti) na antibiotika. Zjištění druhu nokardie tak umožňuje rychlé nasazení účinné antibiotické terapie.

Fenotypová diagnostika a identifikace vycházející z morfologických, fyziologických a biochemických vlastností je u nokardií velmi obtížná, protože tyto bakterie v kultuře na bakteriologických půdách rostou špatně a pomalu a testy běžně používané v klinické mikrobiologii obvykle selhávají kvůli omezeným metabolickým projevům nokardií v běžných biochemických reakcích. Právě z těchto důvodů jsou desítky nově izolovaných druhů nokardií klasifikovány zejména pomocí molekulárně genetických metod, které se stále více prosazují i při jejich rychlém určování z klinického materiálu.

## Historie a současná taxonomie nokardií

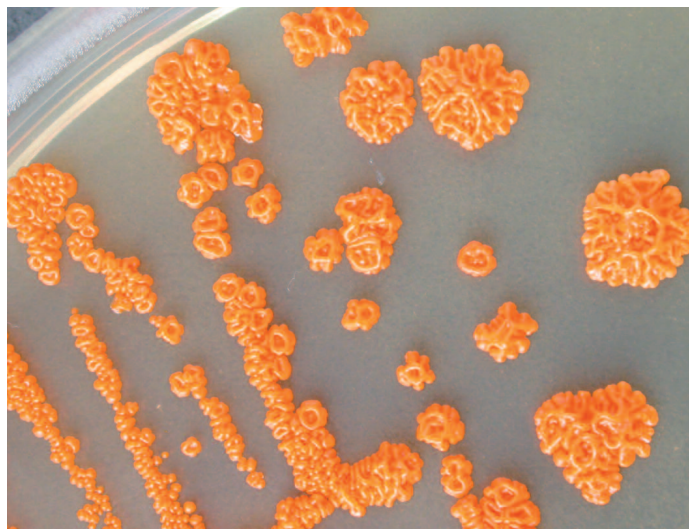
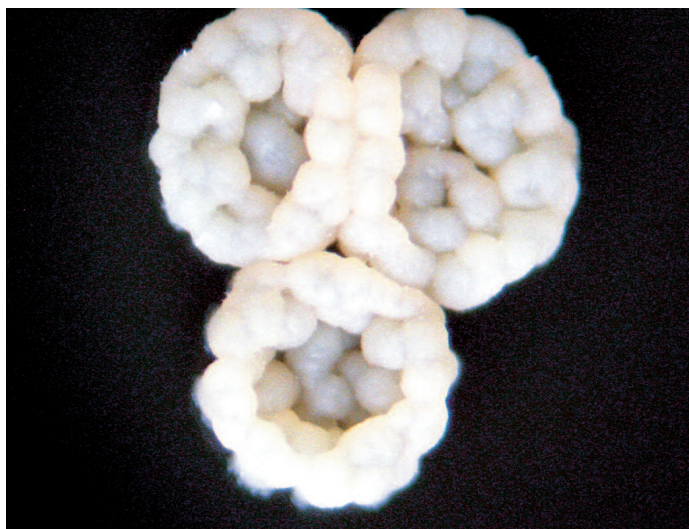
Nokardie poprvé popsal francouzský veterinář a spolupracovník Louise Pasteura



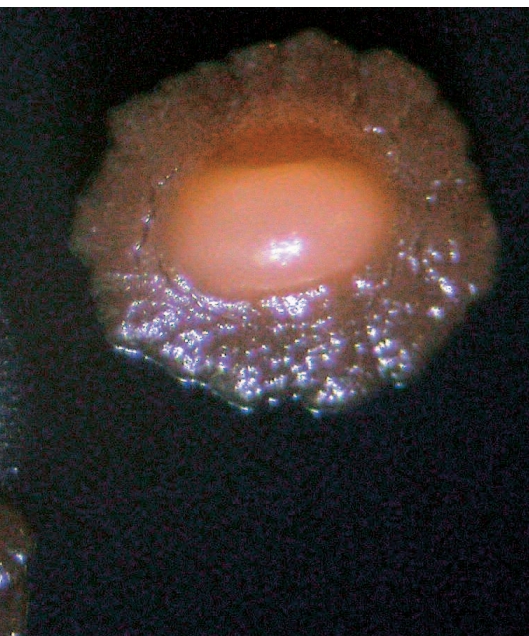
Edmond Nocard pod jménem *Streptothrix farcinica*. Tyto bakterie vyvolávaly onemocnění krav. Postupně se ukázalo, že se podobné onemocnění může vyskytovat i u lidí. Z nemocných byly izolovány podobné větvičky se mikroorganismy, které byly nazvány na počest E. Nocardia *Nocardia asteroides*.

