

**UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
LEKÁRSKA FAKULTA**



**Aktuálne problémy epidemiológie
a mikrobiológie vo výskume a klinickej praxi**
Zborník vedeckých príspevkov

Monika Halánová - Leonard Siegfried (eds.)

Košice 2024

Aktuálne problémy epidemiológie a mikrobiológie vo výskume a klinickej praxi
Zborník vedeckých príspevkov

Zostavovatelia:

prof. MVDr. Monika Halánová, PhD.

Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Dr. h. c. prof. MUDr. Leonard Siegfried, CSc.

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Recenzenti:

prof. MUDr. Pavol Jarčuška, PhD.

Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

prof. MUDr. Pavol Kristian, PhD.

Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 - Creative Commons Attribution-NonCommercial-No-derivates 4.0 („Uveďte pôvod – Nepoužívajte komerčne - Nespracovávať“)



Za odbornú a jazykovú stránku tohto zborníka zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov. Rukopis príspevkov neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Dostupné od: 23.04.2024

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

ISBN 978-80-574-0306-7 (e-publikácia)

OBSAH

Rezistencia klinických kmeňov <i>Clostridioides difficile</i> proti testovaným antimikrobiálnym látkam	4
Prítomnosť vybraných génov virulencie pri <i>Escherichia coli</i> izolovaných z moču od starších pacientov	12
Porovnanie zloženia mikrobiómu zubného plaku zdravých dospelých vegánov a omnivorov	23
Výskyt toxinogénnych kmeňov <i>Clostridioides difficile</i> u pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre	30
Invazívna feohyfykóza spôsobená <i>Cladophialophora bantiana</i> u pacienta s transplantáciou pečene.....	38
Epidemiológia ochorenia COVID-19, etiológia, rizikové faktory a možnosti diagnostiky	45
Séroprevalencia anti-SARS-CoV-2 protilátok v regióne Košíc v jednotlivých demografických skupinách populácie počas pandémie COVID-19	58
Detekcia SARS-CoV-2 pomocou reverznej transkriptázovej PCR reakcie v Univerzitetnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach v roku 2023	68
Dlhodobé sledovanie hladín protilátok u pacientov po prekonaní ochorenia COVID-19	76
Vybrané skupiny črevných parazitóz a ich molekulová diagnostika Nested PCR metódou	85
Dôkaz anti- <i>A. phagocytophilum</i> IgG protilátok u profesionálnych vojakov z východného Slovenska	102
Zdravotné riziká migrantov vstupujúcich na územie Slovenskej republiky	113

Rezistencia klinických kmeňov *Clostridioides difficile* proti testovaným antimikrobiálnym látkam

Annamária Toporová, Katarína Čurová, Viera Lovayová, Mária Nagyová,
Radka Slebodníková, Leonard Siegfried

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Klostrídiová kolitída, ktorej pôvodcom je *Clostridioides difficile*, predstavuje v súčasnosti jednu z najčastejších nozokomiálnych infekcií. Používanie antimikrobiálnych látok, najmä širokospektrálnych antibiotík, patrí medzi rizikové faktory rozvoja klostrídiovej kolitídy, ale zároveň aj medzi dostupné terapeutické možnosti v liečbe. V tejto štúdií sme analyzovali a hodnotili citlivosť vybraných kmeňov *C. difficile* (n=100) izolovaných od pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre na šesť antimikrobiálnych látok. Všetky kmene *C. difficile* boli citlivé na tigeicyklín. Najvyššia miera rezistencie, na úrovni 46 %, bola zaznamenaná proti rifampicínu. Alarmujúcim zistením je rezistencia proti vankomycínu, ktorý je liekom prvej voľby, na úrovni 27 %. V klinickej praxi je preto veľmi dôležité, aby sa testovanie citlivosti klinických kmeňov *C. difficile* stalo súčasťou rutínnej laboratórnej diagnostiky, aby bolo možné sledovať vývoj rezistencie a reagovať adekvátnou racionálnou liečbou.

Abstract

Clostridial colitis, caused by *Clostridioides difficile*, is currently one of the most common nosocomial infections. The use of antimicrobials, especially broad-spectrum antibiotics, is among the risk factors for the development of clostridial colitis, but also among the available therapeutic options in treatment. In this study, we analyzed and evaluated the susceptibility of selected strains of *C. difficile* (n=100) isolated from patients hospitalized at the University Hospital in Nitra to six antimicrobial drugs. All strains of *C. difficile* were susceptible to tigeicycline. The highest rate of resistance, at the level of 46 %, was recorded against rifampicin.

An alarming finding is the resistance against vancomycin, which is the drug of first choice, at the level of 27%. In clinical practice, it is therefore very important that susceptibility testing of clinical strains of *C. difficile* becomes part of routine laboratory diagnostics, so that it is possible to monitor the development of resistance and respond with adequate rational treatment.

Kľúčové slová: *Clostridioides difficile*, klostrídiová kolitída, antimikrobiálne látky, rezistencia

Úvod

V súčasnosti je na celom svete pozorovaný nárast nozokomiálnej infekcie gastrointestinálneho traktu spôsobenej anaeróbnou sporujúcou baktériou *Clostridioides difficile* (*C. difficile*). Ochorenie, označované ako klostrídiová kolitída (CDI), vzniká najčastejšie v súvislosti s liečbou širokospektrálnymi antibiotikami, ktoré eliminujú fyziologickú črevnú flóru. Klinické prejavy CDI sú rôzne, od asymptomatického nosičstva, cez rôzne stupne hnačky až po život ohrozujúcu kolitídu (Czepiel et al., 2019; Binyamin et al., 2021).

C. difficile je rozšírená v črevnom trakte ľudí, zvierat a v životnom prostredí. Je súčasťou normálnej črevnej mikroflóry približne u 5% zdravých jedincov (Buddle & Fagan, 2023). Patogénne kmene sa vyznačujú schopnosťou produkovať toxíny, predovšetkým toxín A (*tcdA*) a toxín B (*tcdB*), prípadne aj tretí binárny toxín (CDT), ktorého prítomnosť zhoršuje patogenézu ochorenia (Kordus et al., 2022). Kmene, ktoré sa vyznačujú produkciou všetkých troch toxínov, sa považujú za hypervirulentné a majú schopnosť epidemicky sa šíriť v nemocniciach. K najviac rozšíreným hypervirulentným kmeňom v Európe patria ribotypy (RT) 027, 176, 078 (Isidro et al., 2017).

V posledných rokoch je pozorovaný nárast rezistencie *C. difficile* voči antimikrobiálnym látkam (AL) pri CDI. Vznik nových typov CD je často spojený so vznikom nových rezistencií, pričom väčšina epidemických klinických kmeňov vykazuje rezistenciu proti viacerým AL. Používanie AL patrí medzi rizikové faktory rozvoja CDI, ale zároveň aj medzi dostupné terapeutické možnosti v liečbe CDI (Dilnessa et al., 2022). Na liečbu primárnych infekcií sa odporúčajú metronidazol, vankomycín a fidaxomicín. V prípade neúspešnej antibiotickej liečby sa odporúčajú iné liečebné stratégie, napríklad podávanie monoklonálnych protilátok, fekálna mikrobiálna transplantácia (FMT) (Peng et al., 2018). Práve zvýšené používanie AL

v klinickej praxi ma za následok, že baktérie sú proti ním stále viac rezistentné. Baktérie si vytvorili mechanizmy rezistencie, aby dokázali prežiť (Spigaglia et al.,2018).

Cieľom práce je analýza a vyhodnotenie citlivosti vybraných kmeňov *C. difficile* izolovaných od pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre na antimikrobiálne látky.

Materiál a metódy

Výber kmeňov C. difficile

Do štúdie boli zaradené kmene *C. difficile*, ktoré boli izolované zo vzoriek stolíc od pacientov s podozrením na klostrídióvu kolitídu, hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre (FN NR) v priebehu rokov 2021-2022.

Extrakcia spór a kultivácia

Kultivácia bola vykonaná pri vzorkách stolíc, ktoré boli vo fenotypovom teste vyhodnotené ako glutamátdehydrogenáza pozitívne a toxín A/B pozitívne/negatívne. K extrakcii spór CD zo vzoriek stolice bola použitá metóda alkoholového šoku, ktorá spočívala v príprave suspenzie stolice so 70 % metyalkoholom v pomere 1:1. Suspenzia bola následne zvortexovaná a inkubovaná pri izbovej teplote 45 minút. Suspenzia o objeme 50 µl bola inokulovaná na selektívny agar s obsahom cykloserínu a cefoxitínu pre CD (Brazier, Oxoid), a následne kultivovaná v anaeróbnej stanici (Whitley A35 Anaerobic workstation, Don Whitley Scientific) pri teplote 36 °C, 48-72 hodín. Vyrastené kolónie boli následne identifikované metódou hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF (Bruker Daltonics).

Testovanie citlivosti na antimikrobiálne látky

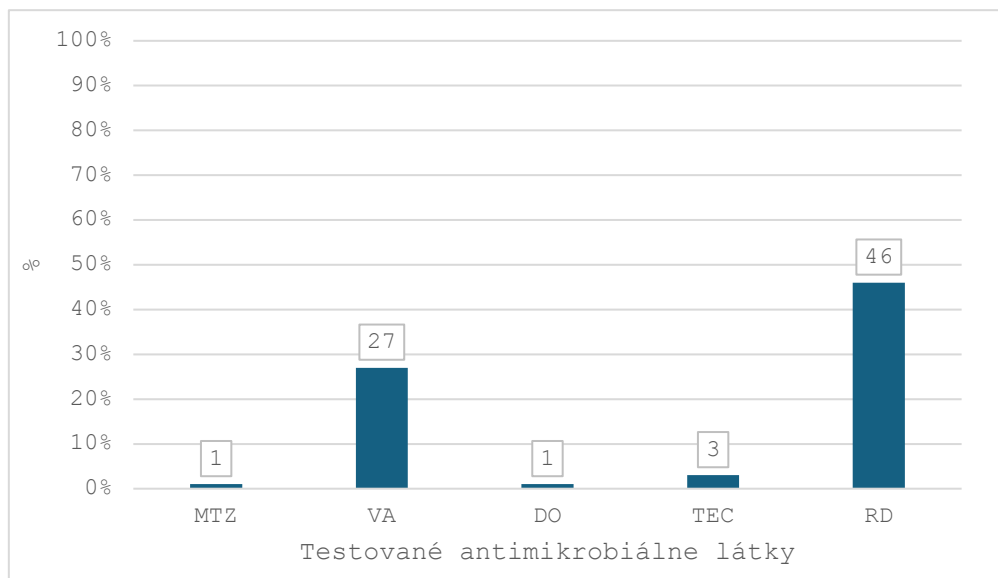
K testovaniu citlivosti kmeňov *C. difficile* na antimikrobiálne látky bol použitý diskový difúzny test. Testovaných bolo 6 AL: metronidazol (MTZ), vankomycín (VA), tigecyklín (TGC), doxycyklín (DO), teikoplanín (TEC), rifampicín (RD). Z vyrastených kolónií bola pripravená suspenzia s hustotou 0,5 McFarland a nanosená na Wilkins-Chalgrenov agar. Po aplikácii diskov s AL boli platne kultivované v anaeróbnej stanici pri teplote 36 °C 24-48 hodín. K hodnoteniu citlivosti bol použitý analyzátor inhibičných zón pre automatické odčítanie

antibiogramov BACMED 6iG2. Prístroj zaznamenal priemery inhibičných zón pre všetky testované AL, prepočítal výsledné hodnoty na kvantitatívne hodnoty minimálnych inhibičných koncentrácií a porovnal ich s hodnotami break pointov stanovených pre *C. difficile* Európskou spoločnosťou pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST) alebo Inštitútom pre klinické a laboratórne normy (CLSI). Následne prístroj uložil výsledky v systéme fotografií PACS spolu s terapeutickým účinkom.

Výsledky

Kmene CD boli izolované zo vzoriek stolíc pacientov s podozrením na CDI, ktorí boli hospitalizovaní v období rokov 2021-2022 vo FN NR. Analyzovaný súbor pozostával zo 100 kmeňov CD. V štúdiu sme testovali a vyhodnocovali citlivosť na 6 antimikrobiálnych látok (MTZ, VA, TGC, DO, TEC a RD). Antimikrobiálna citlivosť bola pri všetkých kmeňoch *C. difficile* (n=100) stanovená pomocou automatického analyzátora BACMED 6iG2.

Všetky testované kmene *C. difficile* boli citlivé na TGC. Jeden kmeň vykazoval rezistenciu proti DO (1 %) a takisto jeden kmeň rezistenciu proti MTZ (1 %). Tri kmene boli rezistentné proti TEC (3%). Rezistencia proti VA bola zistená pri 27 kmeňoch (27%) a najvyššia miera rezistencie bola pozorovaná proti RD s výskytom pri 46 kmeňoch (46%), (Graf 1).



Graf 1 Rezistencia klinických kmeňov CD (n=100) proti testovaným antimikrobiálnym látkam

Diskusia

Rastúca rezistencia baktérií proti AL predstavuje v súčasnosti celosvetový problém. V posledných desaťročiach bol v zdravotníckych zariadeniach pozorovaný zvýšený výskyt prípadov klostrídiovej kolitídy spôsobenej *C. difficile*, čo súvisí so vznikom nových virulentných typov *C. difficile* a s tým spojených nových rezistencií (Spigaglia et al., 2016). Antimikrobiálna citlivosť na 6 vybraných AL bola stanovená pri 100 kmeňoch *C. difficile*.

V našom súbore bola rezistencia proti MTZ potvrdená pri 1% kmeňov. Naše výsledky korelujú s výsledkami z Českej republiky a Číny, kde rezistencia proti MTZ bola na úrovni 1,9% a 1,2% (Krutova et al., 2022; Hung et al., 2018). Boekhoud et al. analyzovali výsledky viacerých štúdií, kde poukazujú zvlášť na rezistenciu proti MTZ, ktorá sa pohybuje v širokom rozmedzí od 0 do 18,3 % (Boekhoud et al., 2020). V našom súbore bolo 1% kmeňov CD rezistentných proti DO, avšak v mnohých krajinách je rezistencia podstatne vyššia. Štúdia z Taiwanu uvádza rezistenciu proti DO v rozmedzí 7,7 - 17,3 % (Hung et al., 2018). V Nemecku a Španielsku bola potvrdená rezistencia pri 26,5 % a 11% kmeňov (Schmidt et al., 2007; Alcalá et al., 2012). Rezistenciu proti teikoplanínu sme zaznamenali pri 3% kmeňov *C. difficile*. V čínskej štúdií Tang et al. nepotvrdili vo svojej štúdií rezistenciu kmeňov proti TEC (Tang et al., 2016). Aj v štúdií, ktorá bola realizovaná v Thajsku, boli všetky kmene CD citlivé na TEC (Putsathit et al., 2014, Yang et al., 2020).

V posledných rokoch sa objavujú kmene *C. difficile* s rezistenciou alebo so zníženou citlivosťou na vankomycín, čo vzbudzuje obavy, pretože sa jedná o liek prvej voľby pri liečbe prvej, rekurentnej a fulminantnej CDI (Wickramage et al., 2021). V našej štúdií bola rezistencia proti VA potvrdená pri 27% kmeňov CD. V európskych krajinách bola zaznamenaná nasledovná miera rezistencie proti VA: v Taliansku a Španielsku 0,87%, v Českej republike, Lotyšsku, Poľsku a Írsku 2,29% (Freeman et al., 2018), čo je podstatne nižšia miera rezistencie. Výsledky našej štúdie korelujú s výsledkami americkej, brazílskej a izraelskej štúdie, kde rezistencia proti VA bola omnoho vyššia 17,9 %, 58% a 31,5% kmeňov CD (Snydman et al., 2015; Tkhawkho et al., 2017; Fraga et al., 2016).

Najvyššia miera rezistencie v našom súbore kmeňov, na úrovni 46 %, bola zaznamenaná proti RD. V Českej republike, Francúzsku, Írsku, Španielsku a Spojenom kráľovstve dosahovala rezistencia proti RD v uplynulých rokoch hodnoty 10,2 - 13,5 % (Freeman et al., 2020), v Maďarsku 11,5 - 14,9 % (Eitel et al., 2015; Terhes et al., 2014), v Poľsku 18,1% - 41,5% (Lachowicz et al., 2020). V rámci týchto štúdií bol pozorovaný nárast rezistencie proti RD v priebehu jednotlivých rokov.

Antimikrobiálna rezistencia *C. difficile* zohráva dôležitú úlohu pri riadení epidemiológie CDI, preto je dôležité pravidelne testovať citlivosť klinických kmeňov na antimikrobiálne látky, analyzovať výskyt toxínov a ribotypov, najmä pri vzniku lokálnych epidémií CDI v zdravotníckych zariadeniach.

Záver

Kmene *C. difficile* so zníženou citlivosťou na antimikrobiálne látky, ktoré sa používajú ako lieky prvej voľby pri liečbe CDI, predstavujú zvýšené riziko zlyhania liečby CDI a vzniku rekurentných infekcií. V klinickej praxi je preto veľmi dôležité, aby sa testovanie citlivosti klinických kmeňov CD stalo súčasťou rutinej laboratórnej diagnostiky, aby bolo možné sledovať vývoj rezistencie a reagovať adekvátnou racionálnou liečbou.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu TRANSFEC 2019/34-UPJŠ-6, financovaného Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky.

Literatúra

1. Buddle, JE, Fagan, RP. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence* 2023, 14(1): 2150452.
2. Czepiel J, Drózdź M, Pituch H, et al. *Clostridium difficile* infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019, 38(7):1211-1221.
3. Binyamin D, Nitzan O, Azrad M, et al. The microbial diversity following antibiotic treatment of *Clostridioides difficile* infection. *BMC Gastroenterol* 2021; 21(1):166.
4. Isidro J, Mendes L. A, Serrano M, et al. Overview of *Clostridium difficile* Infection: Life cycle, Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment. *Clostridium Difficile - A Comprehensive Overview*. InTech, Sep. 27, 2017. doi: 10.5772/intechopen.69053.
5. Dilnessa T, Getaneh A, Hailu W, et al. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2022; 17(1):e0262597.

6. Peng Z, Ling L, Stratton CW, et al. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1):15.
7. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1050:137-159.
8. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis.* 2016; 3(1):23-42.
9. Krutova M, Wilcox M, Kuijper E. *Clostridioides difficile* infection: are the three currently used antibiotic treatment options equal from pharmacological and microbiological points of view? *Int J Infect Dis* 2022; 124:118-123.
10. Hung YP, Tsai PJ, Lee YT, et al. Nationwide surveillance of ribotypes and antimicrobial susceptibilities of toxigenic *Clostridium difficile* isolates with an emphasis on reduced doxycycline and tigecycline susceptibilities among ribotype 078 lineage isolates in Taiwan. *Infect Drug Resist.* 2018; 11:1197-1203.
11. Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nat Commun* 2020, 11: 598.
12. Schmidt C, Löffler B, Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(1):1-5.
13. Alcalá L, Martín A, Marín M, et al. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(7):E204-13.
14. Tang C, Cui L, Xu Y, et al. The incidence and drug resistance of *Clostridium difficile* infection in Mainland China: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016; 6:37865.
15. Putsathit P, Kiratisin P, Ngamwongsatit P, Riley TV. *Clostridium difficile* infection in Thailand. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45(1):1-7.
16. Yang Z, Huang Q, Qin J, et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors of *Clostridium difficile* ST81 Infection in a Teaching Hospital in Eastern China. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10:578098.
17. Wickramage I, Spigaglia P, Sun X. Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76(12):3077-3090.

18. Freeman J, Vernon J, Pilling S, et al. The ClosER study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011-2014. Clin Microbiol Infect 2018; 24(7):724-731.
19. Snyderman DR, McDermott LA, Jacobus NV, et al. U.S.-Based National Sentinel Surveillance Study for the Epidemiology of *Clostridium difficile*-Associated Diarrheal Isolates and Their Susceptibility to Fidaxomicin. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(10): 6437-43.
20. Tkhawkho L, Nitzan O, Pastukh N, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates in Israel. J Glob Antimicrob Resist 2017; 10:161-164.
21. Fraga EG, Nicodemo AC, Sampaio JL. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. Braz J Infect Dis. 2016; 20(5): 476-81.
22. Freeman J, Vernon J, Pilling S, et al. Five-year Pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: the extended ClosER study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020; 39(1): 169-177.
23. Eitel Z, Terhes G, Sóki J, et al. Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates. Anaerobe. 2015; 31: 47-9.
24. Terhes G, Maruyama A, Latkóczy K, et al. In vitro antibiotic susceptibility profile of *Clostridium difficile* excluding PCR ribotype 027 outbreak strain in Hungary. Anaerobe. 2014; 30: 41-4.
25. Lachowicz D, Pituch H, Wultańska D, et al. Surveillance of antimicrobial susceptibilities reveals high proportions of multidrug resistance in toxigenic *Clostridium difficile* strains in different areas of Poland. Anaerobe. 2020; 62: 102167.

Prítomnosť vybraných génov virulencie pri *Escherichia coli* izolovaných z moču od starších pacientov

Radka Slebodníková, Katarína Čurová, Vladimír Hrabovský, Annamária Toporová,
Leonard Siegfried

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Infekcie močových ciest sú jednou z najčastejších infekcií u starších ľudí. Väčšina z nich je spôsobená uropatogénnymi *Escherichia coli* (UPEC). Tieto kmene obsahujú široké spektrum faktorov virulencie a sú schopné prekonať obranné bariéry hostiteľského organizmu. Cieľom tejto štúdie bolo určiť fylogenetickú skupinu (A, B1, B2 a D) pri 75 močových kmeňoch *Escherichia coli* (*E. coli*), izolovaných od starších pacientov a vyhodnotiť prítomnosť 13 génov virulencie (*hly*, *cnf1*, *cdt*, *sat*, *afa*, *sfa*, *pap*, *aer*, *upaH*, *pic*, *neuC*, *kpsMT II* a *traT*). Fylogenetická skupina B2 (64 %) bola najdominantnejšia, nasledovali skupiny D (16 %), B1 (10,7 %) a A (9,3 %). Zistilo sa, že spomedzi génov virulencie najčastejšie prevládali *kpsMT II* (65,3 %), *traT* (61,3 %), *upaH* (58,6 %) a *aer* (52,0 %). Močové kmene *E. coli*, skúmané v tejto štúdii, patrili hlavne do fylogenetической skupiny B2. Zistili sme tiež, že väčšina vyšetovaných génov virulencie, ktoré sú dôležité pre vznik a rozvoj infekcie, boli prítomné práve pri týchto kmeňoch.

Abstract

Urinary tract infections are one of the most common infections in the elderly. Most of them are caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). These strains contain a wide spectrum of virulence factors and are able to overcome the defense barriers of the host organism. The aim of this study was to determine the phylogenetic group (A, B1, B2 and D) of 75 urinary strains of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from elderly patients and to evaluate the presence of 13 virulence genes (*hly*, *cnf1*, *cdt*, *sat*, *afa*, *sfa*, *pap*, *aer*, *upaH*, *pic*, *neuC*, *kpsMT II* and *traT*). Phylogenetic group B2 (64%) was the most dominant, followed by groups D (16%), B1 (10,7%)

and A (9,3%). Among the virulence genes, *kpsMT II* (65,3%), *traT* (61,3%), *upaH* (58,6%) and *aer* (52,0%) were found to be most prevalent. Urinary *E. coli* strains investigated in this study belonged mainly to phylogenetic group B2. We also found that most of the investigated virulence genes, which are important for the development of infection, were present in these strains.

