

První izolace *Nocardia transvalensis* v České republice z abscesu mozku u pacienta po transplantaci ledvin

First isolation of Nocardia transvalensis in the Czech Republic from a brain abscess of a kidney transplant recipient

Josef Scharfen ml., Tamara Bergerová, Martin Bunčec, Pavla Urbášková, Tomáš Reischig, Hana Stárková

Souhrn • Summary

Šedesátiletý muž s diabetem II. typu a chronickou insuficiencí ledvin podstoupil po selhání prvního štěpu ledviny druhou transplantaci ledviny. 14 měsíců po transplantaci byly na CT prokázány v pravém frontálním laloku mnohočetné abscesy mozku. Z aerobní kultivace byly zachyceny vláknité grampozitivní bakterie předběžně zařazené podle své rezistence na amikacin do *Nocardia transvalensis* komplexu. Identifikace *N.transvalensis* byla potvrzena sekvencováním částí genů pro 16S rRNA a *rpoB*. Pacient byl léčen kombinací i.v. meropenemu a p.o. kotrimoxazolu ve spojení s antiedematózní terapií. Po 11 týdnech byl pacient v dobrém klinickém stavu a s úplnou regresí neurologické symptomatologie propuštěn do domácí péče. *N.transvalensis* je zachycována z klinického materiálu velmi vzácně. Toto je první případ záchytu *N. transvalensis* v České republice.

A 66-year-old man with type 2 diabetes and chronic renal insufficiency underwent a second kidney transplantation after kidney graft failure due to chronic glomerulonephritis. Fourteen months after transplantation, a CT scan revealed multiple cerebral abscesses in the right frontal cerebral lobe. Aerobic culture yielded filamentous gram-positive bacteria presumptively identified as the Nocardia transvalensis complex, based on their resistance to amikacin. The bacterium was confirmed by partial sequencing of the 16S rRNA and rpoB genes as N. transvalensis. The patient was treated with the combination of intravenous meropenem and oral co-trimoxazole and anti-edema therapy. After 11 weeks, the patient was discharged to home care in good clinical condition with complete regression of neurological symptoms. N. transvalensis is rarely detected in clinical specimens. This is the first report of N. transvalensis isolate in the Czech Republic.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(9): 290–294.

Klíčová slova: *Nocardia transvalensis*, první záchyt v České republice, antibiotická rezistence, 16S rDNA sekvenční, *rpoB* sekvenční, GenBank, RIDOM, terapie
Keywords: *Nocardia transvalensis*, first identification in the Czech Republic, antibiotic resistance pattern, 16S rDNA sequence, *rpoB* sequence, GenBank, RIDOM, therapy.

ÚVOD

Nocardia transvalensis je velmi vzácným původcem nokardiózy. Její první záchyt v dané geografické oblasti je obvykle důvodem k publikaci. *N.transvalensis* je druh vysoce rezistentní na používaná antibiotika včetně amikacinu, který je jedním z léků volby u systémových případů nokardiózy [10].

STRUČNÁ KAZUISTIKA

Šedesátiletý muž s diabetem II typu a renální insuficiencí po chronické glomerulonefritidě byl intermitentně dialyzován pod dobu 2 let. Po první transplantaci kadaverózní ledviny, štěp selhal měsíc po transplantaci kvůli trombóze a renalis. O rok později byla provedena druhá transplantace. Počáteční imunoprese zahrnovala Tacrolim, mykofenolát - mofetil a kortikosteroidy spolu s indukční terapií králičím antithymocytárním globuli-

nem (ATG). Byla zavedena profylaxe CMV infekce p.o. Gancyklovirem, profylaxe gastrointestinální kandidózy p.o. natamycinem a profylaxe uroinfekce a infekce *Pneumocystis jirovecii* kotrimoxazolem. Funkce transplantátu se obnovila ihned po transplantaci. Pooperační průběh byl komplikován akutní pyelonefritidou s urosepsí. Po léčbě amoxicilin-klavulanátem a ciprofloxacinem se klinický stav a funkce ledvin upravily. 14 měsíců po transplantaci byl pacient přijat na neurochirurgické oddělení Fakultní Nemocnice v Plzni s projevy hemiparézy vlevo, závratí a ospalostí, bez celkových klinických a laboratorních příznaků infekce. Pacient byl intermitentně subfebrilní, hodnoty C-reaktivního proteinu byly pouze 3 mg/L. Při CT vyšetření byly prokázány mnohočetné abscesy mozku v pravém čelním mozkovém laloku s projevy těžkého edému. Byla provedena terapeutická a diagnostická punkční kraniotomie s aspirací zelenavého hnisu. Hnis byl naočkován na Columbia krevní agar (CKA) a Brain Heart Infusion agar (BHIA). Po předběžném zařazení nokardie do *N.transvalensis* komplexu byla ponechána počáteční antibiotická terapie v kombinaci i.v. meropenemu s p.o. kotrimoxazolem spolu s antiedematózní terapií. Z udržovací imunopresivní terapie byl vyloučen mykofenolát-mofetil, pokračováno nízkými dávkami Tacrolimu (5-8 ng/ml) a prednisonu (5 mg). Abscesové dutiny byly drénovány a proplachovány roztokem s kotrimoxazolem. Po devíti týdnech byla terapie změněna na