Ještě v 70. letech 20. stol. bylo známo pouze několik pro člověka patogenních druhů nokardií: již zmíněná *N. asteroides*, dále *N. brasiliensis* vyvolávající tropické onemocnění bosých nohou — traumaticky vzniklý zánět vazivové tkáně, tzv. mycetom (jiným jeho vyvolavatelem mohou být plísně), a *N. caviae* (dnes *N. otitidiscaviarum*). Rozdílná citlivost na antibiotika u různých kmenů nokardií uvnitř jednoho druhu však naznačovala, že ve skutečnosti jde o skupiny blízké příbuzných druhů, což mikrobiologové vyjádřili termínem druhový komplex. Bakteriální taxony byly původně popsány na základě morfologických a fyziologických vlastností, hlavním měřítkem byl např. vztah k určitému onemocnění. Teprve s širším uplatněním metod molekulární genetiky dostali specialisté do rukou nástroj fylogenetické klasifikace, vhodný k rozlišení jednotlivých druhů uvnitř komplexů.

Kolonie sbírkového kmene původně vedené pod názvem *Nocardia asteroides*, 5 mm velké kolonie po 14denní kultivaci







*Nepatogenní Nocardia cerredoensis* izolovaná z brazilské půdy zvané cerrado. Bílá kolonie (původní velikost cca 4 mm) je pokryta chmýřitým aeriólním (vzdušným) myceliem. Běžová lesklá kolonie bez aeriólního mycelia je růstovou variantou stejné bakterie

S podrobnějším studiem nokardií tak dochází v jejich klasifikaci k neustálým změnám. Hlavní příčinou byl nedostatek vhodných stabilních fenotypových charakteristik při ustavení původních druhů. Dnes se pro fenotypovou taxonomii a identifikaci používají hlavně testy využití některých látek (cukrů, aminokyselin) jako jediného zdroje uhlíku pro stavbu bakterií a kvašení cukrů, chemotaxonomie buněčné stěny (peptidoglykan nokardií obsahuje meso-diaminopimelovou kyselinu, arabinózu a galaktózu), testy na přítomnost mykologických či mastných kyselin a další postupy, které se nedají použít v rutinním provozu laboratoří. Takové vyšetření fenotypu je pracné, časově náročné a často neumožňuje spolehlivě rozlišit jednotlivé druhy.

U pomalu rostoucích, obtížně kultivovatelných a identifikovatelných a zejména

*Nocardia nova* — na některých koloniích je patrný oranžový pigment, na jiných bílé aeriólní (vzdušné) mycelium. Kmen pochází z plíce pacienta bez příznaků onemocnění



u nekultivovatelných bakteriálních druhů je dnes jediným konečným taxonomickým řešením použití molekulárně genetických metod. Využívají je zejména mikrobiologové, kteří se zabývají mikrobiálním osídlením životního prostředí (a to nejen vody a půdy, ale i ledu a hornin v Antarktidě nebo horkých vývěrů na dně oceánů). Zde všude žijí bakterie a pouze zlomek z nich dokážeme kultivovat *in vitro*.