Kľúčové slová: infekcia močových ciest, uropatogénne *E. coli*, virulencia, fylogenetická skupina

Úvod

Infekcie močových ciest (IMC) patria ku najčastejším infekciám u starších ľudí, približne 60 % žien trpí IMC aspoň raz za život (Kline & Bowdish 2016). Rozvoj IMC závisí od anatomických charakteristík a obranných mechanizmov jedinca, ale aj druhu baktérie, infekčnej dávky a virulencie infekčného agens (Subashchandrabose & Mobley 2015).

Hoci IMC môžu byť spôsobené rôznymi bakteriálnymi druhmi, väčšina infekcií v populácii je vyvolaná uropatogénnymi *Escherichia coli*. Kmene UPEC obsahujú široké spektrum faktorov virulencie a sú schopné prekonať obranné bariéry hostiteľského organizmu (Foxman 2010). Vyvolávajú rôzne typy infekcií močových ciest, napr. asymptomatická bakteriúria alebo cystitída. Ak sa tieto stavy neliečia, baktérie sa dostanú do obličiek a vzniká akútna pyelonefritída (Spurbeck & Mobley 2013).

Prichytenie UPEC k uroepiteliálnym bunkám umožňujú fimbriálne alebo nefimbriálne adhezíny (Kmeťová a kol. 2012). Najčastejšími adhezínmi UPEC sú fimbrie typu 1 (gén *fimA*), P fimbrie (gén *pap*), S fimbrie (gén *sfa*), F1C fimbrie, Dr adhezíny a afimbriálne adhezíny (gén *afa*). UPEC môžu produkovať množstvo toxínov, napr. α -hemolyzín (gén *hly*), cytotoxický nekrotizujúci faktor 1 (gén *cnf1*), cytoletálny toxín (gén *cdt*) a sekrečný autotransportný toxín (gén *sat*). Tieto proteíny ovplyvňujú signálne dráhy a spôsobujú abnormality v morfológii a funkcii hostiteľskej bunky (Ejrnæs 2011). Polysacharidové puzdro (skupina 2 a 3) a ďalšie protektíny (gény *kpsMT II*, *neuC*, *traT*) chránia baktérie pred fagocytózou a interferujú s komplementom (Johnson 1991). Siderofory sú vylučované baktériami ako odpoveď na obmedzenú dostupnosť železa u ľudskom organizme. Pri UPEC je najbežnejší aerobaktín (gén *aer*), ktorého produkcia je asociovaná s rozvojom cystitídy, pyelonefritídy a bakteriémie (Ferreira et al. 2016).

Predchádzajúce fylogenetické analýzy ukázali, že kmene *E. coli* možno rozdeliť do štyroch hlavných fylogenetických skupín: A, B1, B2 a D. Virulentné extraintestinálne kmene patria hlavne do skupiny B2 a v menšej miere do skupiny D. Komezálné kmene patria do skupiny A (Clermont et al. 2000).

Cieľom tejto štúdie bolo zaradiť vyšetované kmene *E. coli* izolované pri infekciách močových ciest do fylogenetických skupín (A, B1, B2 a D) a vyhodnotiť prítomnosť génov virulencie u týchto kmeňov.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene a extrakcia DNA

Analyzovali sme 75 kmeňov *E. coli* izolovaných z moču odobraného od pacientov nad 60 rokov s príznakmi IMC. Od každého pacienta bol izolovaný len jeden kmeň. Identita kmeňov bola potvrdená pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF (matrix asistovaná laserová desorpcia a ionizácia time-of-flight) vykonanej na Microflex MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) pomocou štandardného protokolu. DNA bakteriálnych kmeňov bola izolovaná pomocou súpravy Bacterial DNA Extraction kit (Ecoli sro, Slovensko).

Fylogenetická analýza

Fylogenetickú typizáciu *E. coli* sme vykonali pomocou multiplexnej PCR podľa Clermonta a kol. (2000). Kmene *E. coli* môžu byť priradené do jednej zo štyroch hlavných fyloskupín na základe prítomnosti/nepítomnosti troch génov: skupina A (*chuA*⁻, *yjaA*[±], *TSPE4.C2*⁻), skupina B1 (*chuA*⁻, *yjaA*[±], *TSPE4.C2*⁺), skupina B2 (*chuA*⁺, *yjaA*⁺, *TSPE4.C2*[±]) alebo skupina D (*chuA*⁻, *yjaA*⁺, *TSPE4.C2*[±]). Kmene *E. coli* HE26 a HE27 boli použité ako pozitívne kontroly a kmeň C600Rif ako negatívna kontrola.

PCR pre gény virulencie

Metódou PCR sme zisťovali prítomnosť nasledujúcich génov kódujúcich faktory virulencie: toxíny (*hly*, *cnf1*, *cdt*, *sat*), adhezíny (*afa*, *sfa*, *pap*), aerobaktín (*aer*), autotransportérové proteíny (*upaH*, *pic*), proteíny pre syntézu puzdra a protektíny (*neuC*,

kpsMT II, *traT*), ako je uvedené v tabuľke (Tab. 1). Produkty PCR boli separované v 1,5 % agarózovom géli a fotografované pomocou zobrazovacieho systému s UV transilumináciou.

Tab. 1 Detegované gény virulencie pri vyšetovaných kmeňoch *E. coli*

Gén	Veľkosť produktu (bp)	Referencia
<i>chuA</i>	279	Clermont et al. 2000
<i>yjaA</i>	211	Clermont et al. 2000
<i>TspE4.C2</i>	152	Clermont et al. 2000
<i>hly</i>	1117	Yamamoto et al. 1995
<i>cnf1</i>	498	Yamamoto et al. 1995
<i>cdt</i>	466	Tóth et al. 2003
<i>sat</i>	930	Boisen et al. 2009
<i>afa</i>	750	Yamamoto et al. 1995
<i>sfa</i>	410	Yamamoto et al. 1995
<i>pap</i>	328	Yamamoto et al. 1995
<i>aer</i>	602	Yamamoto et al. 1995
<i>upaH</i>	328	Allsopp et al. 2010
<i>pic</i>	572	Restieri et al. 2007
<i>neuC</i>	676	Moulin-Schouler et al. 2006
<i>kpsMTII</i>	272	Johnson & Stell 2000
<i>traT</i>	290	Johnson & Stell 2000

Výsledky

Fylogenetická analýza ukázala, že u vyšetovaných kmeňov *E. coli* bola najviac zastúpená fylogenetická skupina B2 (64%). Kmene patriace k fylogenetickému skupine D mali zastúpenie 16 %, kmene patriace k skupine B1 a A mali zastúpenie 10,67 % a 9,33 %.

Spomedzi detegovaných génov virulencie sme najvyšší výskyt zistili pri génoch *kpsMT II*, *traT* a *upaH*, ktoré boli pozitívne pri 49 (65,3 %), 46 (61,3 %) a 44 (58,6 %) kmeňoch *E. coli*. Najnižšia prevalencia bola zaznamenaná pri génoch *cdt* (5,3 %), *pic* (10,6 %), *neuC* a *afa* (oba 12 %).

Tabuľka 2 uvádza prítomnosť génov virulencie vo vzťahu k fylogenetickej skupine pri všetkých 75 izolátoch. Pri *E. coli*, patriacich do skupiny B2, boli najčastejšie detegované gény *kpsMT II* *upaH*, *traT* a *aer* v 43 (89,6 %), 42 (87,5 %); 29 (60,4 %) a 28 (58,3 %) prípadoch. Okrem toho gény *cnf*, *cdt*, *pic* a *neuC* boli prítomné iba pri kmeňoch zo skupiny B2. Prítomnosť génov virulencie pri kmeňoch z fylogenetických skupín B1 a A bola veľmi nízka, najvyššie zastúpenie mal gén *traT*, detegovaný pri piatich izolátoch (skupina B1).

Tab. 2 Zastúpenie génov virulencie a fylogenetických skupín pri vyšetrovaných kmeňoch *E. coli*.

	Fylogenetická skupina (n)				Spolu
	A	B1	B2	D	
	n=7 (9,33%)	n=8 (10,67%)	n=48 (64%)	n=12 (16%)	n=75 (100 %)
Gén (n)					
<i>hly</i>	1	0	16	0	17 (22,6%)
<i>cnfI</i>	0	0	13	0	13 (17,3%)
<i>cdt</i>	0	0	4	0	4 (5,3%)
<i>sat</i>	0	0	24	2	26 (34,6%)
<i>afa</i>	0	1	7	1	9 (12%)
<i>sfa</i>	0	1	17	0	18 (24%)
<i>pap</i>	0	0	11	2	13 (17,3%)
<i>upaH</i>	0	0	42	2	44 (58,6%)
<i>pic</i>	0	0	8	0	8 (10,6%)
<i>neuC</i>	0	0	9	0	9 (12%)
<i>kpsMT II</i>	0	0	43	6	49 (65,3%)
<i>traT</i>	4	5	29	8	46 (61,3%)
<i>aer</i>	1	2	28	8	39 (52%)

Diskusia

V našej práci sme hodnotili vzťah medzi prítomnosťou génov virulencie a fylogenetických skupín pri 75 kmeňoch *E. coli* izolovaných z moču. Fylogenetická skupina B2 bola najviac zastúpená a najvyššia frekvencia génov virulencie bola zistená pri kmeňoch patriacich práve do fyloskupiny B2. Podobné výsledky získali aj Bashir et al. (2012).

Pri niektorých izolátoch boli identifikované viaceré gény kódujúce tvorbu adhezínov (*pap* a *upaH*; *sfa* a *upaH*; *afa* a *upaH*; *sfa*, *pap* a *upaH*). Tu opäť bola najčastejšia fylogenetická skupina B2. Výsledky ukázali súčasnú prítomnosť *pap-sfa* operónov pri 8 kmeňoch *E. coli*. Všetky tieto izoláty boli tiež *upaH* pozitívne.

Ďalšia skupina faktorov virulencie, ktorá prispieva k rozvoju IMC vyvolaných *E. coli*, sú autotransportérové proteíny, kódované napr. génmi *upaH*, *sat*, *pic*. Gén *upaH* sa u *E. coli* vyskytuje pomerne často a kóduje proteín, ktorý prispieva k tvorbe biofilmu a kolonizácii močového mechúra (Allsopp et al. 2010). Pri našich izolátoch *E. coli* bol gén *upaH* (58,6 %) spomedzi adhezínov najviac zastúpený, za ním nasledovali gény *sfa* (24 %), *pap* (17,3 %) a *afa* (12 %).

Proteín Pic (Proteín zúčastňujúci sa kolonizácie), kódovaný génom *pic*, je serínová autotransportérová proteáza, ktorá sa podieľa na kolonizácii slizníc a má mucinázovú aktivitu (Welch 2016). Gén *pic* je asociovaný s kmeňmi vyvolávajúcimi IMC a je častejší u kmeňov z fylogenetickej skupiny B2 a D (Restieri et al. 2007). V tejto štúdii sme pozorovali prítomnosť *pic* génu výlučne pri kmeňoch vo fyloskupine B2.

Medzi kmeňmi *E. coli*, ktoré spôsobujú extraintestinálne infekcie, je častá produkcia puzdra (kapsuly) - povrchovej polysacharidovej vrstvy. Kapsula K2 *E. coli* CFT073 a kapsula K1 *E. coli* vyvolávajúcej neonatálnu meningitídu, sú hlavnými faktormi sérovej rezistencie (Miajlovic & Smith 2014). V našej skupine izolátov bol gén *neuC*, kódujúci kapsulárny antigén K1, detegovaný pri 9 (12 %) kmeňoch výlučne vo fylogenetickej skupine B2 (Tab 2). Moulin-Schouleur et al. (2006) uviedli, že gén *neuC* bol prítomný pri 95,5 % testovaných extraintestinálnych patogénnych *E. coli* (ExPEC). Ďalšia štúdia dokázala prítomnosť tohto génu pri 20 % kmeňoch (Naves et al. 2008). Gén *kpsMT II*, kódujúci kapsulu K2, sme detegovali pri 49 (65,3 %) izolátoch z fylogenetických skupín B2 a D. Iné štúdie dokázali, že *kpsMT II* bol prítomný pri 70 % (Ejrnæs et al. 2011 a 58 % (Vollmerhausen & Katouli 2014) kmeňoch. Súčasnú prítomnosť oboch génov, *kpsMT II* a *neuC*, sme zistili pri 9 kmeňoch; všetky patrili do fyloskupiny B2.

Gén *traT* kóduje protektín/invazín zodpovedný za sérovú rezistenciu. Jeho prítomnosť bola dokázaná pri 46 (61,3 %) kmeňoch. Gén *traT* bol pozorovaný vo všetkých štyroch fylogenetických skupinách. Iné štúdie ukázali prítomnosť *traT* pri 36 % (Ejrnæs et al. 2011), 46,7 % (Naves et al. 2008) a 77,8 % (López-Banda et al. 2014) izolátoch *E. coli*.

Prežitie baktérií počas infekcie je podporované systémom získavania environmentálneho železa (Garcia et al. 2011). V našej štúdii sme identifikovali gén *aer*, kódujúci aerobaktín, pri 39 (52 %) izolátoch. Najvyššia prítomnosť bola pozorovaná pri kmeňoch z fylogenetickej skupiny B2, avšak bol detegovaný vo všetkých štyroch fylogenetických skupinách.

Spomedzi toxínov bol pri 26 (34,6 %) izolátoch identifikovaný gén *sat*. Tento gén kóduje tvorbu serínovej proteázy Sat, ktorá má cytopatické účinky na rôzne typy buniek (Maroncle et al. 2006). Štúdie ukázali, že gén *sat* je častý pri UPEC a prispieva k ich patogenite. Gén *sat* sa nachádza na ostrove patogenity PAI II *E. coli* CFT073, ktorý obsahuje aj gény kódujúce aerobaktínový systém (Guyer et al. 2001). V našej práci sme celkovo našli 39 (52 %) *aer* pozitívnych kmeňov *E. coli*, 25 z nich bolo tiež *sat* pozitívnych.

Hemolyzín (gén *hly*) sa vyskytuje pri kmeňoch *E. coli* vyvolávajúcich infekcie vyšších časti močového traktu (pyelonefritída) a je častejší medzi invazívnymi uropatogénnymi kmeňmi (Katouli 2010). V našej štúdii bola prítomnosť génu *hly* bola zistená prevažne vo fylogenetickej skupine B2. Tieto zistenia sú v súlade so štúdiami iných autorov (Kmeťová a kol. 2012; Koga et al. 2014). Je zaujímavé, že sme našli jeden *hly* pozitívny kmeň *E. coli* patriaci do fylogenetickej skupiny A. Tento kmeň bol izolovaný od pacienta s cystitídou a bol tiež *traT* pozitívny.

Podobne ako hemolyzín, CNF1 (cytotoxický nekrotizujúci faktor 1) je asociovaný s fylogenetickou skupinou B2 a UPEC. V našej štúdii bol gén *cnf1* prítomný pri 13 (17,3 %) kmeňoch. Karimian et al. (2012) ukázali, že prítomnosť génov virulencie *cnf1*, *hly* a *pap* pri izolátoch UPEC bola 50,4 %, 50,4 % a 50,4 %. Ďalšia štúdia uvádza, že gény *hly* a *cnf*, kódujúce toxíny, boli amplifikované pri 23 % a 13 % kmeňoch (Usein et al. 2001). Farshad & Emamghorashi (2009) ukázali, že prevalencia génov *pap*, *sfa*, *hly* a *cnf1* medzi izolovanými kmeňmi bola 27,1 %, 14,6 %, 13,5 % a 22,9 %. V našej skupine izolátov sme zistili, že *hly*, *cnf1* a *sat* boli prítomné spoločne pri 4 kmeňoch a prítomnosť *hly*, *cnf1* a *cdt* bola spoločne pozorovaná pri jednom izoláte. Súčasná prítomnosť *sfa*, *pap* a *upaH* bola identifikovaná pri ôsmich kmeňoch.

CDT (cytoletálny toxín) je ďalší toxín, ktorý môže byť prítomný u ExPEC (Čurová a kol. 2014). Naša štúdia detegovala 4 (5,3 %) *cdt* pozitívne kmene *E. coli*. Vo všeobecnosti je prítomnosť CDT pri ExPEC nízka (Dubois et al. 2010) a naše výsledky túto skutočnosť potvrdili. Niektoré ďalšie štúdie dokazujú prítomnosť CDT génov pri enterohemoragickej a enteropatogénnej *E. coli* (Tóth et al. 2003; Orth et al. 2006). Nízka prevalencia CDT génov pri UPEC je pravdepodobne spôsobená tým, že tieto toxíny nepredstavujú hlavný faktor virulencie v tejto skupine patogénov.

Záver

Močové kmene *Escherichia coli*, skúmané v tejto štúdiu, patrili hlavne do fylogenetickej skupiny B2. Pozorovali sme výrazný rozdiel v distribúcii génov virulencie pri kmeňoch *E. coli* podľa ich fylogenetického zaradenia. Potvrdila sa asociácia vysokej prevalencie génov virulencie a fyloskupiny B2. Prítomnosť faktorov virulencie výrazne zvyšuje šancu *E. coli* uchytiť sa v močovom trakte a vyvolať ochorenie. Na druhej strane, zaznamenali sme aj kmene s nízkym počtom génov virulencie. Ich schopnosť vyvolať infekciu pravdepodobne súvisí so zníženým imunitným statusom u starších pacientov. Vo vyššom veku stúpa u pacientov počet komorbidít, ktoré výrazne ovplyvňujú imunitný systém, čím vzniká príležitosť patogénneho uplatnenia aj pre menej virulentné baktérie.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu „Návrh a implementácia pokročilých metód ventilačnej liečby a diagnostiky vírusových pneumónii vrátane Covid-19 s možnosťou ich rýchleho osvojenia“, ITMS2014+: 313011ASX1, v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Allsopp LP, Totsika M, Tree JJ, et al. UpaH is a newly identified autotransporter protein that contributes to biofilm formation and bladder colonization by uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infect Immun.* 2010;78(4):1659-69.

2. Bashir S, Haque A, Sarwar Y, et al. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012; 11:23.
3. Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, et al. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(2): 294-301.
4. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10): 4555-8.
5. Čurová K, Kmeťová M, Siegfried L. CDT toxíny [Cytotoxic distending toxins]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014; 63(2):134-9.
6. Dubois D, Delmas J, Cady A, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6):2122-9.
7. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull.* 2011; 58(4): B4187.
8. Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence.* 2011; 2(6):528-37.
9. Farshad S, Emamghorashi F. The prevalence of virulence genes of *E. coli* strains isolated from children with urinary tract infection. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009; 20(4):613-7.
10. Ferreira D, Seca AML, C G A D, Silva AMS. Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. *J Proteomics.* 2016;145:153-166.
11. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010; 7(12):653-60.
12. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun.* 2011; 79(3):1225-35.
13. Guyer DM, Gunther NW 4th, Mobley HL. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2001; 183 Suppl 1:S32-5.
14. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4(1):80-128.

15. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000; 181(1):261-72.
16. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012; 6:6811–6816.
17. Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol.* 2010; 2(2):59-72.
18. Kline KA, Bowdish DM. Infection in an aging population. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 29:63-7.
19. Kmeťová M, Kendrovská E, Takáčová V, et al.. Virulentný profil a rezistencia *Escherichia coli* izolovaných od imunokompromitovaných pacientov pri urosepse. *Urol. List.* 2012; 10: 37–40.
20. Koga VL, Tomazetto G, Cyoia PS, et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:465054.
21. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, et al. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int* 2014; 2014:959206.
22. Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, et al. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2006; 74(11):6124-34.
23. Miajlovic H, Smith SG. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 354(1):1-9.
24. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10):3484-92.
25. Naves P, del Prado G, Huelves L, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog.* 2008; 45(2):86-91.

26. Orth D, Grif K, Dierich MP, Würzner R. Cytolethal distending toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: alleles, serotype distribution and biological effects. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 11):1487-1492.
27. Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(5):1553-62..
28. Spurbeck RR, Mobley HLT.. Uropathogenic *Escherichia coli*. *Donnenberg M.S. (ed.) Escherichia coli. Pathotypes and Principles of Pathogenesis.* 2013; pp.499–521. Elsevier, ISBN 978-0-12-397048-0.
29. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4): 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
30. Tóth I, Héroult F, Beutin L, Oswald E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *J Clin Microbiol.* 2003; 41(9):4285-91.
31. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med.* 2001; 5(3):303-10.
32. Vollmerhausen TL, Katouli M. Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(6):975-82.
33. Welch RA. Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Exotoxins. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3):10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012.
34. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995; 12(2): 85-90.

Porovnanie zloženia mikrobiómu zubného plaku zdravých dospelých vegánov a omnivorov

Kristína Nadizadeh, Katarína Čurová, Karolína Kövoryová, Vladimír Hrabovský,
Leonard Siegfried

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Na zastúpenie mikroorganizmov v ústnej dutine má vplyv mnoho faktorov, vrátane spôsobu stravovania. V posledných desaťročiach sa populárnym stáva najmä vegánstvo, pre svoje zdravotné prínosy. Cieľom tejto práce bolo identifikovať mikroorganizmy supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov a porovnať mikrobiálne zloženie supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku vegánov a komparatívnej skupiny zdravých dospelých omnivorov. Mikrobióm zubného plaku zdravých dospelých vegánov a omnivorov tvorili predovšetkým baktérie rodov *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella* a *Actinomyces*. V supragingiválnom a subgingiválnom zubnom plaku vegánov boli dominantné grampozitívne aeróbne a fakultatívne anaeróbne baktérie, najvyššie zastúpenie mal rod *Streptococcus* (35,9 %, supragingiválny zubný plak), v rámci neho druhy *Streptococcus oralis* a *Streptococcus mitis*. Druh *Neisseria macacae* mal u vegánov vyššie zastúpenie ako u omnivorov, v prípade ostatných druhov baktérií významnejšie rozdiely pozorované neboli.

Abstract

The representation of microorganisms in the oral cavity is influenced by many factors, including the way of eating. In recent decades, especially veganism has become popular due to its health benefits. The aim of this work was to identify the microorganisms of the supragingival and subgingival dental plaque of healthy adult vegans and to compare the microbial composition of the supragingival and subgingival dental plaque of vegans and a comparative group of healthy adult omnivores. The dental plaque microbiome of healthy adult vegans and

omnivores consisted mainly of bacteria of the genera *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella* and *Actinomyces*. Gram-positive aerobic and facultative anaerobic bacteria were dominant in the supragingival and subgingival dental plaque of vegans, the genus *Streptococcus* was most represented (35.9%, supragingival dental plaque), including the species *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis*. The species *Neisseria macacae* had a higher representation in vegans than in omnivores, in the case of other types of bacteria no significant differences were observed.