i.v. cefixim a p.o. kotrimoxazol. Za další dva týdny byl pacient propuštěn do domácí péče v dobrém klinickém stavu a s úplnou regresí neurologické symptomatologie. Štěp byl plně funkční. Léčba p.o. kotrimoxazolem dlouhodobě pokračovala v ambulantním režimu po dobu 1,5 roku. Kontrolní vyšetření pomocí MRI prokázalo úplnou regresí abscesových dutin. V době publikace je pacient 5 let po transplantaci ledviny a 4 roky po počátku nokardiové infekce v dobrém klinickém stavu a bez relapsu nokardiózy.

Základní mikrobiologické vyšetření bylo provedeno na Oddělení klinické mikrobiologie, Lékařské fakulty University Karlovy v Plzni. V hnisu odebraném z CNS byla v barvení podle Grama pozorována jemná větvičí se grampozitivní vlákna. Částečná acidorezistence útvarů v barvení podle Kinyouna nebyla prokázána [1, 8, 9]. Klinický materiál byl očkovan na Brain Heart Infusion Agar s krví a Columbia krevní agar. Po 4 dnech při aerobní inkubaci vyrostly na obou plotnách velice drobné silně vrůstající kolonie pokryté křídově bílým vzdušným myceliem (AM) (obrázek 1). Předběžná diagnóza nokardiózy vyplývala z růstových a morfologických charakteristik izolátu a z informace o předchozí imunopresivní léčbě pacienta (obrázky 2, 3, 4). Byla nasazena empirická léčba kotrimoxazolem. Kmen byl vyšetřen v NRL pro antibiotika v SZÚ v Praze, dourčení bylo provedeno v NRL pro patogenní aktinomycety v Trutnově. Hlavní charakteristikou ve fenotypu rezistence byla rezistence na amikacin. Ta je mezi nokardiemi velice vzácná a je typická právě pro *N.transvalensis* komplex. [1, 13]. Rezistence na amikacin typická pro *N.transvalensis* komplex byla potvrzena diskovým difúzním testem při dourčování kmene v NRL pro patogenní aktinomycety (obrázek 5). Pro nokardie je typická rezistence na lysozym vyšetřená diskovým testem podle Boirona. V literatuře je popsáno 6 druhových komplexů nokardií patřících dříve do *Nocardia asteroides* komplexu *sensu lato*. *N.transvalensis* patří do komplexu IV (tabulka 1).

Vyšetření fenotypu rezistence se provádí diskovým difúzním testem na MH agaru Bio Mérieux podle doporučené standardní metody [1, 8]. Standardní vyšetření citlivosti na antibiotika pro klinické použití se provádí diluční metodou v mikrotitračních destičkách podle standardů NCCLS/CLSI pro mykobaktérie a aerobní aktinomycety [1, 3, 7, 11]. Výsledky byly hodnoceny po 24, 48 a 72 hodinách. Kvůli pomalému růstu izolátu byla inkubační doba prodloužena až do doby optimálního růstu kmene v kontrolních jamkách. K interpretaci výsledku byly použity oficiální breakpointy podle NCCLS/CLSI (Tabulka 2).

Druhý krok identifikace nokardií. Ve druhém kroku bylo provedeno sekvencování genů pro 16S rRNA *rpoB*. DNA kmene byla izolována modifikovanou CTAB metodou podle Harmsena. Geny 16S rRNA a *rpoB* byly amplifikovány s použitím standardních eubakteriálních primerů. Produkty PCR reakce byly přímo použity v sekvenci reakci s použitím stejných primerů jako pro PCR a se sekvenčním kitem Dye Terminator v3. (ABI, USA) byl analyzován na ABI PRISM® 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). Contigy byly sestaveny v programu VectorNTI (Invitrogen, USA) and výsledné sekvence byly vyhodnoceny s použitím programu BLAST v databázích GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a RIDOM (<http://www.ridom.com>) [2, 6]. Identifikace *N.transvalensis* byla považována za validní, protože shoda bazí dosahovala 99–100 % a druhy nabízené softwarem byly homogenní. Identifikace byla ve shodě s fenotypem rezistence.