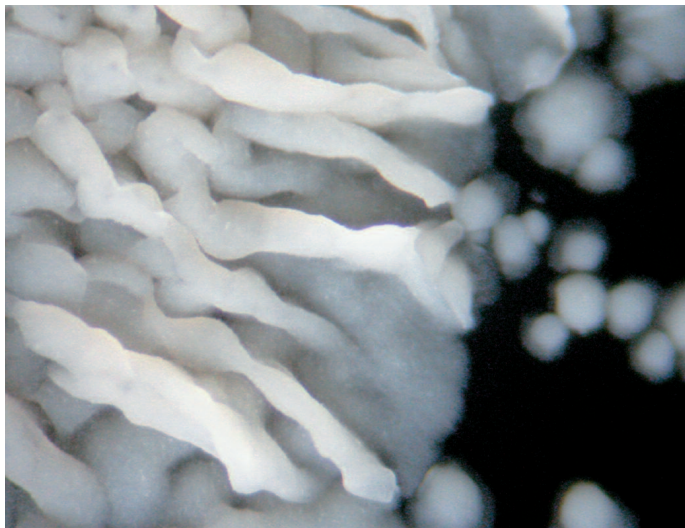
Již od poloviny 20. stol. se začala používat k odlišení bakteriálních druhů analýza DNA. Se zavedením sekvenace genů na automatických přístrojích se metodou pro klasifikaci i určení zejména u obtížně identifikovatelných bakterií stalo sekvenování genů kódujících rRNA ribozomální podjednotky 16S a 23S. Důvodem je konzervativnost těchto genů v evoluci. Syntéza bílkovin ribozomy je nezbytná pro přežití a většina mutací v tomto genu je tak pro bakterii neslučitelná se životem. Proto se tyto geny v evoluci příliš nemění, sekvence bází je druhově specifická a může se stát podkladem pro bakteriální systematiku. Samozřejmě i využití sekvenace genu 16S a 23S rRNA má svá úskalí, proto se sekvenují i jiné geny. Výsledkem jsou knihovny přečtených sekvencí korespondující s klasickým popisem morfologických a fyziologických vlastností bakterií. Molekulárně genetický popis druhu, rodu, čeledi se stal fylogenetickou páteří

*Nocardia otitidiscaviarum* — 10 mm velká kolonie po třech týdnech na agarové půdě s kvasnicovým extraktem má typický plísňový vzhled s aeriólním myceliem na povrchu kolonie. Dojem plísně umocňuje sklepní zápach při otevření Petriho misky

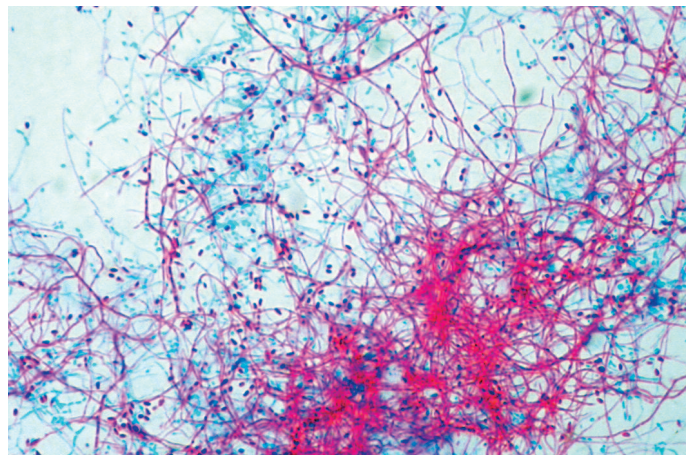
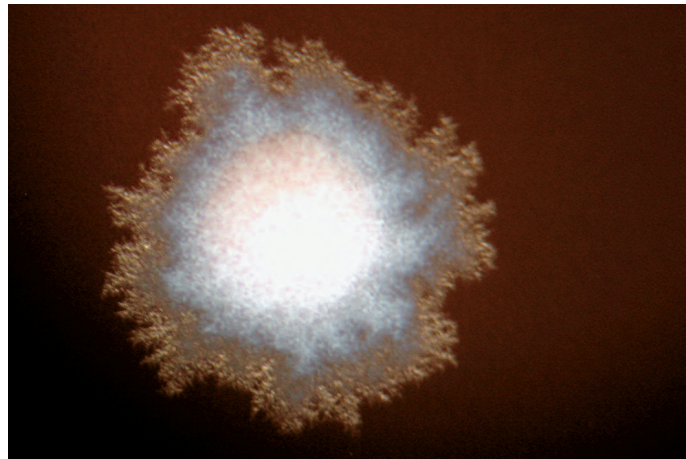
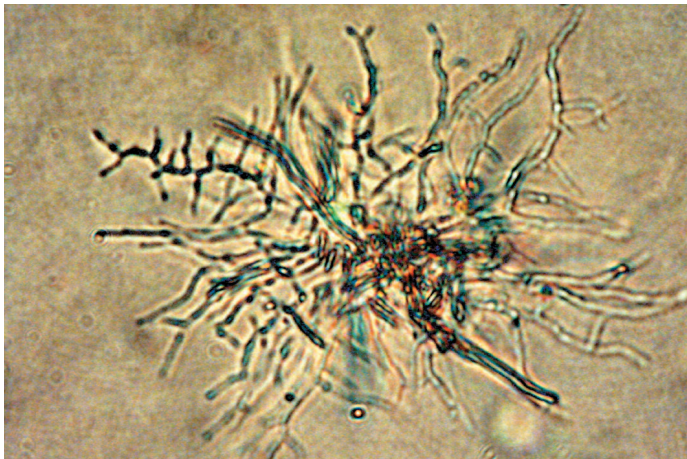
bible bakteriologických taxonomů — opakovaně vydávané Bergeyho příručky systematické bakteriologie (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