Kľúčové slová: mikrobióm, ústna dutina, vegan, baktérie, rod *Streptococcus*

Úvod

Ústna dutina obsahuje veľké množstvo baktérií, mikromycét, vírusov a prvokov. Tieto mikroorganizmy osídľujú zubné povrchy, orálne sliznice a epitel *sulcus gingivalis*, pretože v ústnej dutine majú pre svoj rast a množenie stabilné prostredie s ideálnou teplotou 37 °C a priaznivým pH slín v rozmedzí 6,5 - 7 (Lim et al., 2017, Deo & Deshmukh, 2019). Baktérie zohrávajú dôležitú úlohu pri udržiavaní homeostázy a ovplyvňovaní vývoja ochorení ústnej dutiny, predovšetkým zubného kazu a ochorení parodontu (Deo & Deshmukh, 2019).

Na zastúpenie mikroorganizmov v ústnej dutine má vplyv mnoho faktorov, vrátane spôsobu stravovania. V posledných desaťročiach sa populárnym stáva najmä vegánstvo, pre svoje zdravotné prínosy (Richter et al., 2016). Vegánska diéta je charakterizovaná vysokým príjmom cereálií, ovocia, zeleniny, strukovín, semien, orechov, rastlinných olejov. Rastlinná strava poskytuje vyšší príjem vlákniny, horčíka, kyseliny listovej, vitamínov C a E, železa a fytochemikálií a nižší príjem kalórií, nasýtených tukov, cholesterolu, omega-3 mastných kyselín, vitamínu D, vápnika, zinku a vitamínu B12 (Marrone et al, 2021). Kým poznatky o vplyve vegetariánskej stravy na zdravie ústnej dutiny sú pomerne dobre známe, v prípade vegánstva sú však výrazne limitované (Booth & Hurry, 2020).

Výskumy naznačili, že vegánska diéta môže pacientov predisponovať k demineralizácii zubnej skloviny a vzniku počiatočných kariéznych lézií v podobe bielych škvŕn. Dôvodom môže byť nahrádzanie produktov živočíšneho pôvodu potravinami na báze škrobov a jednoduchých uhl'ohydrátov, ktoré prispievajú k demineralizácii zubnej skloviny (Booth & Hurry, 2020). Vysoké množstvo sacharidov vedie k zvýšenej fermentácii, výsledkom je výrazné zníženie pH slín, čo môže viesť k zvýšenému riziku vzniku zubného kazu (Kelly, 2019).

Cieľom tejto práce bolo identifikovať mikroorganizmy supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov a porovnať mikrobiálne zloženie supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku vegánov a komparatívnej skupiny zdravých dospelých omnivorov.

Materiál a metódy

Odber materiálu

Výskumu sa zúčastnilo 18 zdravých dospelých vegánov s vegánskou stravou minimálne 12 uplynulých mesiacov a 15 zdravých dospelých omnivorov, vo veku 18 až 58 rokov. Vzorky zubného plaku sme odoberali na Ústave lekárskej a klinickej mikrobiológie UPJŠ LF a UNLP v Košiciach ráno nalačno bez predchádzajúceho vykonania ústnej hygieny pomocou sterilných papierových čapov a sterilnej zubnej pinzety. Supragingiválny zubný plak sme odoberali z aproximálnych zubných plôšok, subgingiválny zubný plak aplikáciou sterilného papierového čapu do *sulcus gingivalis* na 15 sekúnd. Odobraný materiál sme okamžite po odbere vložili do sterilných mikroskúmaviek s obsahom živného média (živný bujón č. 2 pre materiál určený na aeróbnou kultiváciu, mäsový bujón pre materiál určený na anaeróbnou kultiváciu).

Očkovanie a kultivácia

Odobraný materiál sme v priebehu 60 minút po odbere naniesli na tuhé živné pôdy pomocou papierového čapu uchopeného pinzetou a rozočkovali pomocou sterilnej inokulačnej kľučky. K aeróbnej kultivácii bol použitý krvný agar, k anaeróbnej kultivácii VL agar obohatený o defibrinovanú baraniu krvi, ktorý sme následne vložili do anaerostatu. Kultivácia prebiehala v termostate pri teplote 37 °C 48 hodín.

Identifikácia a vyhodnotenie

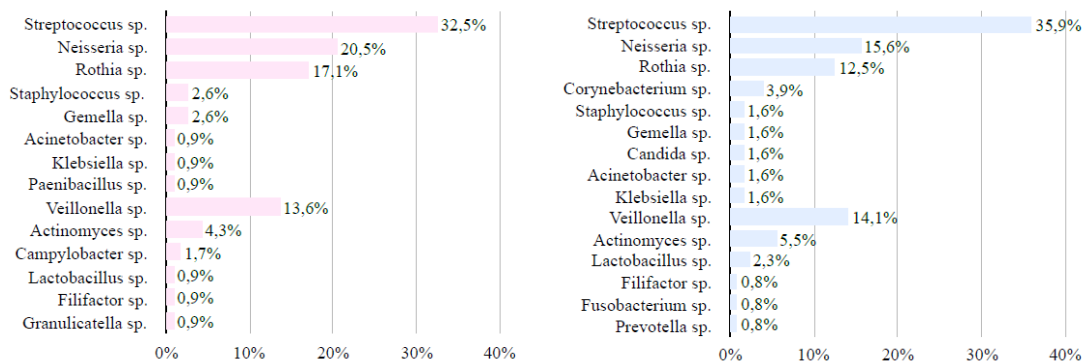
Bakteriálne kolónie získané anaeróbnou a aeróbnou kultiváciou sme identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF. Vzorky určené na analýzu sme nanášali na terčíky ocelevej platničky v duplikáte, prekryli roztokom matrice a nechali uschnúť. Následne sme platničku vložili do prístroja MALDI-TOF od Bruker Daltonics, v ktorom prebiehala identifikácia baktérií na úrovni druhu pomocou softvérového systému MALDI Biotyper 3.0.

Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili pomocou programu Microsoft Office Excel 2016 a graficky znázornili.

Výsledky

Z 36 vzoriek supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov sme vykultivovali 245 bakteriálnych izolátov, z 30 vzoriek supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých omnivorov 190 bakteriálnych izolátov.

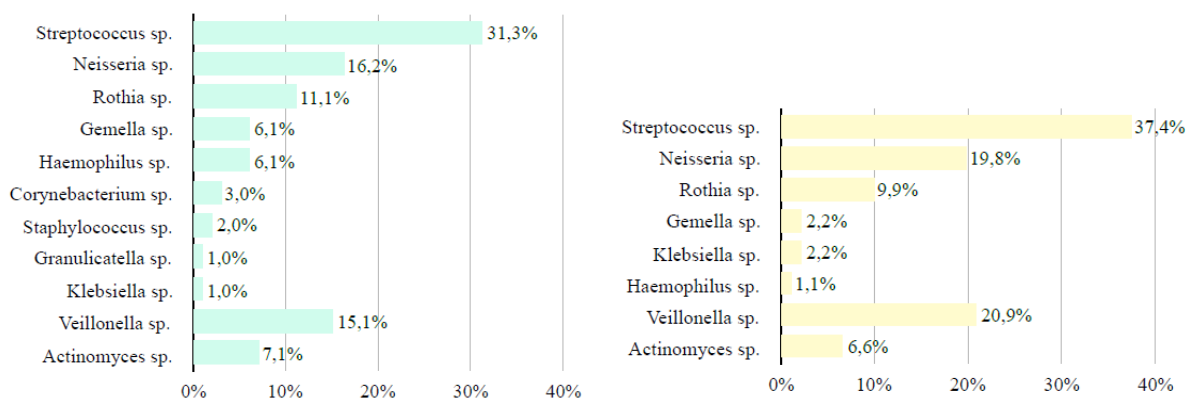
Zo zubného plaku vegánov bolo izolovaných 10 rodov aeróbných a fakultatívne anaeróbných baktérií (Graf 1). V supragingiválnom zubnom plaku bol najviac zastúpeným rodom *Streptococcus* (35,9 %), nasledovali rody *Neisseria* (15,6 %) a *Rothia* (12,5 %). V subgingiválnom zubnom plaku mal najvyšší podiel rod *Streptococcus* (32,5 %), za ním nasledoval rod *Neisseria* (20,5 %) a *Rothia* (17,1 %). Z anaeróbných baktérií bolo izolovaných 8 rodov. V supragingiválnom zubnom plaku vegánov prevládal rod *Veillonella* (14,1 %). Menší podiel mali rody *Actinomyces* (5,5 %) a *Lactobacillus* (2,3 %).



Graf 1 Percentuálny podiel bakteriálnych rodov izolovaných zo supragingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov (vľavo) a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov (vpravo)

Zo vzoriek zubného plaku skupiny omnivorov bolo izolovaných 9 rodov aeróbných a fakultatívne anaeróbných baktérií (Graf 2). V supragingiválnom zubnom plaku bol najviac zastúpený rod *Streptococcus* (31,3 %). Nasledovali rody *Neisseria* (16,2 %) a *Rothia* (11,1 %). Rovnako v subgingiválnom zubnom plaku bol dominantný rod *Streptococcus* (37,4 %), nasledoval rod *Neisseria* (19,8 %) a rod *Rothia* (9,9 %). Potvrdili sme aj anaeróbne baktérie

patriace k rodom *Actinomyces* a *Veillonella*. V supragingiválnom zubnom plaku omnivorov predstavoval percentuálny podiel *Actinomyces* 7,1 % a *Veillonella* 15,1 %. Percentuálny podiel *Actinomyces* a *Veillonella* v subgingiválnom zubnom plaku omnivorov predstavoval 6,6 % a 20,9 %.



Graf 2 Percentuálny podiel bakteriálnych rodov izolovaných zo supragingiválneho zubného plaku zdravých dospelých omnivorov (vľavo) a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých omnivorov (vpravo)

Diskusia

Baktérie zubného plaku môžu zohrávať úlohu pri vývoji ochorení tvrdých zubných tkanív a závesného aparátu zuba (Seneviratne et al., 2011). Vplyvu vegánskej diéty na mikrobióm zubného plaku sa doposiaľ nevenovala žiadna štúdia a väčšina dostupných štúdií ľudského zubného plaku sa zameriava na identifikáciu baktérií v spojitosti s určitými ochoreniami.

V našej štúdii mikrobióm zubného plaku zdravých dospelých vegánov a omnivorov tvorili predovšetkým baktérie rodov *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella* a *Actinomyces*, čo je v súlade s inými štúdiami (Vasudevan, 2017). Výsledky poukazujú na výraznú dominanciu grampozitívnych aeróbných a fakultatívne anaeróbných baktérií v supragingiválnom a subgingiválnom zubnom plaku vegánov. Z tejto skupiny má najvyššie zastúpenie rod *Streptococcus*, s vyšším počtom izolátov získaných zo vzoriek supragingiválneho zubného plaku (35,9 %). U vegánov boli dominantné druhy *Streptococcus oralis* a *Streptococcus mitis*. Hlavný etiologický faktor zubného kazu, *Streptococcus mutans*, nebol potvrdený.

V zdravom *sulcus gingivalis* prevláda grampozitívna flóra a nízky počet anaeróbných gramnegatívnych baktérií (Liptáková et al., 2019). Medzi najrozšírenejšie parodontálne

ochorenia patrí plakom indukovaná gingivitída, pre ktorú je charakteristická prítomnosť prevažne gramnegatívnych anaeróbných baktérií (Popova et al., 2013). V našej štúdií sme preukázali vyšší percentuálny podiel izolovaných gramnegatívnych anaeróbných baktérií v subgingiválnom zubnom plaku zdravých dospelých omnivorov (20,9 %) v porovnaní so subgingiválnym zubným plakom zdravých dospelých vegánov (15,4 %). Dominantnými bakteriálnymi rodmi izolovanými zo subgingiválneho zubného plaku pri plakom indukovanej gingivitíde sú *Actinomyces* a *Streptococcus* sp. (Popova et al., 2013). Výsledky našej kultivácie ukazujú mierne vyšší percentuálny podiel *Actinomyces* a *Streptococcus* sp. v subgingiválnom zubnom plakom skupiny omnivorov.

Baktérie rodu *Lactobacillus* boli v rámci našej štúdie izolované iba v skupine vegánov. Druhy *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* a *Lactobacillus plantarum* boli izolované z troch vzoriek supragingiválneho plaku a *Lactobacillus curvatus* z jednej vzorky subgingiválneho zubného plaku. Zástupcovia tohto rodu sa pokladajú za neskorých kolonizátorov zubného plaku, bežne sa vyskytujúci v pokročilých léziách zubného kazu. Pri klinickom vyšetrení nebol u žiadneho z našich probandov klinicky diagnostikovaný zubný kaz, preto predpokladáme, že laktobacily u našich probandov neboli izolované v rámci kariéznej mikroflóry.

Zaujímavým zistením bolo potvrdenie *Neisseria macacae* u zdravých dospelých vegánov zo supragingiválneho zubného plaku v piatich (27,8 %) a zo subgingiválneho zubného plaku v troch prípadoch (16,7 %). V skupine omnivorov bola táto baktéria izolovaná iba z jednej vzorky subgingiválneho zubného plaku. U ľudí bol tento druh izolovaný z horných dýchacích ciest neutropenických pacientov (Yamamoto et al., 2020). Príčinu neutropénie u vegánov možno hľadať v spojitosti s hypovitaminózou B12, ktorou sú vegáni vo zvýšenej miere ohrození (Hunt et al., 2014), čo nás privádza k hypotéze, že frekventovanejšia izolácia *Neisseria macacae* u vegánov by mohla súvisieť s neutropéniou vyplývajúcou z ich špecifických stravovacích návykov. Na potvrdenie tejto hypotézy je však potrebný ďalší výskum.

Záver

V našej štúdií sme identifikovali mikrobióm supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku zdravých dospelých vegánov. Porovnaním zastúpenia rozdielnych skupín baktérií supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku sme pozorovali medzi zdravými dospelými vegánmi a omnivormi iba malé odchýlky. Zaujímavý rozdiel bol pozorovaný v rámci

vyššieho zastúpenia *Neisseria macacae* vo vzorkách supragingiválneho a subgingiválneho zubného plaku skupiny vegánov, ktorý by mohol súvisieť s neutropéniou vyplývajúcou z hypovitaminózy B12. Na potvrdenie hypotézy je potrebný ďalší výskum.

Literatúra

1. Lim Y, Totsika M, Morrison M, et al. A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics* 2017, 7(17):4313-4321.
2. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019, 23(1):122-128.
3. Richter M, Boeing H, Grunewalk-Funk D, et al. German Nutrition Society (DGE). Vegan diet. Position of the German Nutrition Society (DGE). *Ernahrungs Umschau* 2016, 63(04): 92–102. Erratum in: 63(05): M262.
4. Marrone G, Guerriero C, Palazzetti D, et al. Vegan Diet Health Benefits in Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2021 13(3):817.
5. Booth J, Hurry J. The impact of a vegan diet on oral health. *BDJ Team* 2020, 7(7), 18–19.
6. Kelly K. Association Between Ketogenic, Vegan, and Paleo Diets and Dental Biofilm Formation In Vitro. *Purdue Undergraduate Research Conference* 2019, 20.
7. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res* 2011, 14(2):87-94.
8. Vasuderan R. Dental Plaques: Microbial Community of the Oral Cavity. *J Microbiol Exp* 2017, 4(1): 00100.
9. Yamamoto Y, Terada N, Sugiyama T, et al. *Neisseria macacae* bacteremia: report of two cases with a literature review. *BMC Infect Dis* 2020, 20(1):619.
10. Liptáková, A. et al. *Lekárska mikrobiológia (Vydanie: prvé.)*. Bratislava: Herba 2019, ISBN: 978-80-89631-91-9.
11. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2013, 27(3): 3754-3759.
12. Hunt A, Harrington D, Robinson S. Vitamin B12 deficiency. *BMJ* 2014, 349: g5226.

Výskyt toxinogénnych kmeňov *Clostridioides difficile* u pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre

Nicolas Kardos ^{a, b}, Katarína Čurová ^a, Annamária Toporová ^a, Vladimír Hrabovský ^a,
Nina Kalinová ^b, Leonard Siegfried ^a

^a Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

^b Klinika detí a dorastu UPJŠ Lf a DFN, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Infekcia spôsobená anaeróbnou sporulujúcou baktériou *Clostridioides difficile* má široké spektrum klinických prejavov od miernej hnačky až po ťažké formy. Za rozvoj ochorenia sú zodpovedné kmene produkujúce toxíny, predovšetkým toxín A (gén *tcdA*) a toxín B (gén *tcdB*). Niektoré kmene sa označujú ako hypervirulentné, pretože produkujú aj tretí, binárny toxín (gény *cdtA* a *cdtB*) a sú spojené s ťažším priebehom klostrídiovej kolitídy. Cieľom tejto práce bolo detekovať gény kódujúce produkciu toxínov *C. difficile* pomocou multiplexnej PCR a vyhodnotiť ich zastúpenie pri 161 kmeňoch *C. difficile* izolovaných zo vzoriek stolíc pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre s príznakmi klostrídiovej infekcie. Gény *tcdA* a *tcdB* boli potvrdené pri 86,3 % kmeňov *C. difficile*, gény *cdtA* a *cdtB* boli prítomné pri 55,3 % kmeňov. Pri 22 kmeňoch gény kódujúce toxíny neboli potvrdené. Výsledky našej štúdie poukazujú na vysokú prevalenciu hypervirulentných kmeňov, vyznačujúcich sa produkciou všetkých troch toxínov. V klinickej praxi je veľmi dôležitá včasná a rýchla diagnostika *C. difficile*, cielená liečba klostrídiovej kolitídy a efektívna prevencia zameraná na zamedzenie šírenia hypervirulentných kmeňov v nemocniciach.

Abstract

Infection caused by the anaerobic sporulating bacterium *Clostridioides difficile* has a wide range of clinical manifestations from mild diarrhea to severe forms. Strains producing toxins, primarily toxin A (gene *tcdA*) and toxin B (gene *tcdB*) are responsible for the development of the disease. Some strains are referred to as hypervirulent because they also produce a third,

binary toxin (*cdtA* and *cdtB* genes) and are associated with a more severe course of clostridial colitis. The aim of this work was to detect genes encoding production of *C. difficile* toxins using multiplex PCR and to evaluate their representation in 161 *C. difficile* strains isolated from stool samples of patients hospitalized at the Faculty Hospital in Nitra with symptoms of clostridial infection. Genes *tcdA* and *tcdB* were detected in 86,3 % *C. difficile* strains, genes *cdtA* and *cdtB* were present in 55,3 % of these strains. In 22 strains, genes encoding toxins were not confirmed. The results of our study show a high prevalence of hypervirulent strains characterized by the production of all three toxins. Early and rapid diagnosis of *C. difficile*, targeted treatment of clostridial colitis and effective prevention aimed at preventing the spread of hypervirulent strains in hospitals are very important in clinical practice.

Kľúčové slová: *Clostridioides difficile*, klostrídiová kolitída, toxín A, toxín B, binárny toxín

Úvod

Clostridioides difficile (*C. difficile*) je gram-pozitívna, anaeróbna, spóry tvoriaca baktéria, ktorá patrí do čeľade *Peptostreptococcaceae*. Infekcia spôsobená *C. difficile* (CDI) má široké spektrum klinických prejavov od miernej hnačky až po ťažké priebehy ochorenia, ako je pseudomembranózna kolitída, toxický megakolón, perforácia hrubého čreva, peritonitída, sepsa a nakoniec smrť. Za rozvoj ochorenia sú zodpovedné kmene produkujúce toxíny, predovšetkým toxín A (enterotoxín) a toxín B (cytotoxín). Niektoré kmene môžu produkovať aj ďalší, binárny toxín (*C. difficile* transferáza). Kmene produkujúce všetky tri toxíny sa označujú ako hypervirulentné, pretože sú spojené s ťažším priebehom CDI a vyššou mortalitou (Lawson et al., 2016, Oren & Rupnik, 2018). K prenosu *C. difficile* dochádza fekálno-orálnou cestou spravidla prostredníctvom spór, keďže vegetatívne formy sú citlivé na prítomnosť kyslíka a v bežnom prostredí neprežívajú. Spóry sú metabolicky neaktívne, sú teda rezistentné voči účinkom antibiotík a mnohých dezinfekčných prostriedkov používaných v nemocničných zariadeniach. Rezistencia umožňuje pretrvávanie spór v prostredí aj niekoľko mesiacov a kontaminácia nemocničného prostredia zohráva zásadnú úlohu v šírení *C. difficile* (Paredes-Sabja et al., 2014). Vo všeobecnosti je patogenéza CDI spájaná s narušením a zmenou črevnej mikroflóry, ktorá spôsobí stratu takzvanej kolonizačnej rezistencie čreva. *C. difficile* kolonizuje sliznicu čreva a následná produkcia toxínov zodpovedá za rozvoj ochorenia. Najčastejším rizikovým faktorom, ktorý sa podieľa na črevnej dysmikrobií, je užívanie antibiotík. Zmeny v

zložení črevnej mikrobioty, ktoré predstavujú riziko pre rozvoj CDI, boli pozorované aj u jedincov s autoimunitnými ochoreniami, alergiami, onkologickými ochoreniami, diabetom a zápalovým ochorením čreva (Miranda-Katz et al., 2020, Clemente et al., 2012).

Na laboratórne potvrdenie CDI nie je v súčasnosti k dispozícii komerčný test, ktorý by bol vhodný ako samostatný test na potvrdenie aktívnej infekcie. Z tohto dôvodu sa Európskou spoločnosťou pre klinickú mikrobiológiu a infekčné lekárstvo (ESCMID) odporúča viacstupňový diagnostický algoritmus (Crobach et al., 2016). V prvom kroku sa používa rýchly imunochromatografický test na detekciu glutamátdehydrogenázy (GDH) ako markera prítomnosti *C. difficile* v stolici. V prípade pozitivity GDH sa vzorka stolice testuje na prítomnosť voľných toxínov A/B. Dôkaz toxínov sa vykonáva testom s vysokou pozitívnou prediktívnou hodnotou, avšak senzitivita týchto testov pre rýchly rozpad toxínov pri nevhodnom skladovaní vzorky stolice je nízka. Pri GDH pozitívnych a toxín negatívnych vzorkách je vždy potrebné doplniť citlivejšiu metódu na dôkaz toxínov. Vhodná je polymerázová reťazová reakcia (PCR), ktorá slúži na detekciu génov zodpovedných za produkciu toxínov (van Prehn et al., 2021).

Cieľom tejto práce je izolácia a kultivácia vegetatívnych foriem *C. difficile* zo vzoriek stolíc pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre s príznakmi CDI, detekcia génov kódujúcich produkciu toxínov *C. difficile* pomocou multiplexnej PCR a vyhodnotenie ich zastúpenia.

Materiál a metódy

Dôkaz GDH a voľných toxínov

V období jún 2020 až december 2023 bolo odobratých 230 vzoriek stolíc od pacientov s príznakmi klostrídiovej kolitídy, hospitalizovaných vo Fakultnej Nemocnici v Nitre. Vzorky boli v klinickom laboratóriu vyšetrené na prítomnosť enzýmu glutamátdehydrogenázy (GDH) a voľných toxínov A/B rýchlym imunochromatografickým (ICH) testom. Na ďalšiu diagnostiku s cieľom potvrdenia prítomnosti toxinogénnych kmeňov *C. difficile* boli použité iba GDH pozitívne a toxín A/B pozitívne a negatívne vzorky stolíc.