DISKUSE

Nokardióza je exogenní infekcí z prostředí. Primární ložisko je obvykle v plicích, někdy se jej však nepodaří prokázat, jako tomu bylo i v popsaném případě. Profylaxe kotrimoxazolem proti pneumocystóze má zabránit rozvoji nokardiózy [10]. Nokardióza se v tomto případě rozvinula v průběhu profylaxe kotrimoxazolem. V první fázi léčby byly abscesové dutiny vyplachovány roztokem amikacinu, na který je *N.transvalensis* primárně rezis-



Obrázek 1: *Nocardia transvalensis*, TR-947, celkový pohled, drobné kolonie pokryté bílým vzdušným myceliem na plotně Columbia krevního agaru po 72 hodinách kultivace.

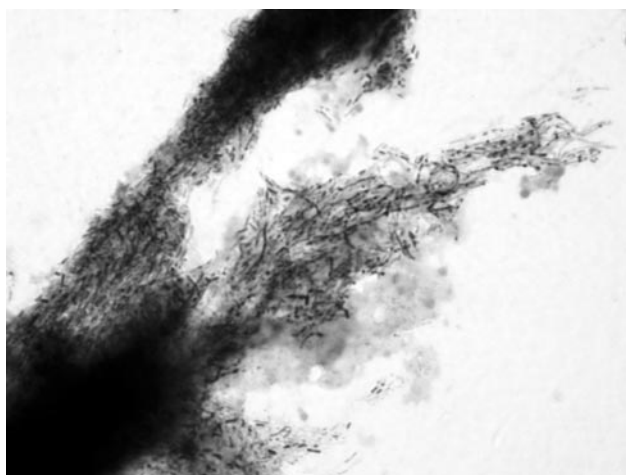
Tabulka 1: *Nocardia transvalensis* komplex, fenotyp rezistence, údaje o citlivosti a rezistenci podle literatury [Pijper, Pullinger, 1927]

<i>Nocardia transvalensis</i> komplex <i>Nocardia transvalensis</i> <i>sensu stricto</i>	Fenotyp rezistence IV	Citlivý na: ciprofloxacin, ceftriaxon, linkomycin, imipenem Rezistentní na: amikacin, tobramycin, gentamicin, kanamycin, erytromycin a clarithromycin	Poznámka: Rezistentní k AMI! Jediná mezi nokardiemi rezistentní na všechny amino-glykosidy Velmi pomalý růst.
---	-----------------------	--	--

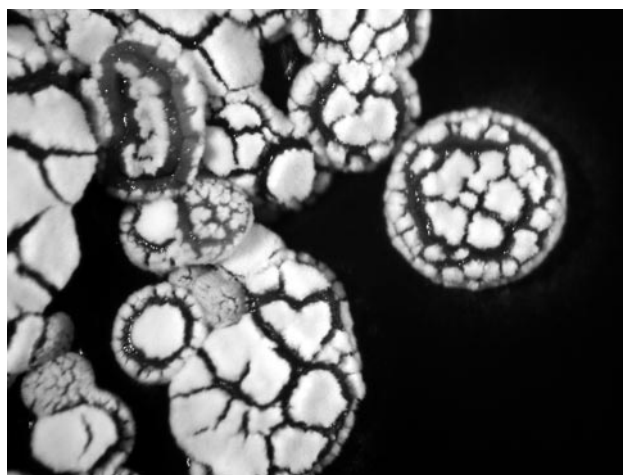
Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik, vyšetřené standardní bujónovou diluční mikrometodou podle NCCLS M24-A. u kmene *Nocardia transvalensis* TR-947

Antibiotikum	MIC mg/l	Kategorie citlivosti	Interpretační kritéria pro nokardie NCCLS M24-A MIC mg/l	
			citlivý	rezistentní
ampicilin	8	C	≤ 8	> 16
cefotaxim	1	C	≤ 8	> 16
meropenem	0,25	C	≤ 4	> 8
ciprofloxacín	0,25	C	≤ 1	> 2
ko-trimoxazol	128	R	≤ 32	> 32
gentamicin	> 32	R	≤ 4	> 8
tobramycin	> 32	R	≤ 4	> 8
amikacin	> 32	R	≤ 8	> 8