Vědecká taxonomie se skládá z klasifikace bakterií (rozdělení podle taxonomických kritérií zahrnujících morfologické, fyziologické a molekulárně genetické charakteristiky) a nomenklatury (pojmenování čeledí, rodů a druhů). Součástí taxonomie je rovněž identifikace izolátů z prostředí a klinického materiálu porovnáním s již popsányými typovými kmeny. Moderně se spojení těchto přístupů označuje jako polyfázová taxonomie, která zahrnuje všechna uvedená i další kritéria a metody, jejichž výsledky se navzájem mezi sebou potvrzují a spojují v rozsáhlých databázích umožňujících zjistit neznámé bakterie porovnáním s vlastnostmi již popsanych mikroorganismů (např. databáze sekvencí bází GenBank, EMBL, RIDOM nebo komerční databáze k biochemickým

Zvlněný okraj kolonie nokardie se skládá z obromnoho počtu mikroskopických vláken







Nahoře mikrokolonie nokardie po 48 hodinách kultivace tvořená vlákní o tloušťce 1  $\mu\text{m}$ . Vláknina časného vzdušného mycelia třelí do prostoru, je patrné tzv. sekundární větvení, kdy větvičky odstupují z osového vlákna v pravém úhlu  $\blacklozenge$  Dole *Nocardia cyriacigeorgici*, jeden z častých vyvolavatelů nokardiózy v Evropě a v Severní Americe. Dobře vyvinutá kolonie po třech týdnech kultivace na živném agaru

identifikačním testům a databáze mastných kyselin zjišťovaných chromatograficky). Část těchto databází je volně dostupná na internetu a umožňuje odborníkům porovnat vlastní údaje s daty uloženými v databázích. Statistickou analýzou těchto dat se zabývá bioinformatika, která je mikrobiologii již velmi vzdálena. Klasický obraz bakteriologa podle příkladu Roberta Kocha, tedy osamělého vědce namáčeujícího svou bradku v plesnivějších Petriho miskách, zkumavkách a křivulích, který docházel ke svému poznání celoživotní empirií na základě svých smyslů (zraku, hmatu, čichu), byl tedy již dávno nahrazen týmy specialistů bohužel již často odtržených od laboratorního stolu, spolupracujících v celosvětové počítačové síti, zkoumajících a porovnávajících rozsáhlé soubory bakteriálních kmenů ve sbírkách s nově izolovanými, někdy dosud nepopsanými kmeny. Na základě výsledků takové týmové práce jsou popisovány nové taxony ve světově uznávaném taxonomickém periodiku International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Součástí polyfázové charakteristiky druhu jsou i jednodušší laboratorní metody, s nimiž lze orientačně identifikovat rutinně vyšetřované bakteriální izoláty.

