

## 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 sekvence, *rpoB* sekvence, 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.

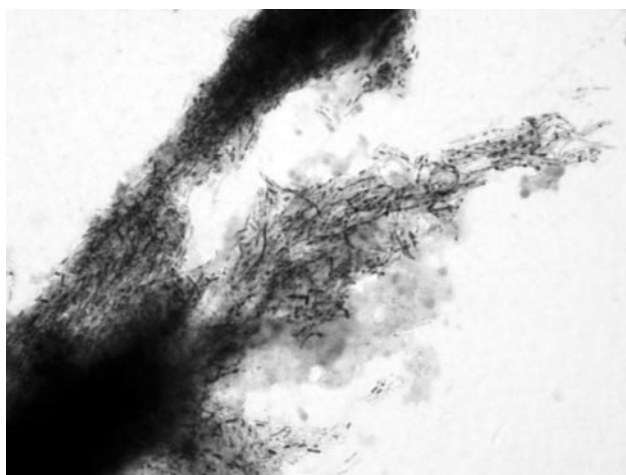
**Tabulka 1:** *Nocardia transvalensis* komplex, fenotyp rezistence, údaje o citlivosti a rezistenci podle literatury [Pijper, Pullinger, 1927]

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

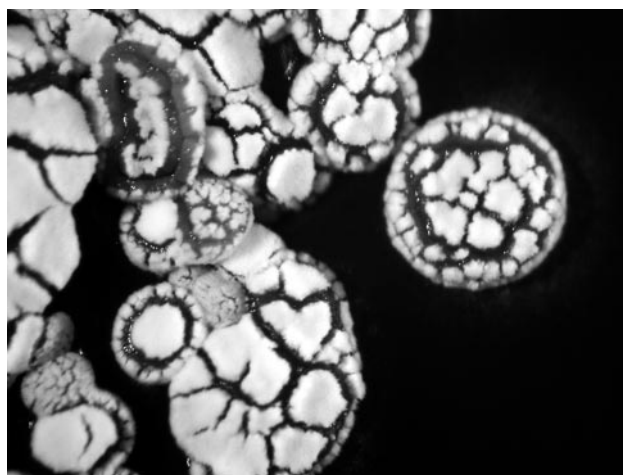
Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik, vyšetřené standardní bujónovou diluční mikrometodou podle NCCLS M24-A. u kmene *Nocardia transvalensis* TR-947

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

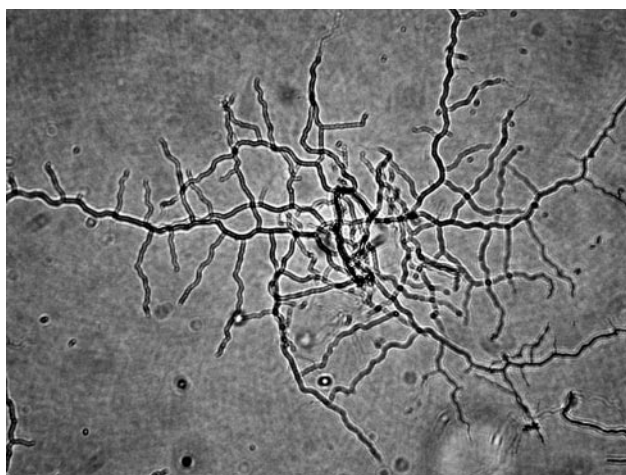
Kategorie C – citlivý, R – rezistentní



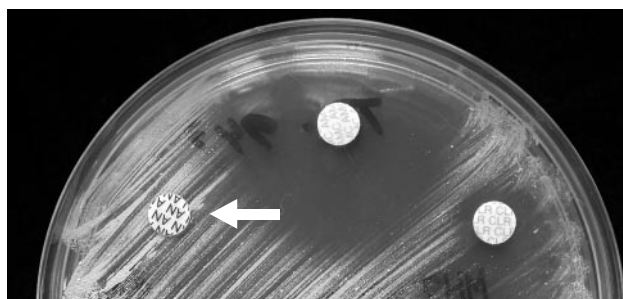
Obrázek 2: *Nocardia transvalensis*, TR-947, částečná acidorezistence v barvení na acidorezistenci za studena podle Kinyouna.



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 popsána 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 nocardiózy.

#### 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 pufovacího 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. Nocardióza. 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 Bunčeka, 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