Extrakcia spór a kultivácia

K extrakcii spór a kultivácii bolo použitých 164 vzoriek stolíc. Extrakcia spór bola realizovaná pomocou alkoholového šoku. V sterilnej skúmavke sa stolica (1 ml) zmiešala so 70 % metylakoholom a vzniknutá suspenzia sa niekoľkokrát dôkladne premiešala. Po 45 minútovej inkubácii pri izbovej teplote bol depozit v množstve 50 µl naočkovaný na selektívny cykloserín-cefoxitín-fruktózový agar (Brazier, Oxoid). Pripravené platne boli následne kultivované pri teplote 36 °C 48-72 hodín v anaeróbnej stanici. Na identifikáciu vyrastených kolónií bola použitá metóda hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF MS (Bruker Daltonics).

Dôkaz génov kódujúcich toxíny

Genómová DNA z vykultivovaných kmeňov bola izolovaná pomocou izolačného kitu GRISP (súprava GRS Genomic DNA). Gény kódujúce toxíny A a B (*tcdA* a *tcdB*), binárny toxín (*cdtA* a *cdtB*) a 16S rDNA, ktorá slúžila ako pozitívna kontrola na izoláciu DNA, boli detegované pomocou multiplexnej PCR reakcie. PCR produkty boli separované v 1,5 % agarózovom géli s fluorescenčným farbivom ECO Safe (Uniscience), vizualizované UV svetlom, zdokumentované systémom Gel DocTMEZ (BIO-RAD) a analyzované softvérom Image Lab Software (BIO-RAD). Všetky vzorky boli testované dvakrát za použitia príslušných pozitívnych a negatívnych kontrol.

Výsledky

Z celkového počtu 230 vzoriek stolíc od pacientov hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre, bolo rýchlym imunchromatografickým testom potvrdených 164 GDH pozitívnych a toxín A/B pozitívnych/negatívnych stolíc. Z nich toxín pozitívnych stolíc bolo 140, toxín negatívnych 24.

Pozitívna kultivácia bola potvrdená pri 161 vzorkách (98,2%). Pri 3 vzorkách (1,8%) bol výsledok kultivácie negatívny. Všetky kmene CD (n=161) boli multiplexnou PCR testované s cieľom zistiť prítomnosť génov *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* a 16S rDNA. Gén 16S rDNA bol potvrdený pri všetkých testovaných kmeňoch CD. Gény *tcdA* a *tcdB* boli potvrdené pri 139 kmeňoch *C. difficile* (86,3%), gény *cdtA* a *cdtB* boli prítomné pri 89 kmeňoch (55,3%). Pri 22 kmeňoch gény kódujúce toxíny neboli potvrdené (Tab. 1).

Tab. 1 Výskyt a profily génov kódujúcich toxíny *C. difficile*

Gény kódujúce toxíny	Počet pozitívnych kmeňov %
<i>tcdA</i>	139 (86,3%)
<i>tcdB</i>	139 (86,3%)
<i>cdtA, cdtB</i>	89 (55,3%)
Profily génov kódujúcich toxíny	
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺	50 (31,0%)
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>cdtA</i> ⁺ , <i>cdtB</i> ⁺	89 (55,3%)
<i>tcdA</i> ⁻ , <i>tcdB</i> ⁻ , <i>cdtA</i> ⁻ , <i>cdtB</i> ⁻	22 (13,7%)

Diskusia

Do štúdie bolo zahrnutých 164 vzoriek stolíc od pacientov s klinickými príznakmi klostrídiovej enterokolitídy, hospitalizovaných vo Fakultnej nemocnici v Nitre. Pozitívna kultivácia sa potvrdila pri 161 vzorkách stolíc. V prípade 3 stolíc boli výsledky kultivácie opakovane negatívne. Najpravdepodobnejšou príčinou opakovaného zlyhania kultivácie bolo nesprávne uchovávanie a transport týchto vzoriek. Faktory virulencie toxín A a toxín B sa takmer vždy pri toxinogénnych kmeňoch *C. difficile* vyskytujú spoločne. V nami sledovanom súbore sme spoločný výskyt génov kódujúcich tieto toxíny zaznamenali pri 86,3% kmeňov. Gény, ktoré kódujú produkciu binárneho toxínu sme zaznamenali pri 55,3 % kmeňov, pričom tieto gény sa vždy vyskytovali spoločne s génmi pre toxíny A a B. Prevalencia týchto génov v porovnaní s údajmi z Českej republiky a Saudskej Arábie, kde pozitivita génov pre binárny toxín bola 33,45% a 38,7%, je oveľa vyššia (Senok et al., 2017, Krúťová, 2017).

Prítomnosť génov kódujúcich všetky tri toxíny *C. difficile* je charakteristická pre hypervirulentné kmene, ktoré sa vyznačujú schopnosťou epidemicky sa šíriť, ťažším priebehom ochorenia a opakovanými rekurenciami. Významné hypervirulentné kmene v krajinách strednej a východnej Európy patria k ribotypom 027 a 176. V roku 2012 boli v dvoch štúdiách uvedené údaje o ribotypizácii kmeňov *C. difficile* zo Slovenska, pričom prítomnosť ribotypov 027 a 176 v tom čase nebola dokázaná. Výskyt ribotypov 027 a 176 na našom území bol prvýkrát hlásený až v roku 2016. V súčasnosti je RT 176 dominantný hypervirulentný kmeň v

slovenských nemocniciach (Čurová et al., 2023). Situácia v susedných krajinách je mierne odlišná. V Českej republike zaznamenali 26,7 % výskyt RT 176 za obdobie rokov 2013-2015 (Krůtová et al., 2016) a 11,6 % za obdobie október-december 2017 (Krůtová et al., 2020). V Maďarsku bol potvrdený výskyt RT 176 na úrovni 6,7 % (Tóth et al., 2016), v Poľsku na úrovni 2,8 % (Aptekorz et al., 2017). Ďalší hypervirulentný ribotyp, RT 027, sa na Slovensku vyskytuje len zriedkavo, na úrovni 1,2 - 1,3 % (Čurová et al., 2023, Nováková et al., 2020). RT 027 je zriedkavý aj v susednej Českej republike (Krůtová et al., 2016, Krůtová et al., 2020), ale dominantný v Poľsku a Maďarsku, kde jeho výskyt dosahuje 82,4 % a 45,8 % (Aptekorz et al., 2017, Tóth et al., 2016).

Výsledky našej štúdie poukazujú na vysokú prevalenciu hypervirulentných kmeňov, vyznačujúcich sa produkciou všetkých troch toxínov. Zároveň odzrkadľujú kritickú situáciu v slovenských nemocniciach počas pandémie COVID-19. K rozvoju CDI prispievali najmä dva rizikové faktory. Prvým bolo časté podávanie širokospektrálnych antibiotík pacientom s COVID-19 a druhým nedodržiavanie epidemiologických opatrení zameraných na prevenciu šírenia hypervirulentných izolátov v dôsledku preplnených nemocníc a reprofilizácie viacerých oddelení.

Záver

Vzhľadom na zvýšený výskyt klostrídiovej enterokolitídy spôsobenej vysokou prevalenciou hypervirulentných kmeňov v slovenských nemocniciach je veľmi dôležitá včasná a rýchla diagnostika, cieleňá liečba a efektívna prevencia šírenia CDI. Absencia aktualizovaných odporúčaní pre diagnostiku a liečbu CDI na Slovensku je vysoko aktuálnym problémom v manažmente pacientov s týmto ochorením.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu TRANSFEC 2019/34-UPJŠ-6, financovaného Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky.

Literatúra

1. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016; 40: 95–9.

2. Oren A, Rupnik M. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: two validly published and correct names. *Anaerobe* 2018; 52: 125–126.
3. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 2014; 22(7): 406–16.
4. Miranda-Katz M, Parmar D, Dang R, et al. Epidemiology and risk factors for community associated *Clostridioides difficile* in children. *J Pediatr* 2020; 221: 99–106.
5. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012; 148(6): 1258–70.
6. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 Suppl 4: S63–81.
7. van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27(Suppl 2): S1–S21.
8. Senok AC, Aldosari KM, Alowaisheq RA, et al. Detection of clostridium difficile antigen and toxin in stool specimens: Comparison of the *C. difficile* quik chek complete enzyme immunoassay and GeneXpert *C. difficile* polymerase chain reaction assay. *Saudi J Gastroenterol*. 2017; 23(4):259-262.
9. Krůtová, Marcela. *Clostridium difficile*: Molekulární typizace klinicky významných izolátů. Dizertační práce, vedoucí Nyč, Otakar. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2017.
10. Krůtová, M, Nyc O, Matejkova J, et al. Molecular characterisation of Czech *Clostridium difficile* isolates collected in 2013–2015. *Int. J. Med. Microbiol*. 2016; 306:479–485.
11. Krůtová M, Capek V, Nycova E, et al. The association of a reduced susceptibility to moxifloxacin in causative *Clostridium (Clostridioides) difficile* strain with the clinical outcome of patients. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2020; 9:98.
12. Tóth, J, Urbán E, Osztie H, et al. Distribution of PCR ribotypes among recent *Clostridium difficile* isolates collected in two districts of Hungary using capillary gel electrophoresis and review of changes in the circulating ribotypes over time. *J. Med. Microbiol*. 2016; 65:1158–1163.

13. Aptekorz, M, Szczegielniak A, Wiechuła B, et al. Occurrence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in hospitals of Silesia, Poland. *Anaerobe*. 2017; 45:106–113.
14. Čurová K, Novotny M, Ambro L, et al. High prevalence of *Clostridioides difficile* ribotype 176 in the University Hospital in Kosice. *Pathogens* 2023; 12(3):430-443.
15. Nováková E, Stefkovicova M, Kopilec MG, et al. The emergence of *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 176 with a predominance of the *Clostridium difficile* ribotype 001 recognized in Slovakia following the European standardized clostridium difficile infection surveillance of 2016. *International Journal of Infectious Diseases* 2020; 90:111–115.

Invazívna feohyfomykóza spôsobená *Cladophialophora bantiana* u pacienta s transplantáciou pečene

Vladimír Hrabovský ^a, Viktória Takáčová ^a, Tatiana Baltesová ^b, Marián Švajdler ^c,
Katarína Čurová ^a, Radka Slebodníková ^a, Leonard Siegfried ^a

^a Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

^b Transplantačné oddelenie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice

^c Ústav patológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Cladophialophora bantiana je neurotropná huba, známa predovšetkým ako pôvodca mozgového abscesu takmer vždy s fatálnym priebehom. Najčastejší faktor, ktorý predisponuje pacientov k infekcii *C. bantiana*, je užívanie kortikosteroidov. Uvedená kazuistika sa zaoberá prípadom príjemcu transplantátu pečene, ktorý mal subkutánnu feohyfomykózu spôsobenú touto patogénnou hubou. Závažné komplikácie boli spôsobené sekundárnou bakteriálnou infekciou pomaly hojacich kožných defektov. K progresii a relapsom hubovo-bakteriálneho ochorenia dochádzalo predovšetkým po liečbe rejekcií pomocou metylprednizolónu. Pacient veľmi dobre odpovedal na liečbu posakonazolom, úplne eliminovať *C. bantiana* sa však nepodarilo. Navyše, dlhodobé podávanie posakonazolu bolo limitované pre jeho hepatotoxicitu.

Abstract

Cladophialophora bantiana is a neurotropic fungus, known primarily as the cause of brain abscess, which is associated with very high mortality. The most common factor that predisposes patients to *C. bantiana* infection is the use of corticosteroids. The mentioned case study deals with the case of a liver transplant recipient who had subcutaneous phaeohyphomycosis caused by this pathogenic fungus. Serious complications were caused by secondary bacterial infection of slow-healing skin defects. Progression and relapses of fungal-bacterial disease occurred mainly after treatment of rejections with methylprednisolone. The patient responded very well

to treatment with posaconazole, but *C. bantiana* could not be completely eliminated. In addition, long-term administration of posaconazole has been limited due to its hepatotoxicity.

Kľúčové slová: *C. bantiana*, subkutánna feohyfoomykóza, transplantácia pečene, rejekcia, posakonazol, metylprednizolón

Úvod

Cladophialophora bantiana je neurotropná huba zo skupiny *Dematiaceae*, známa predovšetkým ako pôvodca mozgového abscesu takmer vždy s fatálnym priebehom (Kantarcioglu et al., 2017). Presný environmentálny zdroj *C. bantiana* nie je známy, predpokladá sa, že expozícia vdýchnutím pôdy, rastlinnej hmoty pravdepodobne vedie k paranazálnej sínusovej infekcii, zatiaľ čo traumatická inokulácia zvyčajne spôsobuje subkutánnu infekciu (Badali et al., 2008). Subkutánne infekcie sú popisované menej často a môžu sa prejavovať lokálnymi aj systémovými prejavmi zahŕňajúcimi kožu, mäkké tkanivá, pľúca a kosti (Husey et al., 2005, Keyser et al., 2002, Desmet et al., 2016).

Najčastejším faktorom predisponujúcim pacientov k infekcii *C. bantiana* je užívanie kortikosteroidov. Orgánová transplantácia, trauma, diabetes mellitus a malígne ochorenie patria medzi hlavné predispozičné faktory, ale infekcia sa môže rozvinúť aj u imunokompetentných hostiteľov. Najmä liečba subkutánných (lokalizovaných) infekcií *C. bantiana* u inak zdravých jedincov môže viesť k úplnému vyliečeniu (Kantarcioglu et al., 2017, Maquiné et al., 2019, Bonifaz et al., 2009).

Kazuistika

35-ročný muž z Košíc (Slovensko) bol prijatý do nemocnice v auguste 2012. Sťažoval sa na edém a bolesť ľavého stehna. Jeho primárne ochorenie bola autoimunitná hepatitída so skleróznou cholangitídou pečene. Pacient podstúpil transplantáciu pečene v októbri 2009 a jeho udržiavacia imunosupresívna liečba zahŕňala prednizón, takrolimus a mykofenolát mofetil. Pacient počas obdobia po transplantácii nehlásil žiadnu traumu. Šesť mesiacov pred aktuálnym príjmom bol podávaný pulzný metylprednizolón 500 mg/deň (i.v.) x 5 na liečbu akútnej rejekcie pečene. Vyšetrenie magnetickou rezonanciou (MRI) odhalilo subkutánnu absces v prednej časti (dolnej tretine) ľavého stehna. Celá lézia bola chirurgicky odstránená a vzorky tkaniva boli

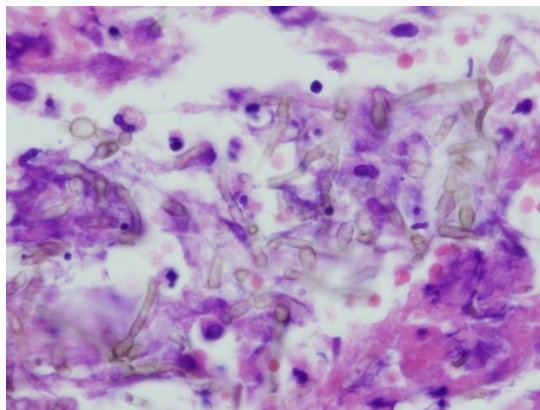
odoslané na ďalšie vyšetrenia. K dehiscencii rany došlo niekoľko dní po operácii. Napriek chirurgickej liečbe rany a antibiotikám sa stav ďalej zhoršoval. Zápalovo - deštruktívny proces sa rýchlo šírilo do kože a podkožia v okolí rany. Histopatologické vyšetrenie odhalilo prítomnosť hýf, ktoré boli neskôr identifikované ako *Cladophialophora bantiana* (Obr. 1a, b, c). Pacient podstúpil ďalšiu chirurgickú liečbu, k antibiotikám bol pridaný posakonazol (p.o.) 200 mg x 4/deň. V priebehu štyroch týždňoch nastalo zlepšenie celkového stavu. Pacient podstúpil chirurgickú rekonštrukciu rany/lézie s prekrytím pomocou kožného štepu. Ďalší priebeh bol komplikovaný sekundárnou bakteriálnou infekciou s tvorbou hnisu, abscesov a rozvojom sepsy (Obr. 2a, 3a). Kultivačne z rany bola potvrdená *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a neskôr *C. bantiana*. Po chirurgickom ošetrení rany bol aplikovaný systém VAC (vacuum assisted closure). Liečba zahŕňala aj zníženie imunopresie. Pacient dostával antibiotiká a kombináciu posakonazolu spolu s anidulafungínom (i.v.) 100 mg denne. V priebehu dvoch mesiacov došlo k úplnej regresii abscesov a obnoveniu hojenia. Pacient ďalej pokračoval v liečbe itrakonazolom (p.o.) 100 mg/deň.

Opätovná progresia ochorenia bola zaznamenaná po pulznej liečbe metylprednizolónom v januári 2013. Komplikáciou v tom čase bolo poškodenie pečene v dôsledku ACR (acute cellular rejection). Kombinácia chirurgickej liečby, itrakonazolu 200 mg/deň a antibiotík pokračovala až do úplného zhojenia v priebehu piatich mesiacov. Pacient zostal na liečbe itrakonazolom 100 mg/deň ešte rok.

Relaps ochorenia bol zaznamenaný v máji 2016. Na mieste predchádzajúcej rany došlo k vzniku bolestivého opuchu. MRI potvrdilo absces v stehne (Obr. 2b). Kultivácia odobraných materiálov bola pozitívna na *K. pneumoniae* a *Enterococcus faecalis*. Pacient podstúpil chirurgickú liečbu, dostával antibiotiká a itrakonazol 100 mg denne. MRI o dva mesiace neskôr odhalilo početné abscesy mäkkých tkanív v celej prednej časti stehna. V tom čase už z odobraných materiálov rástla *C. bantiana*. Bola potrebná ďalšia chirurgická liečba plus zmena na vorikonazol (p.o.) 200 mg 2 x denne. V priebehu dvoch mesiacov došlo k úplnej regresii abscesov, avšak hojenie lézií nepokračovalo dobre. Po dosiahnutí terapeutického maxima na vorikonazole nasledovala zmena za itrakonazol 200 mg/deň. Na ochranu rany bol používaný kolagen-hydrogélový obväz.

Ďalšia progresia ochorenia bola opäť zaznamenaná po pulznej metylprednizolónovej liečbe ACR v apríli 2017. Kultivácie boli pozitívne na *E. faecalis*, po ktorej nasledovali *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* a *C. bantiana*. Liečba trvala dva mesiace a zahŕňala debridement, VAC, kožné štepy, antibiotiká podľa citlivosti a itrakonazol 200 mg/deň. Kontrolné MRI

odhalilo mnohopočetné abscesy v stehne, proces zasahoval až do slabiny. Preto bolo indikované zníženie imunosupresie a do liečby bol pridaný amfotericín B lipid komplex (i.v.) 6 mg/kg. V dôsledku zhoršenia renálnych funkcií bola po týždni zmena na posakonazol 200 mg x 4/deň. O dva mesiace neskôr boli všetky lézie takmer úplne zhojené (Obr. 3b). Pacient pokračoval na posakonazole bez antibiotík až do novembra 2017, keď bolo biopticky diagnostikované toxické poškodenie pečene. Dva týždne po vysadení posakonazolu postihnutá oblasť znovu opuchla. Nasledovala liečba lipidovým amfotericínom B 4 mg/kg plus kaspofungín (i.v.) 50 mg/deň a antibiotiká až do ukončenia VAC terapie vo februári 2018. Potom bol podávaný vorikonazol 100 mg 2 x denne bez antibiotík počas 10 mesiacov. Rana zostávala stabilná, ale celkový stav pacienta sa zhoršoval, dostal bronchopneumóniou a zomrel v decembri 2018 v dôsledku septického šoku.



Obr. 1a Vzorka tkaniva farbená hematoxylínom eozínom (zväčšenie 400x), prítomnosť vláknitých štruktúr.



Obr. 1b Kultúra z rany, rast plesne s charakteristickou textúrou, Sabouraudov agar pri 25 ° C po dvoch týždňoch inkubácie.



Obr. 1c Farbenie preparátu pomocou laktofenolu (zväčšenie 400 x), rozvetvené a septoné hýfy s reťazami eliptických konídií.



Obr. 2a (vľavo). MRI snímky ľavého stehna po chirurgickej rekonštrukcii v októbri 2012. Abscesy a rozsiahle zápalové zmeny.



Obr. 2b (vpravo). Ľavé stehno po relapse abscesu v máji 2016. Veľký multiokulárny absces.



Obr. 3a (vľavo). Chirurgické ošetrenie, október 2012. Pôvodná rana na bočnej strane ľavého stehna (medzi dvoma ďalšími rezmi).

Obr. 3b (vpravo). Chirurgické ošetrenie, august 2017. Prihojenie kožných štepov.

Záver

V uvedenej kazuistike uvádzame prípad príjemcu transplantátu pečene, ktorý mal subkutánnu feohyfoomykózu spôsobenú *C. bantiana*. Závažné komplikácie boli spôsobené sekundárnou bakteriálnou infekciou pomaly hojajúcich kožných defektov/lézií. K progresii/relapsom hubovo-bakteriálneho ochorenia dochádzalo predovšetkým po liečbe rejekcií pomocou metylprednizolónu. Pacient veľmi dobre odpovedal na liečbu posakonazolom, avšak úplne eliminovať *C. bantianu* sa nepodarilo. Navyše, dlhodobé podávanie posakonazolu bolo limitované pre jeho hepatotoxicitu.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu TRANSFEC 2019/34-UPJŠ-6, financovaného Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky.

Literatúra

1. Kantarcioglu AS, Guarro J, De Hoog S, Apaydin H, Kiraz N. An updated comprehensive systematic review of *Cladophialophora bantiana* and analysis of epidemiology, clinical characteristics, and outcome of cerebral cases. *Med Mycol.* 2017; 55:579-604.

2. Badali H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, Gerrits van den Ende AGH, de Hoog GH. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Stud Mycol.* 2008; 61:175-191.
3. Hussey SM, Gander R, Southern P, Hoang MP. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana*. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129:794-797.
4. Keyser A, Schmid FX, Linde HJ, Merk J, Birnbaum DE. Disseminated *Cladophialophora bantiana* infection in a heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant.* 2002; 21:503-505.
5. Desmet S, Smets L, Lagrou K, Derdelinckx I, Neyt J, Maertens J, et al. *Cladophialophora bantiana* osteomyelitis in a renal transplant patient. *Med Mycol Case Rep.* 2016; 12:17-20.
6. Maquiné GÁ, Rodrigues MHG, Schettini APM, Morais PM, Frota MZM. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*: a first case report in an immunocompetent patient in Latin America and a brief literature review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52: e20180480.
7. Bonifaz A, de Hoog S, McGinnis MR, Saúl A, Rodríguez-Cortés O, Araiza J, et al. Eumycetoma caused by *Cladophialophora bantiana* successfully treated with itraconazole. *Med Mycol.* 2009; 47:111-114.