Před nástupem molekulárně genetických metod bylo v Bergeyho příručce systematické bakteriologie popsáno několik druhů

nokardií, dnes je jich přes 50. Více než dvě třetiny z nich byly přitom popsány v posledních třech letech.

Nokardie lze obecně rozdělit na dvě skupiny. Do první řadíme druhy z přírody, které běžně nevyvolávají infekce u lidí. Mezi ně patří např. *Nocardia cerradoensis*, izolovaná z půdy cerrado v Brazílii, *N. fluminosa*, *N. crassostreae* vypěstované z ústřic, *N. salmonicida* z lososů a četné další druhy. Ve druhé skupině jsou jednak tropické nokardie vyvolávající již dříve zmíněný mycetom (*N. brasiliensis*), jednak druhy, které vyvolávají systémovou nokardiózu u nemocných s oslabenou imunitou po celém světě. V Evropě se nejčastěji vyskytují *N. farcinica* (44 %), *N. nova* (22 %) a *N. cyriacigeorgici* (15 %), která se nejvíce podobá typovému kmeni *N. asteroides*. Některé z těchto druhů lze s vysokou mírou pravděpodobnosti zařadit pomocí fenotypových identifikačních metod do druhových komplexů, např. *N. nova* komplex, *N. asteroides* komplex, *N. transvalensis* komplex apod. Nokardie uvnitř těchto komplexů mají obvykle i podobný fenotyp rezistence na antibiotika. Jejich další určení je však nemožné bez použití sekvenace genu pro 16S rRNA.

#### Nokardióza a mikrobiologie prostředí

Nokardie představují v případech lidských onemocnění činitele vzácného, ale o to závažnějšího. Nokardióza je systémové onemocnění, které obvykle začíná v plicích jako abscedující pneumonie (rozpadový zánět plic). Zda systémové nokardióze předchází kolonizace horních dýchacích cest nokardiemi není jasné, ale je to pravděpodobně a napovídají tomu i naše zkušenosti.

Nahoře kolonie se všemi typy mycelia (bílé vzdušné mycelium, vlastní kolonie, substrátové mycelium na povrchu média), tzv. submerzní neboli vnořené mycelium je pod kolonií a vrůstá do média tak, že kolonie lze odloučit pouze vytržením s kusem živné půdy  $\blacklozenge$  Dole *Nocardia nova* z abscesu mozku pacienta s nokardiózou po transplantaci ledvin. Zvětšeno 2 000 $\times$ , barveno na částečnou acidorezistenci podle Kinyouna. Červeně zbarvená vlákna se rozpadají do kulovitých útvarů. Snímky J. Scharfena jr.

Stává se totiž, že nokardie vyrůstají na kultivačních půdách u nemocných vyšetřovaných na přítomnost mykobakterií (pacienti po prodělané tuberkulóze, ale i taci, u nichž mykobakterie nikdy prokázány nebyly). Vyšetřovaní jsou obvykle bez příznaků onemocnění, dá se však u nich předpokládat stejný typ snížené imunity jako u lidí vnímavých na tuberkulózu.

Léčba nokardiózy je obvykle kombinací chirurgického zákroku s účinnou antibiotickou léčbou. Před nástupem sulfonamidů byla úmrtnost u plicní nokardiózy 100 %, s jejich použitím klesla na 50 % a dnes s užitím kombinací antibiotik dále klesá. Vzhledem k tomu, že jednotlivé druhy nokardií se liší rezistencí na různé skupiny antibiotik, je žádoucí rychlá druhová identifikace původce spolu se stanovením typického vzorce citlivosti. A protože se používané postupy vymykají rutinní praxi pracovišť klinické mikrobiologie, zůstává jejich hlavním úkolem průkaz pravděpodobného původce onemocnění a orientační určení podle fenotypu rezistence do komplexů. Potom je kmen zaslán na přesné určení do referenční laboratoře. O unikátní sbírce patogenních aktinomycet v Národní referenční laboratoři v Trutnově se dočtete na str. XXVII kulěrové přílohy.