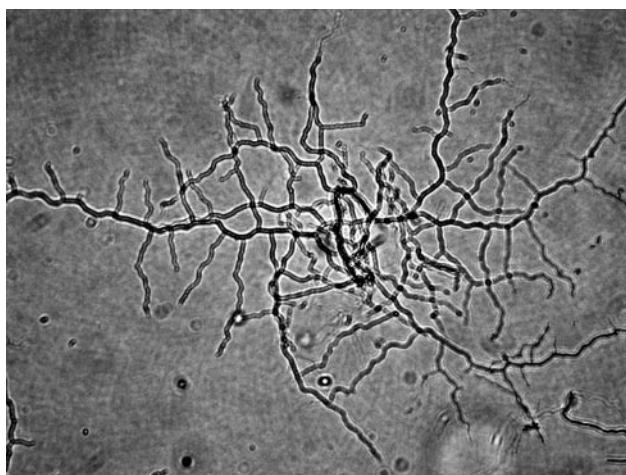
Kategorie C – citlivý, R – rezistentní



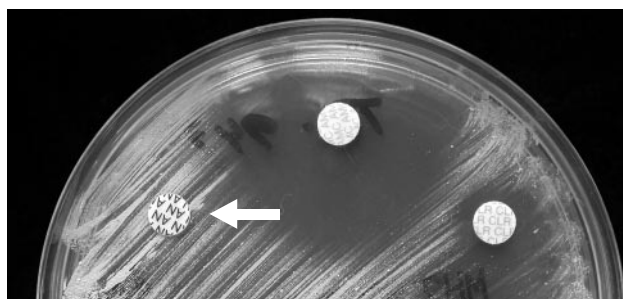
Obrázek 2: *Nocardia transvalensis*, TR-947, částečná acidorezistence v barvení na acidorezistenci za studena podle Kinyouna.



Obrázek 4: *Nocardia transvalensis*, TR-947, zralé pětimilimetrové kolonie na Columbia krevním agaru po 3 týdnech aerobní kultivace. Kolonie jsou pokryty křídově bílým vzdušným myceliem, prasklinami v povrchu kolonií prosvítá béžový pigment.



Obrázek 3: *Nocardia transvalensis*, TR-947, bohatě rozvětvené mycelium při epimikroskopickém vyšetření po 24 hodinové kultivaci na vodovodním agaru. Původní zvětšení 400x.



Obrázek 5: *Nocardia transvalensis*, TR-947, inhibiční zóny kolem disků s antibiotiky, půda MH agar, inkubace 72 hod. při 36°C v normální atmosféře.

Legenda: Disky a obsah antibiotika: zleva amikacin 30 µg, amoxicilin/klavulanát 20/10 µg, klaritromycin 15 µg. Rezistence na amikacin je hlavním diagnostickým znakem v orientační diagnostice *N. transvalensis* komplexu podle fenotypů rezistence. Růst nokardií kolem disku s amikacinem je označen šipkou.

tentní. Díky rychlému vyšetření citlivosti a předběžné identifikaci byl léčebný postup modifikován. Je nutno upozornit na to, že testování citlivosti diskovým difusním testem má mnohá úskalí. U pomalu rostoucí *N.transvalensis* je to zejména falešně pozitivní citlivost na amikacin při odečítání výsledků během prvních 72 hodin. Podle literatury je *N.transvalensis* prakticky vždy rezistentní na amikacin na rozdíl od všech ostatních nocardii [13]. Z těchto důvodů je nutno provádět vyšetření citlivosti standardní metodou NCCLS/CLSI pomocí dilučního testu [1, 3, 7, 11], i když v některých případech je třeba inkubační dobu prodloužit dle potřeby až do detekce pozitivního růstu v kontrolní jamce. Interpretace výsledků sekvencování musí být v souladu s fenotypovými daty, jinak by měl být výsledek potvrzen jinou molekulárně mikrobiologickou metodou [6, 8, 9]. Specificita identifikace je silně ovlivněna velikostí sekvencované části příslušného genu [2, 6]. Polyfázová identifikace rodu *Nocardia* je spíše úkolem pro referenční laboratoř.