Epidemiológia ochorenia COVID-19, etiológia, rizikové faktory a možnosti diagnostiky

Simona Sonderlichová ^a, Beata Čechetková ^b, Monika Halánová ^b

^a *Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

^b *Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

Abstrakt

Pandémia COVID-19 postihla stovky miliónov ľudí a mala enormný dopad na zdravotný a ekonomický systém. Toto infekčné ochorenie je vyvolané koronavírusom 2 spôsobujúcim závažný akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2), ktorý je súčasťou rodiny koronavírusov (CoV). Extrémne rýchly prenos, globálne šírenie a neustále sa meniace varianty zostávajú naďalej hrozbou vo svete. Potreba ďalšieho intenzívneho výskumu vírusu SARS-CoV-2, jeho vlastností, patogenézy ochorenia, protiepidemických a profylaktických opatrení ako aj diagnostických a terapeutických možností je naďalej nevyhnutná.

Abstract

The COVID pandemic has affected hundreds of millions of people and has had a huge impact on the health and economic system. This infectious disease is caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which belongs to the coronavirus family (CoV). Extremely rapid global spread and rapidly changing variants remain a worldwide threat. The need for further intensive research on SARS-CoV-2, its properties, pathogenesis, anti-pandemic, and prophylactic measures as well as diagnostics and therapeutic options remains essential.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, COVID-19, pandémia, SARS-CoV-2 varianty, pramene nákazy

Úvod

V decembri roku 2019 v čínskom meste Wuhan v provincii Hubei došlo k prepuknutiu zápalu pľúc neznámej príčiny (WMHC et al., 2019). O pár dní neskôr bol pôvodca tejto záhadnej pneumónie identifikovaný ako nový koronavírus niekoľkými nezávislými laboratóriami (Lu et al., 2020, Zhou et al., 2020, Zhu et al., 2020). Vírus spôsobujúci infekciu bol Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) dočasne pomenovaný ako koronavírus 2 spôsobujúci závažný akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2) a príslušné infekčné ochorenie bolo pomenované ako koronavírusová choroba 2019 (COVID-19). WHO vyhlásila dňa 11. marca 2020 v súvislosti s touto nákazou pandémie. K 4. marcu 2024 bolo potvrdených 703 874 737 prípadov vo viac ako 230 krajinách alebo regiónoch. Medzi najviac postihnuté krajiny patrí USA, India, Francúzsko, Nemecko a Brazília. Počet uzdravených z infekcie COVID-19 je viac ako 674 796 237, zomrelo viac ako 7 003 576 ľudí. Na Slovensku bolo k 4. marcu 2024 infikovaných 1 877 383 osôb, 1 844 976 sa uzdravilo a 21 221 ľudí ochoreniu podľahlo (Worldmeter, 2024). Od začiatku pandémie COVID-19 došlo k vážnemu zasiahnutiu mnohých krajín po celom svete a ochromeniu mnohých systémov zdravotnej starostlivosti. Pandémia taktiež významne ovplyvnila globálnu ekonomiku.

Etiológia a geografické rozšírenie SARS-CoV-2

Medzinárodný výbor pre taxonómiu vírusov zaradil koronavírusy do čeľade *Coronaviridae*, podčeľad *Orthocoronavirinae* a rad *Nidovirales*. SARS-CoV-2 je betaCoV a je to siedmy koronavírus, ktorý spôsobuje infekciu u ľudí a v poradí tretí po ťažkom akútnom respiračnom syndróme (SARS) a blízkovýchodnom respiračnom syndróme (MERS), ktorý spôsobil epidémiu a má pandemický potenciál (Chen et al., 2020, Wang et al., 2020, Wu et al., 2020, Wu et al., 2020, Wu & McGoogan, 2020). Iniciálne bola odhadovaná mortalita 3-9 % (WHO, 2020, Wang et al., 2020). V súčasnosti sa podobná mortalite sezónnej chrípky, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 0,05 % - 0,5 % napriek značnej variabilite v závislosti od sledovaného roka a počtu pacientov (Horita & Fukumoto, 2023). Nedávny výskum poukázal na to, že SARS-CoV-2 pravdepodobne vznikol u netopierov na základe podobnosti genetickej sekvencie s ostatnými koronavírusmi. Zvierací medzihostiteľ SARS-CoV-2 medzi pravdepodobným netopierím rezervoárom a človekom je stále neznámy (Zhou et al., 2020). Medzičasom sa

SARS-CoV-2 z pôvodného ohniska nákazy rozšíril celosvetovo do viac ako 230 krajín a regiónov (Worldmeter, 2024).

Štruktúra SARS-CoV-2

CoV sú RNA vírusy a majú najväčšie genómy (26–32 KB) spomedzi všetkých RNA vírusov. Priemer jedného viriónu je 50–200 nm (Chatterjee, 2020). Virión SARS-CoV-2 má najčastejšie sférický tvar, ale vyskytujú sa aj pleomorfné a oválne tvary. Vírusový obal je tvorený z troch proteínov, a to S-spike proteín, ktorý vytvára peploméry a dodáva vírusu charakteristický tvar koruny, M-membránový proteín a E-obalový proteín, ktoré poskytujú kruhovú štruktúru (Chen et al., 2020, Lu & Shi, 2020). Existuje aj štvrtý proteín, N-nukleokapsidový proteín, fosfoproteín, ktorý je štrukturálnou zložkou nukleokapsidu (Wu et al., 2020, Wu & McGoogan, 2020, Chatterjee, 2020, Lu & Shi, 2020, Navratil et al., 2020).

Replikačný cyklus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 sa dostáva do hostiteľskej bunky, keď spike glykoproteín prítomný na povrchu vírusového obalu rozpoznáva receptory angiotenzín konvertujúceho enzýmu 2 (ACE2), rovnako ako pri SARS-CoV (Lua et al., 2020, Wrapp et al., 2020). SARS-CoV-2 S proteín sa viaže na ACE2 s vyššou afinitou ako SARS-CoV, čo pravdepodobne vedie k rýchlejšiemu šíreniu v populácii (Wrapp et al., 2020). ACE2 je vysoko exprimovaný vo viacerých ľudských bunkách vrátane alveolárnych buniek typu II (AT2), orálnych, pažerákových, ileálnych epitelových bunkách, bunkách myokardu, bunkách proximálnych tubulov obličiek a tiež urotelových bunkách močového mechúra (Zou et al., 2020). Je zaujímavé, že expresia ACE2 v gastrointestinálnom, kardiovaskulárnom, urinálnom, endokrinnom (pankreatickom) a genitourinálnom (semenníku) systéme je extrémne vyššia ako v prevládajúcom celi vírusu, respiračnom systéme (Zou et al., 2020). Dôkazy nepreukázali prítomnosť SARS-CoV-2 v niektorých orgánoch bohatých na receptory ACE2, ako napríklad v prostatickej sekrécii pacientov s COVID-19 (Zhang et al., 2020). Preto neexistuje žiadna korelácia medzi infekčnosťou vírusu a úrovňou expresie ACE2.

SARS-CoV-2 varianty

Všetky vírusy vrátane SARS-CoV-2 sa časom menia. Väčšina zmien má malý alebo žiadny vplyv na vlastnosti vírusu, avšak niektoré zmeny môžu byť významné a ovplyvnia rýchlosť

šírenia sa vírusu, závažnosť prebiehajúceho ochorenia, účinnosť vakcín, terapeutických liekov, diagnostických nástrojov alebo iných nástrojov verejného zdravia a zdravotnej starostlivosti (WHO, 2023).

Sledované varianty (VUM z ang. Variants under monitoring)

Varianty SARS-CoV-2 s genetickými zmenami, pri ktorých existuje podozrenie, že ovplyvňujú vlastnosti vírusu a skoré signály rastovej výhody v porovnaní s inými cirkulujúcimi variantmi, ale pri ktorých dôkaz fenotypového alebo epidemiologického vplyvu zostáva nejasný, čo si vyžaduje zvýšené monitorovanie a opätovné hodnotenie. Ak má variant neobvykle veľký počet mutácií na známych antigénnych miestach, ale s veľmi malým počtom sekvencií a nie je možné odhadnúť jeho relatívnu rastovú výhodu, takýto variant môže byť označený ako VUM, ak zároveň existuje dôkaz o komunitnom prenose v ≥ 2 krajinách v priebehu 2 - 4 týždňov (WHO, 2023).

Varianty záujmu (VOI z ang. Variants of interest)

Variant SARS-CoV-2 s genetickými zmenami, o ktorých sa predpokladá alebo je známe, že ovplyvňujú vlastnosti vírusu, ako je prenosnosť, virulencia, únik protilátkam, citlivosť na terapiu a diagnostiku a je identifikovaná výhoda rastu oproti iným cirkulujúcim variantom vo viac ako jednom regióne WHO s rastúcou relatívnou prevalenciou spolu s rastúcim počtom prípadov v čase alebo iné zjavné vplyvy na epidemiológiu, ktoré naznačujú vznikajúce riziko pre globálne verejné zdravie (WHO, 2023).

Znepokojujúce varianty (VOC, z ang. - Variants of concern)

Variant SARS-CoV-2, ktorý spĺňa definíciu VOI, na základe posúdenia rizika je spojený so strednou alebo vysokou mierou spoľahlivosti a spĺňa v porovnaní s inými variantmi aspoň jedno z kritérií ako je škodlivá zmena klinickej závažnosti ochorenia, alebo zmena v epidemiológii COVID-19, ktorá má podstatný vplyv na schopnosť zdravotných systémov poskytovať starostlivosť pacientom s COVID-19 alebo inými ochoreniami a vyžaduje si závažné zásahy v oblasti verejného zdravia, alebo významné zníženie účinnosti dostupných vakcín pri ochrane proti závažným ochoreniam (WHO, 2023).

Pramene nákazy a cesty prenosu

Človek (horizontálny a vertikálny)

Respiračný prenos

Primárny spôsob prenosu SARS-CoV-2 je prostredníctvom kvapôčkovej infekcie z blízkeho kontaktu alebo prenosu kvapiek od presymptomatických, asymptomatických alebo symptomatických jedincov, ktorí nesú tento vírus. Pri šírení COVID-19 je možný aj prenos aerosólom (Wei & Li, 2020).

Fekálno-orálny prenos (alebo fekálny aerosól)

Na začiatku epidémie bola teória o fekálno - orálnom prenose kvôli známej vysokej koncentrácii receptorov ACE2 v tenkom čreve (Gu & Han & Wang, 2020). Hoci je vírusová RNA bežne detegovaná v stolici, živý vírus bol izolovaný len zriedka (Parasa et al., 2020).

Vertikálny prenos

Metaanalýza zahŕňajúca 936 novorodencov od matiek s ochorením COVID-19 ukázala, že vertikálny prenos je možný, ale vyskytuje sa v menšine prípadov (Kotlyar et al., 2021). Miera nákazy je podobná ako u iných patogénov, ktoré spôsobujú vrodené infekcie.

Sexuálny prenos a prenos krvou

Žiadne súčasné dôkazy nepodporujú sexuálny prenos SARS-CoV-2. Vírusová RNA sa našla v ejakuláte, aj keď infekčný vírus nebol izolovaný (Li et al., 2020). V prípade prenosu infekcie medzi sexuálnymi partnermi by nebolo možné vylúčiť prenos z dýchacích ciest. Podiel osôb s vírusovou RNA detekovateľnou v krvi nie je v súčasnosti známy. Doteraz nebol zo vzoriek krvi izolovaný žiadny vírus schopný replikácie a neexistujú ani zdokumentované prípady prenosu krvou (Meyerowitz et al., 2021).

Zvieratá (zoonózy)

Niekoľko štúdií potvrdilo, že SARS-CoV-2 môže infikovať domáce zvieratá, vrátane mačiek, psov a fretiek (Shi et al., 2020, Sit et al., 2020, Richard et al., 2020, Garigliany et al., 2020). Vírus sa dobre replikuje u mačiek (ale nie u psov) a je prenosný medzi mačkami a fretkami (Richard et al., 2020, Halfmann et al., 2020). Nie sú potvrdené žiadne prípady prenosu z domácich zvierat na ľudí.

Prenos priamym kontaktom (neživé povrchy)

Prenos SARS-CoV-2 z kontaminovaných povrchov bol dobre charakterizovaný na základe mnohých štúdií uvádzajúcich životaschopnosť SARS-CoV-2 na rôznych poréznych a neporéznych povrchoch. Centrá pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC z ang. The Centers for Disease Control and Prevention) vydali aktualizáciu, v ktorej sa uvádza, že človek sa môže infikovať SARS-CoV-2 cez kontakt s povrchmi kontaminovanými vírusom, ale riziko je nízke a nie je hlavnou cestou prenosu (Cascella et al., 2022).

Základné reprodukčné číslo R_0 , inkubačná doba a superširoenie

Dôležitým faktorom pri sledovaní šírenia koronavírusu je efektívne reprodukčné číslo infekčného ochorenia. Základné reprodukčné číslo (R_0) je definované ako priemerný počet sekundárnych prípadov, ktoré by boli generované primárnym prípadom v úplne vnímavej populácii bez akéhokoľvek zásahu (Anderson & May, 1992). Hodnotu R_0 ovplyvňuje mnoho faktorov, preto ho odborníci interpretujú opatrne. Heterogenitu odhadov R_0 je možné najlepšie vysvetliť vysokou odchýlkou pravdepodobnosti prenosu z jedného prípadu na druhý. Sériový interval a inkubačná doba sú dva hlavné epidemiologické parametre, ktoré určujú dynamiku prenosu infekčných ochorení (Chan et al., 2020). Sériový interval je definovaný ako čas od nástupu ochorenia v primárnom prípade do nástupu ochorenia v sekundárnom prípade, zatiaľ čo inkubačná doba je čas od vzniku infekcie do nástupu prejavov a symptómov. Predchádzajúce štúdie uvádzajú, že priemerný sériový interval COVID-19 je kratší ako priemerná inkubačná doba, čo naznačuje podstatnú časť presymptomatického prenosu (Nishiura & Linton & Akhmetzhanov, 2020, Viego et al., 2020).



Obr. 1 Šírenie COVID-19 (upravené podľa Azkur et al., 2020)

Rizikové faktory

Jednotlivci všetkých vekových skupín sú vystavení riziku nákazy touto infekciou a závažným priebehom ochorenia. Avšak pacienti vo veku ≥ 60 rokov a pacienti so sprievodnými komorbiditami (obezita, kardiovaskulárne ochorenia, chronické ochorenie obličiek, cukrovka, chronické ochorenie pľúc, fajčenie, onkologické ochorenia, pacienti s transplantovanými orgánmi alebo po transplantácii krvotvorných kmeňových buniek) majú zvýšené riziko vzniku závažnej COVID-19 infekcie. Údaje týkajúce sa rozdielov pohlaví naznačujú, že mužom hrozí zvýšené riziko závažného ochorenia a zvýšenej úmrtnosti na COVID-19 v porovnaní so ženami (Gebhard et al., 2020, Jin et al., 2020). Závažnosť ochorenia a úmrtnosť na COVID-19 sa líši medzi rôznymi etnickými skupinami (Gebhard et al., 2020). Výsledky metaanalýzy 50 štúdií amerických a britských vedcov zistili, že Černosi, ľudia hispánskej a ázijskej etnickej menšiny sú vystavení zvýšenému riziku nákazy a úmrtia na infekciu COVID-19 (Sze et al., 2020).

Klinická manifestácia COVID-19

U ľudí infikovaných SARS-CoV-2 bola hlásená široká škála klinických symptómov - od mierneho priebehu ochorenia po akútny zápal pľúc. Typické klinické príznaky COVID-19 sa

pohybujú od asymptomatického stavu po horúčku, kašeľ, únavu a bolesť hlavy, stratu chuti a čuchu, dýchavičnosť, generalizovanú myalgiu, malátnosť, ospalosť, hnačku a zmätenosť. Niektorí pacienti majú vážnejší priebeh ochorenia vyžadujúci hospitalizáciu, vrátane symptómov závažnej pneumónie a komplikácií, ako je syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS), ktoré vedú k pľúcnemu edému a zlyhaniu pľúc, akútnemu zlyhaniu obličiek alebo dysfunkcii viacerých orgánov a nakoniec k smrti. ARDS je hlavnou príčinou smrti pri ochorení COVID-19 a vedecké analýzy doposiaľ odhaľujú, že vyvoláva podobné imunopatogénne znaky pri infekciách SARS a MERS (Huang et al., 2020). Jednou z hlavných vlastností ARDS je cytokínová búrka - nekontrolovaná systémová zápalová reakcia vyplývajúca z uvoľňovania prozápalových cytokínov a chemokínov imunitnými efektorovými bunkami (Li et al., 2020). Dlhý COVID (niekedy označovaný ako postakútne následky COVID-19) je multisystémové ochorenie zahŕňajúce často závažné príznaky a vyskytuje sa najmenej v 10 % prípadov infekcie. Bolo identifikovaných viac ako 200 príznakov postihujúce viaceré orgánové systémy (David et al., 2023).

Diagnostika COVID-19

Citlivá, špecifická a rýchla diagnostika COVID-19 je rozhodujúca pri identifikácii pozitívnych prípadov, vyhľadávaní kontaktov, hľadani zdroja vírusu a nastavení opatrení pre zamedzenie šírenia sa infekcie. Za týmto účelom, podobne ako pri SARS a MERS, bola vyvinutá široká škála testov detegujúcich špecifické antigény a protilátky SARS-CoV-2 (Al Jonahi & Hajeer, 2016). Taktiež je dôležité získať podrobnú klinickú anamnézu týkajúcu sa nástupu a trvania symptómov, cestovateľskej anamnézy, kontaktu s infikovanými osobami, existujúcich ochorení a užívania liekov. Testy na COVID-19 môžu byť rozdelené ako testy na nukleové kyseliny, antigénové, sérologické a pomocné testy. Všetky tieto testy zohrávajú odlišnú úlohu v testovaní v nemocnici, rýchlom testovaní alebo vo veľkom meradle pri populačnom testovaní (Weissleder et al., 2020).

Záver

Napriek intenzívnemu celosvetovému výskumu stále chýba komplexný pohľad na patogenézu, progresiu, včasné a neskoré komplikácie ochorenia COVID-19. Vzniknutá pandémia mala výrazný dopad na globálnu ekonomiku a tento vplyv stále pretrváva. SARS-CoV-2 vykazuje neočakávanú vysokú rýchlosť prenosu a globálne šírenie kvôli dlhému

obdobiu infekčného okna pred nástupom symptómov, asymptomatickým nosičom, a superroznašačom. Súčasný globalizovaný svet a ľahko dostupné cestovanie uľahčuje prenos nákazy z jednej časti sveta na druhú v priebehu niekoľkých hodín. Vzhľadom na povahu ochorenia je veľmi náročné ovplyvniť roznašačov COVID-19, ako sú asymptomatickí pacienti, nedávno infikovaní pacienti v inkubačnej dobe či ľudia po prekonaní ochorenia s ešte pretrvávajúcou vírusovou pozitivitou. Vedci na celom svete intenzívne skúmajú vírus SARS-CoV-2, patogenézu ochorenia, dostupnú a rýchlu diagnostiku, efektívnu terapiu ochorenia, obzvlášť neskorých pretrvávajúcich komplikácií COVID-19 a nastavenie efektívnych protiepidemických opatrení.

PodĎakovanie

Práca riešená v rámci projektu APVV PP-COVID-20-0064 a projektu operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja „AKARDIO COVID-19“, ITMS2014+:313011AUB1.

Literatúra

1. WMHC WUHAN MUNICIPAL HEALTH COMMISSION, et al. Report of clustering pneumonia of unknown etiology in Wuhan City. 2019.
2. LU, Roujian, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 2020, 395.10224: 565-574.
3. ZHOU, Peng, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 2020, 579.7798: 270-273.
4. ZHU, Na, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*, 2020.
5. COVID, Worldometer. Coronavirus pandemic. 19. [cit. 04.03.2024]. Dostupné z <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
6. CHEN, Nanshan, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The lancet*, 2020, 395.10223: 507-513.
7. WANG, Qihui, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 2020, 181.4: 894-904. e9.

8. WU, Canrong, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10.5: 766-788.
9. WU, Fan, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579.7798: 265-269.
10. WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama*, 2020, 323.13: 1239-1242.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard. 2020. [cit. 18.3.2021]. Dostupné z <https://covid19.who.int/>.
12. WANG, Yishan, et al. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of medical virology*, 2020, 92.6: 538–539.
13. HORITA, Nobuyuki; FUKUMOTO, Takeshi. Global case fatality rate from COVID-19 has decreased by 96.8% during 2.5 years of the pandemic. *Journal of medical virology*, 2023, 95.1.
14. ZHOU, Peng, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*, 2020. [cit. 2.7.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>.
15. CHATTERJEE, Sidharta. Understanding the nature of variations in structural sequences coding for coronavirus spike, envelope, membrane and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2. *Envelope, Membrane and Nucleocapsid Proteins of SARS-CoV-2 (March 28, 2020)*, 2020.
16. LU, Qi; SHI, Yuan. Coronavirus disease (COVID-19) and neonate: What neonatologist need to know. *Journal of medical virology*, 2020, 92.6: 564-567.
17. NAVRATIL, Vincent, et al. The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) envelope (E) protein harbors a conserved BH3-like sequence. *bioRxiv*, 2020. [cit. 2.7.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.033522>.

18. LUAN, Junwen, et al. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 2020, 526.1: 165-169.
19. WRAPP, Daniel, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367.6483: 1260-1263.
20. ZOU, Xin, et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of medicine*, 2020, 1-8.
21. ZHANG, Shiqi, et al. The absence of coronavirus in expressed prostatic secretion in COVID-19 patients in Wuhan city. *Reproductive Toxicology*, 2020, 96: 90-94.
22. WHO Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants, 4 October 2023 [cit. 6.3.2024]. Dostupné z <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>.
23. WEI, Jianjian; LI, Yuguo. Airborne spread of infectious agents in the indoor environment. *American journal of infection control*, 2016, 44.9: S102-S108.
24. GU, Jinyang; HAN, Bing; WANG, Jian. COVID-19: gastrointestinal manifestations and potential fecal–oral transmission. *Gastroenterology*, 2020, 158.6: 1518-1519.
25. PARASA, Sravanthi, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms and fecal viral shedding in patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *JAMA network open*, 2020, 3.6: e2011335-e2011335.
26. KOTLYAR, Alexander M., et al. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2021, 224.1: 35-53. e3.
27. LI, D., et al. Clinical characteristics and results of semen tests among men with coronavirus disease 2019. *JAMA Netw Open*. 2020; 3 (5): e208292. *THE JOURNAL OF MATERNAL-FETAL & NEONATAL MEDICINE*, 2020, 3.
28. MEYEROWITZ, Eric A., et al. Transmission of SARS-CoV-2: a review of viral, host, and environmental factors. *Annals of internal medicine*, 2021, 174.1: 69-79.

29. SHI, Jianzhong, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 2020, 368.6494: 1016-1020.
30. SIT, Thomas HC, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, 586.7831: 776-778.
31. RICHARD, Mathilde, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nature communications*, 2020, 11.1: 1-6.
32. GARIGLIANY, Mutien, et al. SARS-CoV-2 natural transmission from human to cat, Belgium, March 2020. *Emerging infectious diseases*, 2020, 26.12: 3069.
33. HALFMANN, Peter J., et al. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383.6: 592-594.
34. CASCELLA, Marco, et al. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *StatPearls*, 2022. [cit. 21.1.2022]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
35. ANDERSON, Roy M.; MAY, Robert M. *Infectious diseases of humans: dynamics and control*. Oxford university press, 1992.
36. CHAN, Yung-Wai Desmond, et al. Transmission dynamics, serial interval and epidemiology of COVID-19 diseases in Hong Kong under different control measures. *Wellcome Open Research*, 2020, 5: 91.
37. NISHIURA, Hiroshi; LINTON, Natalie M.; AKHMETZHANOV, Andrei R. Serial interval of novel coronavirus (COVID-19) infections. *International journal of infectious diseases*, 2020, 93: 284-286.
38. VIEGO, Valentina, et al. Incubation period and serial interval of Covid-19 in a chain of infections in Bahia Blanca (Argentina). *Ciência & Saúde Coletiva*, 2020, 25: 3503-3510.
39. AZKUR, Ahmet Kursat, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 2020, 75.7: 1564-1581.
40. GEBHARD, Catherine, et al. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biology of sex differences*, 2020, 11: 1-13.
41. JIN, Jian-Min, et al. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. *Frontiers in public health*, 2020, 8: 152.

42. SZE, Shirley, et al. Ethnicity and clinical outcomes in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 2020, 100630.
43. HUANG, Chaolin, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 2020, 395.10223: 497-506.
44. LI, Xiaowei, et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2020, 10.2: 102-108.
45. DAVIS, Hannah E., et al. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21.3: 133-146.
46. AL JOHANI, Sameera; HAJEER, Ali H. MERS-CoV diagnosis: an update. *Journal of infection and public health*, 2016, 9.3: 216-219.
47. WEISSLEDER, Ralph, et al. COVID-19 diagnostics in context. *Science translational medicine*, 2020, 12.546.

Séroprevalencia anti-SARS-CoV-2 protilátok v regióne Košíc v jednotlivých demografických skupinách populácie počas pandémie COVID-19

Simona Sonderlichová ^a, Beáta Čečetková ^b, Martin Janičko ^c, Zuzana Kalinová ^b,
Elena Hatalová ^b, Vladimíra Turčok Šimová ^b, Veronika Bednárová ^b, Ingrid Babinská ^b,
Ivana Špaková ^d, Miroslava Rabajdová ^d, Monika Halánová ^b

^a *Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK, Lekárska fakulta, Univerzita P.*

J. Šafárika, Košice

^b *Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

^c *II. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

^d *Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

Abstrakt

Koronavírus 2 spôsobujúci závažný akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2), pôvodca koronavírusovej choroby 2019 (COVID-19), viedol ku globálnej pandémie. Epidemiologický dohľad nad potvrdenými prípadmi COVID-19 zachytáva len časť všetkých infekcií a vzhľadom na existenciu asymptomatických prípadov sú sérologické prieskumy cenným nástrojom na posúdenie rozsahu epidémie. Cieľom tejto prevalenčnej štúdie bolo odhadnúť séroprevalenciu infekcie SARS-CoV-2 na regionálnej úrovni na Slovensku. Realizovali sme ju na veľkej vzorke obyvateľstva (9554 ľudí) v období apríl-máj 2021 v regióne Košice a jeho okolí. Výsledky ukázali, že prevalencia anti-SARS-CoV-2 protilátok dosiahla 25 % (95 % CI 24,3-26 %). Séroprevalencia IgG protilátok bola 24 % (95 % CI 23,2-24,9 %) a séroprevalencia IgM bola približne 14 % (95 % CI 13,1-14,5 %). Rizikové faktory ovplyvňujúce séropozitivitu zahŕňali vyšší vek a BMI index, bydlisko na vidieku, nižší stupeň vzdelania, absenciu fajčenia, pozitívny výsledok testu na COVID-19 v minulosti a prítomnosť kardiovaskulárneho ochorenia v anamnéze.

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19), has led to a global pandemic. Epidemiological surveillance of confirmed COVID-19 cases captures only a fraction of all infections, and given the existence of asymptomatic cases, serological surveys are a valuable tool to assess the extent of the epidemic. The aim of this prevalence study was to estimate the seroprevalence of SARS-CoV-2 infection at the regional level in Slovakia. We conducted it on a large population sample (9554 persons) in the period April-May 2021 in the Košice region. The results showed that the prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibody was 25% (95% CI 24.3-26%). The seroprevalence of IgG antibodies was 24% (95% CI 23.2-24.9%) and the seroprevalence of IgM antibodies was approximately 14% (95% CI 13.1-14.5%). Risk factors influencing seropositivity included older age and higher BMI, rural residence, lower educational level, absence of smoking, history of a positive COVID-19 test, and presence of a history of cardiovascular disease.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, séroprevalencia, anti-SARS-CoV-2 protilátky, rizikové faktory

Úvod

Koronavírus 2 spôsobujúci závažný akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2) bol v decembri 2019 identifikovaný ako pôvodca ochorenia označeného ako COVID-19 (Lu a kol., 2020, Zhou a kol., 2020, Zhu a kol., 2020). Vírus vykazuje neočakávanú vysokú rýchlosť prenosu a globálneho šírenia aj vďaka dlhému obdobiu infekčného okna pred nástupom symptómov a vysokej mobilite svetovej populácie. V súčasnosti sa vírus v podstate rozšíril do celého sveta. Je dôležité nastaviť vhodné protiepidemické opatrenia, ktoré zahŕňajú získanie podrobnej klinickej anamnézy vrátane cestovateľskej anamnézy, informácie o kontakte s osobami s infekciou COVID-19 ako aj včasnú a efektívnu diagnostiku ochorenia. Epidemiologický dohľad nad potvrdenými prípadmi COVID-19 zachytáva len časť všetkých infekcií a naopak, populačný séroepidemiologický prieskum môže kvantifikovať podiel populácie, ktorá má anti-SARS-CoV-2 protilátky a poskytnúť informácie o podiele populácie, ktorá prekonala toto ochorenie (Pollán a kol., 2020). Zároveň, ak sú protilátky ukazovateľom celkovej alebo čiastočnej imunity, takýto prieskum môže identifikovať podiel populácie, ktorá zostáva vnímavá voči vírusu (Pollán a kol., 2020) a prispieť tak k hypotéze o formovaní kolektívnej imunity.

Materiál a metodika

Dizajn a ciele štúdie

Prevalenčnú štúdiu PREVCOVEAST sme realizovali ako prospektívnu, prierezovú štúdiu (cross sectional study design) s cieľom detegovať premorenosť populácie v regióne východného Slovenska novým koronavírusom SARS-CoV-2 spôsobujúcim ochorenie COVID-19 v jednotlivých demografických skupinách. Štúdiu sme realizovali v období apríl-máj 2021 v spolupráci s magistrátom mesta Košice na vzorke bežnej populácie. Súčasne sme identifikovali potenciálne rizikové faktory, ktoré môžu ovplyvňovať séroprevalenciu anti-SARS-CoV-2 protilátok. Skupina dobrovoľníkov bola náhodne vybratá a rozdelená podľa veku do 5 skupín, a to do 18 rokov, 19-35 rokov, 36-50 rokov, 51-65 rokov a seniori nad 65 rokov. Štúdie sa mohli zúčastniť obe pohlavia. Účasť bola podmienená podpisom informovaného súhlasu a štúdia bola schválená etickou komisiou.

Klinické vyšetrenie

Po podpise informovaného súhlasu vyplnili účastníci dotazník pri ich zaradení do štúdie. Otázky sme sformulovali s cieľom získať komplexné informácie, zahŕňajúce anamnestické údaje a antropometrické parametre ako vek, výšku, váhu, najvyššie dosiahnuté vzdelanie, bydlisko, história fajčenia, súčasné ochorenia, informácie o prekonaní COVID-19 v minulosti a prítomnosť symptómov ochorenia. Ak účastník prekonal COVID-19, zaznamenali sme aj čas od vykonania testu.

Kvalitatívne stanovenie protilátok

Účastníkom štúdie sme odobrali kapilárnu krv z bruška prsta po predchádzajúcej hyperemizácii miesta vpichu za dodržiavania základných zásad asepsy a antisepsy. Na kvalitatívne stanovenia anti-SARS-CoV-2 protilátok sme použili rýchlotest Orient Gene Biotech COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette (Orient Gene Biotech, Zhejiang, Čína) založenom na princípe imunochromatografického testu s laterálnym prietokom. Test detegoval protilátky skupiny IgM a IgG. Senzitivita testu na detekciu IgM protilátok bola 87,9 % a špecificita 100 %. Senzitivita testu na detekciu IgG protilátok bola 92,7 % a špecificita bola 100 %. Výsledky sme interpretovali ako negatívny, IgM pozitívny, IgG pozitívny alebo IgG a IgM pozitívny v závislosti od prítomnosti daných protilátok.

Hodnotenie

Pri vyhodnocovaní séropozitivity sme využili metódu rýchlotestu. Okrem toho sme uskutočnili podrobné analýzy na preskúmanie potenciálneho vplyvu demografických a anamnestických premenných, ktoré by mohli ovplyvňovať prevalenciu anti-SARS-CoV-2 protilátok. Na štatistické hodnotenie sme použili T-test alebo chí-kvadrát test (pri nízkych počtoch sme aplikovali Fisherov test). Pomery pravdepodobnosti pre pozitivitu protilátok sme vypočítali pomocou dôkladnej univariačnej logistickej regresie. Premenné prejavujúce pozitívne interakcie s protilátkami sme ďalej analyzovali, pričom sme zohľadnili vek a pohlavie prostredníctvom multivariačnej logistickej regresie.

Výsledky

Celkovo sme do štúdie zaradili 9554 účastníkov, z toho 57,5 % tvorili ženy a 42,5 % muži. Vekový medián bol 45 rokov. Najväčší podiel mala veková kategória 36 a 50 rokov (30,9 %) nasledovaná skupinou 51-65 rokov (26,7 %) a 19-35 rokov (26,2 %). Naopak, najmenšiu skupinu tvorili deti a adolescenti vo veku od 12 do 18 rokov (4,6 %) a seniori nad 65 rokov (11,6 %). Medián indexu telesnej hmotnosti (BMI) dosiahol hodnotu 26. Väčšina účastníkov pochádzala z veľkých miest (77,3 %), nasledovali účastníci z obcí (17,6 %) a malých miest (5 %). 55,4 % účastníkov malo stredoškolské vzdelanie, 37,6 % účastníkov vysokoškolské vzdelanie a najmenšiu skupinu tvorili účastníci so základným vzdelaním (6,9 %). Až 71,9 % účastníkov boli nefajčiari, 19,6 % bolo aktívnych fajčiarov a 8,5 % účastníkov bolo v kategórii bývalých fajčiarov. Približne 25 % účastníkov v minulosti prekonalo ochorenie COVID-19, ktoré mali potvrdené testom. V štúdiu sme sledovali aj výskyt pridružených ochorení a najväčšiu skupinu predstavovali ochorenia kardiovaskulárneho systému (23,4 %). Druhou najpočetnejšou skupinou prebiehajúcich ochorení boli ochorenia imunitného systému (8,2 %). Celková pozitivita anti-SARS-CoV-2 protilátok dosiahla hodnotu 25 %. 24 % účastníkov vykazovalo IgG pozitivitu, zatiaľ čo pozitivita protilátok skupiny IgM sa pohybovala na úrovni takmer 14 % (Tab. 1).

Tab. 1 Séroprevalencia anti-SARS-CoV-2 protilátok triedy IgG a IgM

	N počet	%	95 % CI
IgG pozitivita	2293	24	23,2-24,9 %
IgM pozitivita	1316	13,8	13,1-14,5 %
IgG alebo IgM pozitivita	2404	25,2	24,3-26 %

Pri sledovaní distribúcie protilátok v jednotlivých vekových skupinách sme najvyššiu pozitivitu protilátok triedy IgM detegovali v skupine 66 a viacročných, pozitivita protilátok triedy IgG bola najvyššia vo vekovej kategórii 12 – 18 ročných (Tab. 2).

Tab. 2 Detekcia anti-SARS-CoV-2 protilátok skupiny IgG a IgM v jednotlivých vekových skupinách

Vek	IgG+ (N = 2293)	IgM+ (N = 1316)
12-18	123 (28,0 %)	61 (13,9 %)
19-35	540 (21,6 %)	290 (11,6 %)
36-50	677 (23,0 %)	375 (12,7 %)
51-65	649 (25,4 %)	395 (15,5 %)
66 +	304 (27,4 %)	195 (17,6 %)

Po vykonaní univariačnej a multivariačnej regresnej analýzy sme v našej štúdií dospeli k záverom, že vyšší vek (45,8 +/- 16,5) a vyšší index telesnej hmotnosti (26,7 +/- 5,3) sú spojené so zvýšeným rizikom positivity IgG protilátok. Okrem toho sme identifikovali ďalšie významné faktory, ktoré pozitívne ovplyvňujú výskyt IgG protilátok, ako je bydlisko na vidieku, nižší stupeň vzdelania, absencia fajčenia, pozitívny výsledok testu na COVID-19 v minulosti a prítomnosť kardiovaskulárneho ochorenia v anamnéze. Naopak, poruchy imunity predstavovali negatívnu premennú positivity IgG protilátok. Podobné zistenia sme pozorovali aj v prípade IgM protilátok.

Diskusia

V našej prevalenčnej štúdií, realizovanej na rozsiahlej vzorke obyvateľstva v regióne Košice a jeho okolí, sme identifikovali, že prevalencia séropozitivity anti-SARS-CoV-2 protilátok (IgG a IgM) dosiahla hodnotu 25 %. Konkrétne, séroprevalencia IgG protilátok bola zistená na úrovni 24 % a séroprevalencia IgM sa priblížila 14 %. Vo svete sa uskutočnilo množstvo sérologických prieskumov s cieľom zistiť prevalenciu vírusu SARS-CoV-2. Lai a kol. vykonali systematický prehľad týchto štúdií a zistili, že séroprevalencia v jednotlivých krajinách/regiónoch vysoko varíruje a dokonca aj v rámci tej istej krajiny (napr. Francúzsko 2,7 %, 6,7 %, Španielsko 4,6 %, 5 %, Švajčiarsko 4,8 %, 8,5 %, 10,9 %, 6,6 %, 10,8 %, Taliansko 0,99 %, 11 %, 23 %). Táto variabilita séroprevalencie anti-SARS-CoV-2 protilátok je ovplyvnená rôznymi krajinami/regiónmi, kde sa realizovali štúdie, študovanými populáciami, časovými obdobiami pandémie COVID-19, ktoré zohľadňujú rôzne varianty vírusu a použitými metódami sérologického testovania.

V rámci našej štúdie sme identifikovali rizikové faktory, ktoré môžu viesť k zvýšenej séroprevalencii anti-SARS-CoV-2 protilátok.

V súvislosti s vekom sme pozorovali vyššie relatívne riziko infekcie u dospelých v produktívnom veku. Hoci je všeobecne akceptované, že vyšší vek predstavuje rizikový faktor pre komplikácie a úmrtnosť spojenú s COVID-19, vzťah medzi vekom a náchylnosťou na infekciu pravdepodobne závisí od viacerých faktorov (Richard a kol., 2022). Naša prevalenčná štúdia, rovnako ako iné sérologické prieskumy, prebehla počas obdobia vládnych reštrikcií, ktoré obmedzovali v rôznom rozsahu voľný pohyb obyvateľstva. Preto je pravdepodobné, že sociálna izolácia a zavedené preventívne opatrenia mohli ovplyvniť správanie detí, dospelých a starších ľudí rôznymi spôsobmi.

Ako ďalšiu premennú ovplyvňujúcu séropozitivitu sme identifikovali zvýšený BMI index. Podľa výskumu realizovaného Eastmentom a kol., existuje vyššia pravdepodobnosť, že osoby s vyšším indexom telesnej hmotnosti (BMI) budú testované pozitívne na SARS-CoV-2 v porovnaní so skupinou s normálnym BMI. Výsledky štúdie Frasca a kol. ukazujú, že BMI bol vyšší u jedincov testovaných pozitívne na SARS-CoV-2 vírus v porovnaní s tými, ktorí mali negatívne výsledky.

V našej štúdií sme nepozorovali žiadne významné rozdiely v miere séroprevalencie medzi mužmi a ženami. Podobné zistenia boli potvrdené aj v ďalších populačných štúdiách po celom svete. V Brazílii, mali muži vyššiu séroprevalenciu ako ženy (4,1 % vs. 3,5 %), tento rozdiel

však nebol štatisticky významný (Amorim Filho a kol., 2020). Podobný trend bol pozorovaný aj vo francúzskej štúdii (Gallian a kol., 2020). V Španielsku bola séroprevencia medzi mužmi a ženami podobná (Pollán a kol., 2020), a v USA nebol zistený jednoznačný vzťah medzi séroprevenciou a pohlavím na rôznych miestach (Havers a kol., 2020).

Okrem toho sme zistili, že ľudia s nižším stupňom vzdelania častejšie vykazujú protilátky v porovnaní s tými, ktorí dosiahli vyšší stupeň vzdelania. Tento fakt môže byť vysvetlený tým, že jedinci s nižším vzdelaním sú často spojení s rizikovejším správaním, ako je ignorovanie preventívnych opatrení, väčšia náchylnosť na dezinformácie a celkové nedodržovanie vládnych nariadení. Naše tvrdenie podporujú štúdie, ktoré vykonali Gornyk a kol. či Niedzwiedz a kol., ktorí dospeli k podobným záverom.

Viacere výskumy potvrdili, že riziko séropozitivity je u fajčiarov menšie (Ward a kol., 2020, Warszawski a kol., 2020, Fontanet a kol., 2020, Rentsch a kol., 2020, Simons a kol., 2021, Carrat a kol., 2021). K týmto záverom sme dospeli aj v našej štúdii. Existuje viacero hypotéz vplyvu fajčenia na expresiu receptora angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACE2) v bunkách dýchacích ciest a konkurencie medzi nikotínom a SARS-CoV-2 o nikotínový acetylcholínový receptor (nACfR), ktorý pôsobí ako ko-receptor pre vstup vírusu do buniek (Grundy a kol., 2020). Je nevyhnutý ďalší výskum, ktorý by zohľadnil aj ďalšie rizikové faktory.

Prekonanie ochorenia COVID-19 v minulosti sa preukázalo ako faktor pozitívne ovplyvňujúci SARS-CoV-2 pozitivitu. Táto pozitívna korelácia bola potvrdená aj nemeckou štúdiou, kde z 608 osôb, ktoré uviedli pozitívny výsledok testu na SARS-CoV-2 v minulosti, bolo 81 % (vo Freiburgu/Greifswalde) a 86 % (v Chemnitzi) séropozitívnych (Gornyk a kol., 2021). V štúdii Moscola a kol. bola zistená silná asociácia medzi podozrením na expozíciu SARS-CoV-2 vírusu a predchádzajúcim pozitívnym PCR testom a séropozitivitou.

V rámci našej štúdie sme zistili, že kardiovaskulárne ochorenia, vrátane hypertenzie, pozitívne ovplyvňujú séroprevenciu protilátok. Metaanalýzy od Yang a kol. potvrdili, že sprievodné choroby, ako je hypertenzia, diabetes, a kardiovaskulárne a respiračné ochorenia, výrazne ovplyvňujú výskyt COVID-19, čo je v súlade s našimi zisteniami. Na druhej strane sme zistili negatívnu koreláciu medzi ochoreniami imunitného systému a SARS-CoV-2 pozitivitou. Štúdia od Emmi a kol. naznačuje, že u pacientov s autoimunitnými ochoreniami nie je zvýšené riziko infekcie SARS-CoV-2.

Silnou stránkou našej prevalenčnej štúdie je veľkosť vzorky, na ktorej sme vykonali analýzy, čo umožňuje interpretáciu výsledkov v kontexte širšej populácie. Okrem toho, použitá metóda rýchlotestov bola relatívne finančne nenáročná, spoľahlivá a jednoducho vykonateľná. Ako limitácie štúdie považujeme nestabilnú epidemiologickú situáciu, a to rýchlo sa meniaci variant vírusu, nekonzistentné vládne nariadenia o obmedzení pohybu, stále vysoká miera infekčnosti, strach z nakazenia či rôzna motivácia ľudí zúčastniť sa štúdie. Tieto faktory, spolu s náladami obyvateľstva z pretrvávajúcej pandémie, mohli v rôznom smere ovplyvniť ochotu ľudí zúčastniť sa našej štúdie.

Záver

Záverom možno skonštatovať, že naša prevalenčná štúdia poskytla odhady rozsahu šírenia SARS-CoV-2 v regióne Košíc a okolia. Okrem toho naznačuje, že séroprevalencia vírusu je ovplyvnená rôznymi faktormi, ktoré je dôležité brať do úvahy. Naše výsledky ukazujú, že ľudia s vyšším vekom a indexom telesnej hmotnosti, žijúci na vidieku a s nižším stupňom vzdelania, nefajčiari s kardiovaskulárnymi ochoreniami, s potvrdeným ochorením COVID-19 v anamnéze a bez ohľadu na pohlavie, majú vyššie riziko séroprevalencie anti-SARS-CoV-2 protilátok. Naše zistenia predstavujú základ pre ďalší výskum, ktorý môže potvrdiť kauzálny vzťah medzi rôznymi faktormi a výskytom ochorenia COVID-19.

PodĎakovanie

Práca riešená v rámci projektu APVV PP-COVID-20-0064 a projektu operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja „AKARDIO COVID-19“, ITMS2014+:313011AUB1.

Literatúra

1. LU, Roujian, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 2020, 395.10224: 565-574.
2. ZHOU, Peng, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 2020, 579.7798: 270-273.
3. ZHU, Na, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*, 2020.

4. POLLÁN, Marina, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *The Lancet*, 2020, 396.10250: 535-544.
5. LAI, Chih-Cheng; WANG, Jui-Hsiang; HSUEH, Po-Ren. Population-based seroprevalence surveys of anti-SARS-CoV-2 antibody: An up-to-date review. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 101: 314-322.
6. RICHARD, Aude, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies, risk factors for infection and associated symptoms in Geneva, Switzerland: a population-based study. *Scandinavian journal of public health*, 2022, 50.1: 124-135.
7. EASTMENT, McKenna C., et al. BMI and outcomes of SARS-CoV-2 among US veterans. *Obesity*, 2021, 29.5: 900-908.
8. FRASCA, Daniela, et al. The majority of SARS-CoV-2-specific antibodies in COVID-19 patients with obesity are autoimmune and not neutralizing. *International Journal of Obesity*, 2022, 46.2: 427-432.
9. AMORIM FILHO, Luiz, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de saude publica*, 2020, 54: 69.
10. GALLIAN, Pierre, et al. Lower prevalence of antibodies neutralizing SARS-CoV-2 in group O French blood donors. *Antiviral research*, 2020, 181: 104880.
11. HAVERS, Fiona P., et al. Seroprevalence of antibodies to SARS-CoV-2 in 10 sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA internal medicine*, 2020, 180.12: 1576-1586.
12. GORNYK, Daniela, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence in germany: a population-based sequential study in seven regions. *Deutsches ärzteblatt international*, 2021, 118.48: 824.
13. NIEDZWIEDZ, Claire L., et al. Ethnic and socioeconomic differences in SARS-CoV-2 infection: prospective cohort study using UK Biobank. *BMC medicine*, 2020, 18: 1-14.
14. WARD, Helen, et al. Antibody prevalence for SARS-CoV-2 following the peak of the pandemic in England: REACT2 study in 100,000 adults. *MedRxiv*, 2020, 2020.08.12.20173690.