V literatuře popsaná prevalence bakterií rodu *Nocardia* v České republice je *Nocardia nova* 27 % +*Nocardia farcinica* 27 %, *Nocardia otitidiscaviarum* 26 %, *Nocardia cyriacigeorgici* 15 % z celkového počtu 62 kmenů [9].

N. transvalensis je z klinického materiálu zachycována velmi vzácně i ve světovém měřítku. [4, 5, 14] V našem případě se jedná o první izolát *N. transvalensis* na území České republiky. Rychlá druhová identifikace a vyšetření citlivosti standardní metodou jsou základními podmínkami úspěšné léčby nocardiozy.

POUŽITÉ ZKRATKY

- AM – aeriální (vzdušné) mycelium
 ATG – antithymocytární globulin
 BHI AK – Brain Heart Infusion Agar s krví
 CKA – Columbia krevní agar
 CMV – cytomegalovirus
 Contig – výsledný sestřih několika sekvencí v celkové délce více než 1 kB vzniklý na základě sekvence PCR produktů namnožených podle několika eubakteriálních primerů.
 CNS – centrální nervový systém
 CT – počítačová tomografie
 CTAB – cetrimoniumbromid tj. hexadecyltrimethylamoniumbromid, součást puřovacího roztoku pro extrakci DNA
 MH – Mueller–Hinton agar
 MRI – magnetická rezonance
 NCCLS/CLSI – národní centrum (ústav) pro klinické a laboratorní standardy (USA)
 PCR – Polymerázová řetězová reakce

LITERATURA

- [1] Brown B A., Wallace R J Jr. Broth microdilution MIC test for *Nocardia* spp., 1992. In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook. p. 5.12.1–5.12.9 American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 [2] Brown-Elliott B.A., J.M. Brown, P.S. Conville, R.J. Wallace Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp., based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2): 259–282.
 [3] Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In Murray PR, et al (eds). Manual of Clinical Microbiology, 2003; 8th ed. ASM, Washington; pp. 1113–1115.

- [4] Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, Hotta K, Nishimura K, Mikami Y. Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur J Epidemiol.* 2004; 19: 383-9.
 [5] McNeil MM, Brown JM, Magruder CH, Shearlock KT, Saul RA, Allred DP, Ajello L. Disseminated *Nocardia transvalensis* infection: an unusual opportunistic pathogen in severely immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 1992; 165: 175–178.
 [6] Mellmann, A, Cloud, JL, Andrees S, Blackwood K, Carroll KC, Kabani A, Roth AHarmsen D. Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 359–370.
 [7] NCCLS Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved standard. 2003 NCCLS document M24-A. NCCLS, Wayne, Pa.
 [8] Scharfen J, ml. Nocardioza. Doporučená metoda mikrobiologické diagnostiky s přehledem léčby a návrhem standardního operačního postupu. 2008, NUCLEUS HK, Hradec Králové, ISBN 978-087009-43-7.
 [9] Scharfen J, ml. Doporučená metoda pro předběžnou identifikaci *Nocardia* spp. podle fenotypu rezistence na antibiotika. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16(3): 131–136.
 [10] Sorrell TC, Mitchell DH, Iredell JR. *Nocardia* species. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005; pp. 2916–2924. Oxford: Churchill Livingstone.
 [12] Urbášková P. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. 1988; Trios, Praha.
 [13] Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Weinberger M Eid AM, Schreiber L. Disseminated *Nocardia transvalensis* infection resembling pulmonary infarction in a liver transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:337–340.
 [14] Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Blacklock Z, Jost, KCJr., McNabb A, Colby WD, Biehle JR., Gibson JL, Wallace RJ, Jr. Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex by resistance to aminoglycosides, including amikacin, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2235–2242.
 [15] Yorke RF, Rouah E.. Nocardiosis with brain abscess due to an unusual species, *Nocardia transvalensis*. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 224–226.

MUDr. Josef Scharfen, CSc.

Mgr. Hana Stárková

NRL pro patogenní aktinomycety, Oddělení lékařské mikrobiologie a imunologie, Oblastní nemocnice Trutnov, a.s. Gorkého 77, 541 01 Trutnov, Ústav klinické mikrobiologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

MUDr. Tamara Bergerová

Ústav mikrobiologie Fakultní nemocnice Plzeň

PharmDr. Martin Bunčec, PhD.

Generi Biotech, a.s., Hradec Králové

RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

NRL pro antibiotika, Státní zdravotní ústav Praha

MUDr. Tomáš Reischig

1. interní klinika Fakultní nemocnice Plzeň