15. WARSZAWSKI, Josiane, et al. In May 2020, 4.5% of the population of metropolitan France had developed antibodies against SARS-CoV-2. *Etudes et Resultats (Drees)*, 2020, 1167.
16. FONTANET, Arnaud, et al. Cluster of COVID-19 in northern France: a retrospective closed cohort study. *MedRxiv*, 2020, 2020.04. 18.20071134.
17. RENTSCH, Christopher T., et al. Covid-19 testing, hospital admission, and intensive care among 2,026,227 United States veterans aged 54–75 years. *MedRxiv*, 2020.
18. SIMONS, David, et al. The association of smoking status with SARS-CoV-2 infection, hospitalization and mortality from COVID-19: a living rapid evidence review with Bayesian meta-analyses (version 7). *Addiction*, 2021, 116.6: 1319-1368.
19. CARRAT, Fabrice, et al. Antibody status and cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection among adults in three regions of France following the first lockdown and associated risk factors: a multicohort study. *International journal of epidemiology*, 2021, 50.5: 1458-1472.
20. GRUNDY, Emily J., et al. Smoking, SARS-CoV-2 and COVID-19: A review of reviews considering implications for public health policy and practice. *Tobacco induced diseases*, 2020, 18.
21. MOSCOLA, Joseph, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in health care personnel in the New York City area. *Jama*, 2020, 324.9: 893-895.
22. YANG, Jing, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *International journal of infectious diseases*, 2020, 94: 91-95.
23. EMMI, Giacomo, et al. SARS-CoV-2 infection among patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, 2020,

Detekcia SARS-CoV-2 pomocou reverznej transkriptázovej PCR reakcie v Univerzitetnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach v roku 2023

Daniel Onufer ^a, Katarína Čurová ^b, Jozef Jurek ^a, Lenka Potočnáková ^a, Viktória Takáčová ^a

^a *Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice,*

^b *Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

Abstrakt

Reverzná transkriptázová polymerázová reťazová reakcia (RT-PCR) sa považuje za metódu zlatého štandardu na detekciu vírusov z klinických vzoriek pacientov. Cieľom tejto štúdie bolo štatisticky vyhodnotiť všetky vyšetrené vzorky na detekciu SARS-CoV-2 RNA, ktorý spôsobuje COVID-19 v laboratóriu Ústavu lekárskej a klinickej mikrobiológie Univerzitetnej nemocnice L. Pasteura Košice za kalendárny rok 2023 konvenčným testom RT-PCR (FTD™ SARS-CoV-2 Test). Do štúdie bolo zahrnutých 2 634 vzoriek nazofaryngeálnych výterov od pacientov, ktorí boli hospitalizovaní v Univerzitetnej nemocnici L. Pasteura Košice a od ambulantných pacientov vyšetrených v mobilnom odbernom mieste Univerzitetnej nemocnice L. Pasteura (Košice, Slovensko). Počet vzoriek s pozitívnym výsledkom bol 702 (26,66 %), s negatívnym výsledkom 1 932 (73,34 %). Výsledky poukazujú na význam testovania vírusu SARS-CoV-2, ktorý spočíva v tom, že prináša pacientom a klinickým lekárom cennú informáciu o priebehu ochorenia a umožňuje im adekvátne reagovať, aby nedochádzalo k ďalšiemu šíreniu vírusov na jednotlivých oddeleniach v rámci nemocnice.

Abstract

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is considered the gold standard method for the detection of viruses from clinical patient samples. The aim of this study was to statistically evaluate all examined samples for the detection of SARS-CoV-2 RNA, which causes Covid-19 in the laboratory of the Institute of Medical and Clinical Microbiology of the L. Pasteur University Hospital Košice for the calendar year 2023 by conventional RT-PCR test (FTDTM SARS-CoV -2 Test). A total of 2 634 samples of nasopharyngeal swabs were

collected from patients hospitalized at L. Pasteur University Hospital Košice and from outpatients examined at the mobile collection point of the L. Pasteur University Hospital (Košice, Slovakia) were included in this study. The number of samples with a positive result was 702 (26,66 %), with a negative result of 1 932 (73,34 %). The results point to the importance of testing for the SARS-CoV-2 virus, which consists in the fact that it provides patients and clinicians with valuable information about the course of the disease and allows them to respond adequately to prevent further spread of viruses in individual departments within the hospital.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2 vírus, reverzná transkriptázová PCR, COVID-19, testovanie

Úvod

V decembri 2019 boli v čínskom meste Wu-chan hlásené prvé prípady zoonózne pneumónie, pri ktorej bolo hospitalizovaných 41 pacientov. Ochorenie bolo spôsobené novým koronavírusom, ktorý patril do skupiny betakoronavírusov. Ochorenie dostalo pomenovanie nové koronavírusové ochorenie 2019. Počet prípadov sa rýchlo zvýšil a ochorenie bolo Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) 30. januára 2020 kategorizované ako epidémia medzinárodného záujmu. Vírus bol vo februári 2020 premenovaný na koronavírus ťažkého akútneho respiračného syndrómu 2 (SARS-CoV-2), pretože je geneticky príbuzný s koronavírusom zodpovedným za SARS v roku 2003. 11. marca 2020 bola vyhlásená globálna pandémie a choroba dostala názov COVID-19 (Martinez, 2020, World Health Organization, 2020).

V diagnostike COVID-19 zo vzoriek dýchacích ciest od infikovaných pacientov, zohráva významnú úlohu testovanie ribonukleových kyselín (RNA), najčastejšie reverznou transkriptázovou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR). Pandémia COVID-19 priniesla diagnostické výzvy pre klinické laboratóriá na celom svete, najmä z hľadiska schopnosti spoľahlivo poskytovať presné a rýchle výsledky testov. Detekcia RNA vírusu SARS-CoV-2 je nezastupiteľným diagnostickým nástrojom pre diagnostiku COVID-19 (Martinez, 2020).

Laboratórne testovanie vírusu SARS-CoV-2 je nevyhnutné pre správny klinický manažment a účinné kontrolné opatrenia na zníženie prenosu v komunite. K dispozícii je viacero diagnostických platforiem, pričom RT-PCR je prezentovaná ako metóda s vysokou

citlivosťou, špecifickosťou a krátkym časovým intervalom detekcie vírusu. Výtery z nosohltanu sa považujú za štandardný typ vzorky na diagnostické testovanie SARS-CoV-2 (World Health Organization, 2020, Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Na celom svete boli vyvinuté rôzne testy RT-PCR v reálnom čase s detekciou rôznych génov buď oblasti vírusového genómu alebo v oblasti otvorených čítacích rámcov vrátane ORF1a a ORF1b. Najčastejšie detekované gény v oblasti genómu sú gény kódujúce povrchový “spike“ glykoproteín (S), gény kódujúce obal vírusu (E), prípadne nukleokapsid (N) (Čurová et al., 2023).

Cieľom tejto štúdie bolo štatisticky vyhodnotiť výsledky konvenčného testu RT-PCR (FTD™ SARS-CoV-2 Test), ktorý bol použitý k detekcii SARS-CoV-2 RNA zo vzoriek nazofaryngeálnych výterov u pacientov s príznakmi COVID-19 v laboratóriu Ústavu lekárskej a klinickej mikrobiológie (ÚLaKM) Univerzitetnej nemocnice L. Pasteura (UNLP) Košice za kalendárny rok 2023.

Materiál a metódy

Klinické vzorky

Počas kalendárneho roka 2023 (január až december) bolo v laboratóriu ÚLaKM UNLP Košice vyšetrených celkovo 2 675 vzoriek nazofaryngeálnych výterov odobraných od pacientov s podozrením na ochorenie COVID-19. Do štúdie bolo zahrnutých 2 634 vzoriek. Z nich bolo 1 265 (48,03 %) mužov a 1 369 (51,97 %) žien. Vek pacientov bol v rozmedzí od 0 do 100 rokov. Vo vekovej skupine 0–15 rokov bolo 5 (0,18 %) pacientov, vo vekovej skupine 16–30 rokov 68 (2,54 %) pacientov, vo vekovej skupine 31–50 rokov 222 (8,35 %) pacientov, vo vekovej skupine 51–71 rokov 732 (27,36%) pacientov a vo vekovej skupine nad 71 rokov 1 607 (60,07%) pacientov.

Od každého pacienta sa pomocou Σ -Transwab® nazofaryngeálnych tampónov (Copan Diagnostics, Taliansko) odobrala vzorka nazofaryngeálneho výteru, ktorá bola následne vložená do 2 ml InActiv Blue Transport Medium. Vzorky boli odoberané na mobilnom odbernom mieste (MOM) UNLP Košice a na rôznych ambulanciách a klinikách v rámci UNLP Košice a testované v priebehu 48 h od vykonania výteru. Ak nebolo možné realizovať testy v ten istý deň, boli uchovávané pri teplote 4 °C.

Izolácia RNA

Na extrakciu RNA pomocou súpravy Versant SP 1.0 (Siemens Healthineers) v molekulárnom systéme Versant kPCR (Siemens Healthineers) bolo použitých 650 μL média InActive Blue. Celkový objem eluátu po izolácii bol 100 μL . Pre konvenčný RT-PCR test bolo použitých 10 μL eluátu.

Reverzná transkriptázová PCR

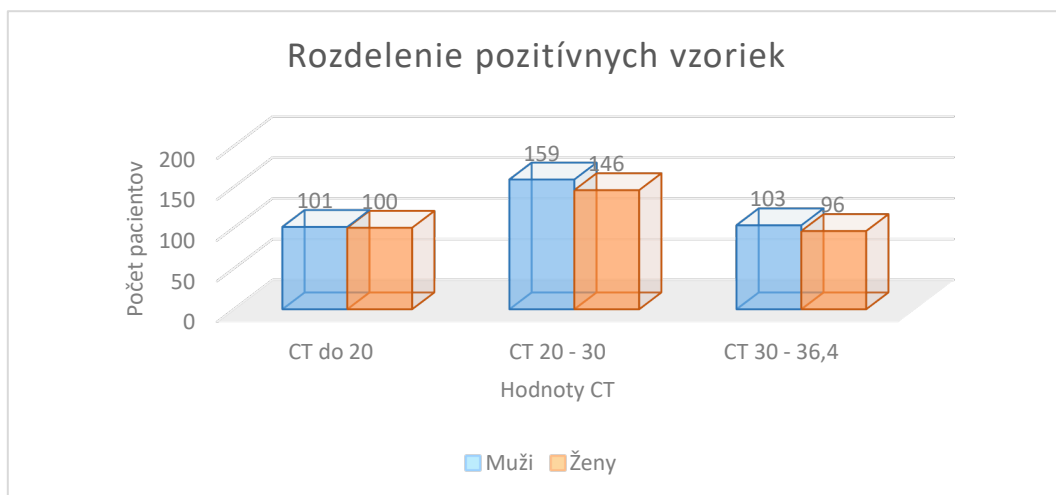
Pomocou testu FTDTM SARS-CoV-2 sú amplifikované konzervované sekvencie ORF1ab oblasti a N génu SARS-CoV-2 vírusu. Oligonukleotidové sondy značené pomocou fluorescenčnej farbičky FAM-89 sa v tomto teste používajú na detekciu génových sekvencií SARS-CoV-2 a oligonukleotidová sonda značená Cy5 na detekciu sekvencie v genóme vírusu konskej artritídy (EAV). EAV slúži v tomto teste ako interná kontrola (IC). IC sa extrahuje, spracováva a amplifikuje súčasne s každou vzorkou, aby sa monitoroval proces extrakcie a umožnila sa identifikácia inhibície PCR reakcie. Negatívna kontrola (H_2O bez nukleázy) sa spracováva ako vzorka (extrakcia a RT-PCR), aby bolo možné vylúčiť kontamináciu. Súprava FTDTM SARS-CoV-2 obsahuje pozitívnu kontrolu (dvojvláknová syntetická DNA), ktorá sa pridáva do každého testu na monitorovanie procesu RT-PCR a výkonnosť (správne fungovanie) primérov a sond. Analýza bola realizovaná podľa pokynov výrobcu. Reakčná zmes s celkovým objemom 25 μl pozostávala z 10 μl RNA a 15 μl RT PCR master mixu (12,5 μl 2x RT PCR Buffer, 1,5 μl zmesi primer/sonda a 1 μl 25x RT-PCR Enzým). RT-PCR prebiehala v termocykléri Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Program FTDTM SARS-CoV-2 RT-PCR testu je opísaný v tabuľke 1. Výsledky boli vyhodnotené a uvedené ako prahová hodnota cyklu (CT) podľa pokynov výrobcu (CT \leq 36,4 predstavovala pozitívny výsledok, CT $>$ 36,4 nejednoznačný výsledok).

Tab. 1 Program konvenčného testu RT-PCR (test FTDTM SARS-CoV-2).

Kroky RT-PCR	Počet cyklov	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas
Reverzná transkripcia	1	50	15 min
Pre-denaturácia		94	1 min
Denaturácia	40	94	8 s
Annealing, Elongácia		60	1 min

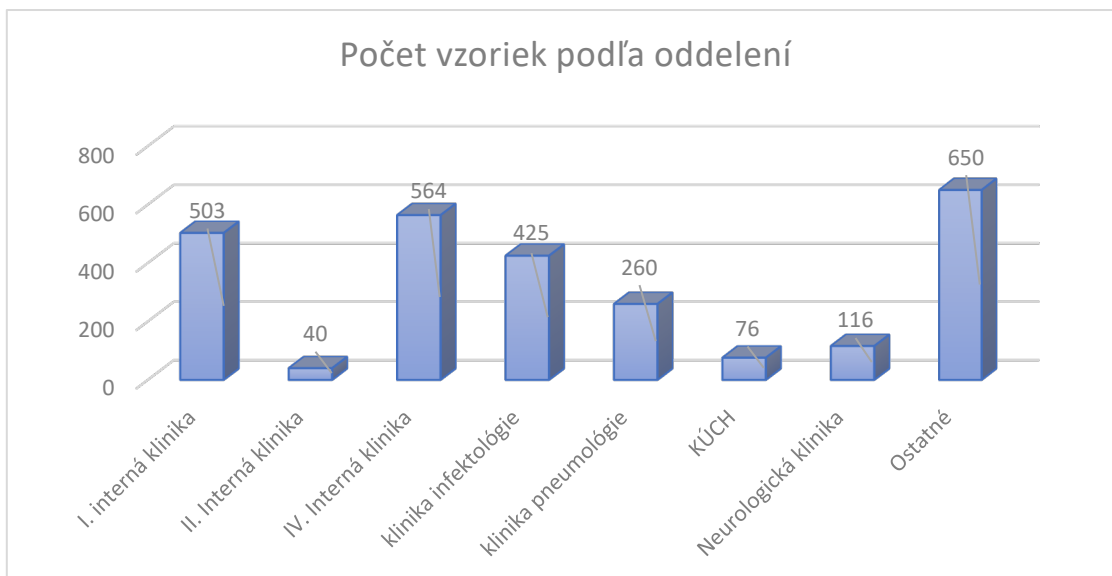
Výsledky

Z celkového počtu 2 675 vzoriek nazofaryngeálnych výterov bolo zo štúdie vyradených 41 (1,5%) vzoriek, pri ktorých bol výsledok vyhodnotený ako nejednoznačný, CT hodnota bola vyššia ako 36,4, pacientom bol odporučený opakovaný odber o 2 – 3 dni. Počet vzoriek s pozitívnym výsledkom bol 702 (26,66 %), s negatívnym výsledkom 1 932 (73,34 %). Priemerná hodnota CT bola 24,8 a vekový priemer pacientov predstavoval 70 rokov. Rozdelenie pozitívnych vzoriek na základe nameraných CT hodnôt je graficky zobrazené (graf 1) a poukazuje na najvyššie zastúpenie vzoriek s hodnotami CT v rozmedzí 20-30 (n=305).



Graf 1 Rozdelenie pozitívnych vzoriek na základe nameraných CT hodnôt

Rutinná laboratórna diagnostika detekcie RNA vírusu SARS-CoV-2 pomocou RT-PCR trvá niekoľko hodín. V prípade testu FTD™ SARS-CoV-2 použitého v našej štúdií sa celkový čas spracovania a vyšetrenia pohyboval v rozmedzí 3,5–6,7 h. O výsledkoch boli okamžite informovaní ošetrojúci lekári oddelenia UNLP Košice a tiež zamestnanci MOM. Najvyšší výskyt pozitívnych pacientov hospitalizovaných v UNLP Košice sme zaznamenali na IV. Internej klinike (n=564), I. Internej klinike (n=503), na Klinike infektológie a intenzívnej medicíny (n=425) a na Klinike pneumológie (n=260). Výskyt na týchto a ďalších klinikách a oddeleniach približuje graf 2.



Graf 2 Prehľad jednotlivých kliník a oddelení UNLP s najvyšším výskytom pozitívnych vzoriek počas roka 2023.

Diskusia

COVID-19 je podľa WHO ku dňu 4. 2. 2024 ochorenie, ktoré má na svedomí viac ako 7 028 881 úmrtí, čo predstavuje 5. miesto na zozname obetí globálnych pandémieí. Najlepší spôsob, ako zmierniť šírenie vírusu SARS-CoV-2, je rýchle, jednoduché a presné testovanie. Rýchla, spoľahlivá a presná detekcia vírusu SARS-CoV-2 hrá zásadnú úlohu pri správnom manažmente pacientov, pri prevencii šírenia, pochopení epidemiológie vírusu ale slúži aj na zlepšenie klinických výsledkov u infikovaných pacientov. Súčasná laboratórne testy sa primárne zameriavajú na amplifikáciu a detekciu niekoľkých špecifických sekvencií vírusového genómu vo vzorkách horných dýchacích ciest (Greyson, 2021).

Primery obsahujúce sekvencie N génu boli vybrané preto, že je životne dôležitý pre replikáciu vírusu a nie je pod selektívnym imunitným tlakom, čo napomáha zachovaniu jeho povahy. Testovanie použité v tejto práci nie je ovplyvnené nárastom nových variantov SARS-CoV-2, pretože mutácie vírusu SARS-CoV-2 sú lokalizované v oblasti kódujúcej povrchový “spike“ proteín v dôsledku imunitného selektívneho tlaku. Výhodou amplifikačnej metódy s použitím viacerých párov primerov a sond zameraných na génové sekvencie SARS-CoV-2 N a ORF1ab v jednej reakčnej zmesi je súčasná detekcia rôznych cieľov v jednej reakcii. V prítomnosti cieľovej sekvencie hybridizujú primery a sondy so špecifickou sekvenciou a

umožňujú amplifikáciu polymerázou. Oba amplikóny prispievajú k fluorescenčnému signálu generovanému vo vzorke a vedú k zvýšenej amplitúde signálu generovaného pre ciele N a ORF1ab (Greyson, 2021, Astuti & Ysrafil, 2020).

Mikrobiologické laboratóriá spoločnosti Medirex, a.s. vykonali od 19. marca 2020 do 28. septembra 2022 na Slovensku celkovo 1 420 572 RT-PCR testov zameraných na diagnostiku SARS-CoV-2. Z výsledkov vyplýva, že celková pozitivita analyzovaných testov bola 24,64 %, pričom miera pozitivity v okrese Košice-okolie bola až (45,16 %). (Janostiaková et al., 2023). Naše výsledky z laboratória ÚLaKM UNLP v Košiciach za rok 2023 poukazujú na mieru pozitivity v hodnote 26,66%, čo korešponduje s údajmi laboratórií Medirex. V tomto prípade je dôležité poznamenať, že v období realizácie našej štúdie (rok 2023) bola pandémia na ústupe, dochádzalo k uvoľneniu mnohých dovtedy platných karanténnych opatrení, k poklesu zaočkovanosti populácie a tiež k poklesu schopnosti zdravotného systému reagovať striktnými opatreniami na zvýšený výskyt ochorenia COVID-19.

Záver

Rýchla, spoľahlivá a presná detekcia vírusu SARS-CoV-2 je veľmi dôležitá nielen pri správnom manažmente pacientov, ale aj pri prevencii šírenia a pochopení epidemiológie vírusu. Miera pozitivity RT-PCR testov na úrovni 26,6 % v našej štúdii, realizovanej za rok 2023, poukazuje na význam testovania vírusu SARS-CoV-2, pretože prináša klinickým lekárom cenný výsledok o priebehu ochorenia a umožňuje im adekvátne reagovať, aby nedochádzalo k ďalšiemu šíreniu vírusov na jednotlivých oddeleniach v rámci nemocnice.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu „Návrh a implementácia pokročilých metód ventilačnej liečby a diagnostiky vírusových pneumónii vrátane Covid-19 s možnosťou ich rýchleho osvojenia“, ITMS2014+: 313011ASX1, v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Martinez RM. Clinical Samples for SARS-CoV-2 Detection: Review of the Early Literature. *Clin Microbiol Newsl.* 2020, 42(15):121-127.

2. World Health Organization: Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: Interim guidance, 19 march 2020. Geneva: World Health Organization, 2020. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501> (Accessed January 17, 2020).
3. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for collecting and handling of clinical specimens for COVID-19 testing. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (Accessed July 15, 2022).
4. Čurová K, Lovayová V, Nagyová M, Siegfried L, Donič V and de Vos G. Detection of SARS-CoV-2 using a laboratory-developed ultra-fast NextGenPCR test versus a conventional RT-PCR test. *Acta Virol.* 2023, 67:11588. doi: 10.3389/av.2023.11588
5. Grayson W. Pushing the limits: Increasing the speed and specificity of SARS-CoV-2 testing. *VCU Scholar Compass* 2021. Available at: <https://doi.org/10.25772/0GKV-ER90>.
6. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 Jul-Aug;14(4):407-412.
7. Janostiakova N, Gnip A, Kodada D, et al. SARS-CoV-2 testing in the Slovak Republic from March 2020 to September 2022 - summary of the pandemic trends. *Front Med (Lausanne)* 2023, 10:1225596.

Dlhodobé sledovanie hladín protilátok u pacientov po prekonaní ochorenia COVID-19

Veronika Bednárová ^a, Vladimíra Turčok Šimová ^a, Elena Hatalová ^a,
Ondrej Zahornacký ^b, Monika Halánová ^a

^a Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

^b Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika a
Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice

Abstrakt

Pandémia COVID-19 spôsobená vírusom SARS-CoV-2 je príkladom toho, ako sa nové ochorenie môže objaviť a rozšíriť do celého sveta len za pár mesiacov, pričom jej prudké šírenie okamžite podnietilo hľadanie diagnostických testov zameraných na potvrdenie, resp. vylúčenie diagnózy. Jednou z možností je sledovanie produkcie protilátok, výsledkom ktorej je stanovenie séroprevalencie ako nepriameho indikátora rozšírenia vírusu v populácii. V období od 4/2021 do 6/2022 sme sledovali hladiny protilátok triedy IgA, IgM a IgG proti antigénu RBD, proteínovej podjednotke Spike S1 u 205 pacientov, ktorí prekonali ochorenie COVID-19. Vzorky krvného séra boli pacientom odobraté v čase diagnostikovania ochorenia a po 3 mesiacoch od diagnostikovania ochorenia. Protilátky IgA, kľúčové pre slizničnú imunitu, sme potvrdili v čase diagnostikovania ochorenia u 74,6% (n=153) pacientov, v treťom mesiaci po prekonaní ochorenia sme protilátky detegovali u 60,4% (n=124) pacientov. Pokles hladín IgA protilátok sme celkovo zaznamenali až u 57,0% pacientov. IgM protilátky, spojené s včasnou imunitou, boli v čase diagnostikovania ochorenia prítomné u 42,9% (n=88) pacientov, v treťom mesiaci po prekonaní ochorenia boli prítomné IgM protilátky už len u 14,6% (n=30) pacientov. K poklesu hladín IgM protilátok došlo celkovo u 43,4% pacientov po prekonaní ochorenia. Protilátky triedy IgG, predstavujúce dlhodobé ochranné protilátky boli v čase diagnostikovania ochorenia detegované 74,1% (n=152) pacientov, po troch mesiacoch od prekonania ochorenia IgG protilátky v krvi vykazovalo 75,6% (n=155) pacientov. Pokles hladiny protilátok IgG sme celkovo zaznamenali 45,8% pacientov.

Abstract

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus is an example of how a new disease can appear and spread throughout the world in just a few months, while its rapid spread immediately prompted the search for diagnostic tests aimed at confirming or exclusion of the diagnosis. One possibility is monitoring the production of antibodies, the result of which is the determination of seroprevalence as an indirect indicator of the spread of the virus in the population. In the period from 4/2021 to 6/2022, we monitored the levels of IgA, IgM, and IgG antibodies against the RBD antigen, the Spike S1 protein subunit, in 205 patients who recovered from the COVID-19 disease. Blood serum samples were collected from the patients at the time of disease diagnosis and 3 months after the disease diagnosis. IgA antibodies, which are crucial for mucosal immunity, were detected at the time of diagnosis of the disease in 74,6% of patients, in the third month after overcoming the disease antibodies were detected 60,4% patients. In total, we recorded a decrease in the levels of IgA antibodies in 57.0% of patients. IgM antibodies, associated with early immunity, were present in 42,9% of patients at the time of disease diagnosis, in the third month after overcoming the disease they were present in only 14,6% of patients. A decrease in the levels of IgM antibodies occurred in a total of 43.4% of patients after overcoming the disease. Antibodies of the IgG class, representing long-term protective antibodies, were detected in 74.1% of patients at the time of disease diagnosis. Three months after overcoming the disease, we recorded a decrease in the IgG level in a total of 45,8% of patients. Antibodies of the IgG class were detected at the time of disease in 74,1% of patients. Three months after overcoming the disease, IgG antibodies were detected in 75,6% patients. The decrease in the IgG level was detected in 45.8% of patients.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, dynamika protilátok, imunitná odpoveď

Úvod

Vírus SARS-CoV-2 bol po prvýkrát izolovaný zo vzoriek pacientov s pneumóniou vo Wuhane v Číne v roku 2019 a bol identifikovaný ako príčinný patogén ochorenia COVID-19 spôsobujúceho závažný akútny respiračný syndróm (Zhu a kol., 2020). Od prepuknutia ochorenia v Číne v decembri 2019 sa toto ochorenie rozšírilo prenosom z človeka na človeka do viac ako 200 krajín a teritórií na celom svete (WHO, 2020). Podľa WHO k 4. februáru 2024 bolo na celom svete hlásených viac ako 774 miliónov potvrdených prípadov a viac ako sedem

miliónov úmrtí (WHO, 2024). Väčšina pacientov s COVID-19 má mierny priebeh ochorenia a po primeranom terapeutickom zásahu sa rýchlo zotavia. U niektorých pacientov s COVID-19 sa v krátkom čase rozvinie ťažký akútny respiračný syndróm, zlyhanie viacerých orgánov a dokonca smrť (Wang a kol., 2020).

Inkubačná doba ochorenia COVID-19 sa pohybuje od 1 do 14 dní (Elias a kol., 2021). Vírus je detegovaný najmä v sekrétoch dýchacích ciest a za všeobecný spôsob prenosu infekcie sa považuje vzduch. Predpokladá sa, že imunitná odpoveď vzniká od jedného týždňa po infekcii. Ukázalo sa, že hladiny IgG protilátok sa objavujú už týždeň po nástupe ochorenia a vo väčšine vzoriek sú detekovateľné po 20–22 dňoch. U hospitalizovaných pacientov s COVID-19 sa sérokonverzia na IgG zvyčajne deteguje 5 až 14 dní po nástupe symptómov (Li a kol., 2020).

Je známe, že ľudské telo produkuje protilátky rozpoznávajúce viaceré epitopy na rôznych proteínoch ako odpoveď na jedinú infekciu. V prípade SARS-CoV-2 väčšina v súčasnosti dostupných testov deteguje protilátky proti vírusovému nukleokapsidovému proteínu (N), spike proteínu (S), alebo špecificky na jeho receptor viažúcu doménu (RBD). Proteín S sa podieľa vo svojej trimérnej forme na počiatocnej interakcii s receptormi hostiteľskej bunky. Tento glykoproteín pozostáva z dvoch podjednotiek - S1 a S2, ktoré sú oddelené štiepnym miestom furínovej proteázy. Štiepenie na tomto mieste pred vstupom do bunky sa vyskytuje iba pri SARS-CoV-2, nie pri SARS alebo MERS. Predpokladá sa, že je jedným z dôvodov jeho vyššej infekčnosti (Rabaan a kol., 2020). RBD sa viaže na receptor angiotenzín konvertujúceho enzýmu 2 (ACE2) na povrchu ľudskej hostiteľskej bunky. Ukázalo sa, že RBD môže stimulovať produkciu protilátok, ktoré sa viažu na vírus a zabraňujú mu naviazať sa na ľudské ACE2 receptory (Wan a kol., 2020). Sérologické testy zvyčajne detegujú protilátky proti spike proteínu (S) a/alebo nukleoproteínu (N), keďže ide o najviac imunogénne proteíny SARS-CoV-2 (Zhang a kol., 2020).

Materiál a metodika

Do štúdie bolo zaradených 205 pacientov z Kliniky infektológie a cestovnej medicíny Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach, ktorí boli pozitívne testovaní na infekciu SARS-CoV-2 pomocou realtime PCR (RT-qPCR). Od každého z týchto pacientov sme odobrali 2 vzorky séra. Prvá vzorka bola odobratá po prekonaní infekcie a druhá vzorka bola odobratá 3 mesiace po prekonaní ochorenia.

Vzorky sér boli vyšetrené na prítomnosť IgG, IgA a IgM protilátok proti rekombinantnému antigénu RBD, podjednotke proteínu Spike S1 pomocou kvantitatívnej sendvičovej ELISA metódy za použitia komerčných kitov EIA COVID-19 RBD IgG, IgA a IgM (TestLine Clinical Diagnostics, Czech Republic). Vzorky boli analyzované pomocou prístroja DYNEX DSX systém. Pre nastavenie kalibračnej krivky súpravy boli použité štandardy: WHO International Standard for anti SARS-CoV-2 20/136 a Working Standard 20/160, v ktorých je hladina protilátok vyjadrená v jednotkách U/ml. Vzorky sér boli hodnotené ako pozitívne, ak hladina protilátok bola vyššia ako 22 U/ml. Séra s hladinou protilátok v rozpätí 18-21,9 U/ml boli hodnotené ako hraničné vzorky. Séra s hladinou protilátok nižšou ako 18 U/ml, boli hodnotené ako negatívne s nepostačujúcou hladinou protilátok.

Výsledky

Pri prvom odbere v čase diagnostikovania ochorenia malo IgG protilátky 152 (74,1%) pacientov, 8 (3,9%) malo hraničné hodnoty a 45 (21,9%) pacientov nemalo vytvorené postačujúce množstvá IgG protilátok proti ochoreniu. IgA protilátky boli detegované u 153 (74,6%) pacientov, 10 (4,8%) malo hraničné hodnoty protilátok a 42 (20,4 %) pacientov nemalo vytvorených dostatok IgA protilátok proti ochoreniu. IgM protilátky malo 88 (42,9%) pacientov, 10 (4,8%) malo hraničné hodnoty a 107 (52,2%) pacientov bolo negatívnych na prítomnosť IgM protilátok proti ochoreniu.

Pri druhom odbere v 3. mesiaci po prekonaní ochorenia malo IgG protilátky 155 (75,6%) pacientov, 8 (3,9%) malo hraničné hodnoty a 42 (20,4%) pacientov nemalo vytvorené postačujúce množstvá IgG protilátok proti ochoreniu. IgA protilátky boli detegované u 124 (60,4%) pacientov, 12 (5,8%) malo hraničné hodnoty protilátok a 69 (33,06%) pacientov nemalo vytvorený dostatok IgA protilátok proti ochoreniu. IgM protilátky malo 30 (14,6%) pacientov, 6 (2,9%) malo hraničné hodnoty a 169 (82,4%) pacientov bolo negatívnych na prítomnosť IgM protilátok proti ochoreniu.

Po troch mesiacoch od prekonania ochorenia COVID-19 došlo k elevácii IgG protilátok u 88 (42,9%) pacientov, v skupine pacientov s protilátkami nad hranicou 22 U/ml pri prvom odbere to bolo 59 (67,0%) pacientov, u 28 (31,8%) pacientov došlo k vzostupu protilátok IgG z negatívnych alebo hraničných hodnôt nad 22 U/ml, u 1 (1,1%) pacienta došlo k elevácii protilátok z negatívnej hodnoty na hraničnú hodnotu do 21,9 U/ml. Pokles IgG protilátok sme zaznamenali u 94 (45,8%) pacientov oproti prvému odberu, z toho u 68 (72,3%) pacientov došlo

k poklesu protilátok, ktoré sa však udržali nad hranicou 22 U/ml, u 7 (7,4%) pacientov došlo k poklesu na hraničné hodnoty protilátok a u 19 (20,2%) pacientov došlo k poklesu protilátok proti ochoreniu pod hodnotu 18U/ml a boli hodnotené ako negatívne.

Zaznamenali sme 23 (11,2%) pacientov z celkového počtu nami sledovaných pacientov, u ktorých nedošlo po troch mesiacoch od infekcie k vytvoreniu viac ako 18U/ml IgG protilátok proti podjednotke proteínu Spike S1.

Eleváciu IgA protilátok sme zaznamenali po troch mesiacoch u 64 (31,2%) pacientov, k zvýšeniu hodnôt protilátok došlo u 38 pacientov, ktorí už pri prvom odbere mali hodnoty protilátok nad 22 U/ml. U 3 (4,6%) pacientov s hraničnými protilátkami po prekonaní ochorenia došlo po troch mesiacoch k vzostupu hladiny protilátok nad 22 U/ml. Podobný vzostup protilátok sme zaznamenali aj u 19 (29,6 %) pacientov, ktorí pri prvom odbere séra nemali dostatočnú hladinu IgA protilátok. U 2 (3,1%) pacientov, ktorí boli po prvom odbere séra negatívni na prítomnosť IgA protilátok, sme zaznamenali vzostup protilátok na hraničné hodnoty v rozmedzí 18 až 22 U/ml.

Bez zmeny hladín IgA protilátok v sére bolo 26 (12,6%) pacientov, z toho 2 (7,6%) pacienti mali pretrvávajúce hraničné hodnoty protilátok a u 24 (93,4%) pacientov nedošlo k vytvoreniu dostatočného množstva IgA protilátok v krvi. Vzorky boli hodnotené ako negatívne.

Pokles protilátok IgA proti SARS-CoV-2 sme po troch mesiacoch detegovali u 117 (57%) pacientov, z toho u 60 (51,7%) pacientov došlo k poklesu protilátok, ktoré boli stále hodnotené ako pozitívne, u 8 pacientov hodnota IgA protilátok klesla k hraničnej hodnote protilátok pod 22 U/ml a u 49 (41,8%) pacientov došlo k vymiznutiu IgA protilátok zo séra.

Vzostup IgM v sére pacientov sme zaznamenali iba u 15 (7,3%) pacientov, z toho 9 (60,0%) pacientov malo zvýšené hladiny IgM už pri prvom odbere krvi a u 6 (40%) pacientov došlo k elevácii protilátok z nízkych a hraničných hodnôt nad 22 U/ml.

Pokles IgM protilátok sme zaznamenali u 89 (43,4%) pacientov. Z toho 68 (76,4%) pacientov malo v treťom mesiaci po prekonaní ochorenia hodnoty protilátok pod 18 U/ml. Hodnoty IgM protilátok nad 22 U/ml s klesajúcim trendom oproti prvému odberu malo 21 (23,6%) pacientov.

Pretrvávajúce hraničné hladiny protilátok IgM sme zaznamenali len u jedného pacienta a pretrvávajúce nízke hladiny protilátok pod 18 U/ml sme detegovali u 100 (48,7%) pacientov pri prvom aj druhom odbere séra a boli hodnotené ako negatívne.

Diskusia

SARS-CoV-2 zdieľa niektoré podobnosti s koronavírusmi SARS a MERS. Z dôvodu týchto podobností môžu poznatky získané zo štúdií o týchto patogénnych druhoch poskytnúť pohľad na protilátkové reakcie, ktoré sa vyskytujú počas infekcie SARS-CoV-2. Podobné sérologické reakcie boli pozorované u pacientov s COVID-19 a vzorec týchto reakcií je v súlade s akútnou vírusovou infekciou. Podľa Houa a kolektívu (2020) IgM protilátky poskytujú prvú líniu obranyschopnosti humorálnej imunity a ich tvorba pacientov s ochorením COVID-19 začína približne týždeň po objavení sa symptómov, pričom približne po 3 týždňoch dochádza k ich poklesu. Postupne dochádza tiež ku tvorbe IgG protilátok, ktoré zohrávajú úlohu v dlhodobej imunitnej pamäti.

V našej štúdií sme po prekonaní ochorenia COVID-19 detegovali IgM protilátky u 42,9% pacientov. V porovnaní s dvoma čínskymi štúdiami, kde detegovali IgM protilátky u 81,3% a 65,1% pacientov, je perzistencia IgM protilátok po prekonaní ochorenia u našich pacientov nižšia (Hou a kol., 2020; Bao a kol., 2021). Druhý odber séra sme uskutočnili v treťom mesiaci po prekonaní ochorenia, pričom sme zaznamenali pokles IgM protilátok u 89 (43,4%) pacientov, z toho 68 (76,4%) pacientov malo hodnoty protilátok pod 18 U/ml a boli hodnotené ako negatívne.

Hladiny IgG protilátok sa objavujú už týždeň po nástupe ochorenia, pričom vo väčšine vzoriek sú detekovateľné po 20–22 dňoch (Li a kol., 2020). Po prekonaní ochorenia sme detegovali IgG protilátky u 74,1% pacientov, podobné výsledky zistili aj v čínskej štúdií, kde po prekonaní ochorenia malo vytvorené IgG protilátky 74,4% pacientov (Bao a kol., 2021). Pokles IgG protilátok po troch mesiacoch po prekonaní ochorenia sme zaznamenali u 45,8% pacientov oproti prvému odberu, z toho u 20,2% pacientov hladiny IgG protilátok klesli pod detekovateľnú hranicu a zároveň sme zaznamenali 23 (11,2%) pacientov z celkového počtu nami sledovaných pacientov, u ktorých nedošlo po troch mesiacoch od infekcie k vytvoreniu viac ako 18 U/ml IgG protilátok proti RBD podjednotke. Podobne aj Long a kol., (2020) zaznamenali pokles IgG protilátok po 8 týždňoch od prekonania ochorenia u 71,1% asymptomatických pacientov a u 76,2% symptomatických pacientov. Ibarrondo a kol. (2020) predpokladajú, že skorý rozpad protilátok po akútnej vírusovej antigénnej expozícii je takmer exponenciálny. Niekoľko štúdií zaznamenalo pretrvávanie protilátok proti SARS-CoV-2 u pacientov po dobu viac ako 90 dní po prekonaní ochorenia oproti naším zisteniam (Gudbjartsson a kol., 2020; Wajnberg at al., 2020).

Slizničná imunita a IgA protilátky hrajú dôležitú úlohu pri obrane voči respiračným patogénom. Protilátky triedy IgA chránia pred vírusmi blokovaním ich väzby na slizničnú membránu. Renegar a kol. (2004) predpokladajú, že IgA protilátky poskytujú lepšiu ochranu neutralizáciou vírusov v mieste infekcie ako ostatné triedy protilátok. IgA protilátky sme detegovali u 153 (77,6%) pacientov, 10 (4,8%) malo hraničné hodnoty protilátok. Pokles protilátok IgA proti SARS-CoV-2 sme po troch mesiacoch detegovali u 117 (57 %) pacientov, z toho u 49 (41,8 %) pacientov došlo k poklesu pod detekovateľnú hranicu 18 U/ml. Podobne aj Iyer a kol. (2020) odhadujú, že medián séroreverzie pre IgA protilátky proti SARS-CoV-2 je 70,5 dňa, pričom k séroreverzii prvých 5 % dochádza už v období 27,7 dňa.

Záver

V štúdiu sme sledovali protilátkové odpovede u pacientov, ktorí prekonal COVID-19, so zameraním na protilátky IgG, IgA a IgM proti rekombinantnému antigénu RBD a proteínovej podjednotke Spike S1. Zistenia odhaľujú rôzne vzorce dynamiky protilátok po infekcii. Protilátky IgG boli prítomné u väčšiny pacientov po prekonaní ochorenia, ale významné percento zaznamenalo pokles hladín IgG po troch mesiacoch. Je pozoruhodné, že u časti pacientov nedošlo k vytvoreniu merateľnej hladiny IgG protilátok proti podjednotke RBD, čo poukazuje na variabilitu imunitnej odpovede. Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami naznačujúcimi pokles protilátok IgG v priebehu času, čo naznačuje zložitosť dlhodobej imunity voči SARS-CoV-2. Prítomnosť IgA protilátok, kľúčových pre slizničnú imunitu, bola spočiatku vysoká, ale značný počet pacientov vykazoval po troch mesiacoch pokles hladín IgA. Protilátky IgM, typicky spojené s včasnou imunitnou odpoveďou, boli spočiatku detegované u značnej časti pacientov s následným poklesom hladín protilátok po troch mesiacoch po prekonaní ochorenia. Naše zistenia podčiarkujú zložitosť a variabilitu v protilátkových odpovediach na SARS-CoV-2 s dôsledkami pre pochopenie dlhodobej imunity a potenciálnych očkovacích stratégií.

Pod'akovanie

Práca riešená v rámci projektu APVV PP-COVID-20-0064 a projektu operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja „AKARDIO COVID-19“, ITMS2014+:313011AUB1.

Literatúra

1. Elias C, Sekri A, Leblanc P, et al. The incubation period of COVID-19: A meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 104, 708–710
2. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *New England Journal of Medicine* 2020; 383(18), 1724-1734.
3. Hou H, Wang T, Zhang B, et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunol* 2020; 9: e1136.
4. Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *New England Journal of Medicine* 2020; 383(11), 1085-1087.
5. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly, a kol. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Science immunology* 2020; 5(52), eabe0367.
6. Li K, Huang B, Wu M, at al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11, 6044.
7. Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature medicine* 2020; 26.8: 1200-1204.
8. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020; 28(2):174-184. PMID: 32275259.
9. Renegar KB, Small PA, Boykins LG and Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *The Journal of Immunology* 2004; 173(3), 1978-1986.
10. WHO, Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report– 77 2020, dostupné online:https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200406-sitrep-77-covid-19.pdf?sfvrsn=21d1e632_2.
11. WHO, COVID-19 Epidemiological Update, 2024 dostupné online: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-16february-2024>.
12. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, et al. SARS-CoV-2 infection induces robust, neutralizing antibody responses that are stable for at least three months. *MedRxiv* 2020; 2020-07.

13. Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol.* 2020; 94:e00127-20.
14. Wu Z, and McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama* 2020; 323(13), pp.1239-1242.
15. Yujie B, Yun L, Ying-ying Ch, et al. Dynamic anti-spike protein antibody profiles in COVID-19 patients, *International Journal of Infectious Diseases* 2021; 103, 540-548.
16. Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1):386-389.
17. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine* 2020; 382(8), pp.727-733.

Vybrané skupiny črevných parazitóz a ich molekulová diagnostika Nested PCR metódou

Vladimíra Turčok Šimová ^a, Elena Hatalová ^a, Zuzana Baranová ^b, Vladimíra Nagyová ^b,
Janette Baloghová ^b

^a Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

^b Klinika dermatovenerológie UPJŠ LF a UNLP, Lekárska fakulta, Univerzita P. J.
Šafárika, Košice

Abstrakt

Parazitárne protozoárne infekcie *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis sp.*, *Entamoeba spp.*, *Dientamoeba spp.* a infekcie hubami *Microsporidia spp.* predstavujú významné zdravotné hrozby, najmä pre deti, pacientov s oslabenou imunitou a imunodeficientných pacientov. Tieto infekcie často zostávajú asymptomatické alebo sa prejavujú nešpecifickými príznakmi, čo komplikuje ich diagnostiku pomocou konvenčných metód, najmä ak sa súčasne vyskytujú infekcie s inými patogénmi. Nested PCR ponúka zvýšenú citlivosť a špecifickosť v porovnaní s konvenčnými metódami, umožňuje detekciu malého množstva parazitov a rozlíšenie medzi druhmi alebo genotypmi. Špecifické primery používané v nested PCR sa zameriavajú na polymorfné oblasti genómov parazitov, ako sú gény SSU rRNA, GP60 a TPI, čím zabezpečujú druhovo alebo genotypovo špecifickú amplifikáciu. Táto špecifickosť zabezpečuje presnú identifikáciu pôvodcov, čím sa prekonávajú problémy spojené s podobnou morfológiou patogénov pri koinfekciách. Po nested PCR sa používa gélová elektroforéza na vizualizáciu amplifikovaného fragmentu. Pozitívne vzorky sa potom môžu podrobiť sekvenovaniu, s cieľom ďalej charakterizovať genetickú diverzitu a identifikovať špecifické druhy a subtypy. Sekvenovanie uľahčuje epidemiologické štúdie, genetické profilovanie a monitorovanie rezistencie na lieky, čo prispieva k lepšiemu pochopeniu a kontrole týchto infekcií.

Abstract

Parasitic protozoan infections caused by *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis sp.*, *Entamoeba spp.*, *Dientamoeba spp.* and fungal infections caused by *Microsporidia spp.* pose significant health threats, especially to children, immunocompromised and immunodeficient patients. These infections often remain asymptomatic or are presented by non-specific symptoms, which complicates their diagnosis by conventional methods, especially in cases of co-infections with other pathogens occur. Nested PCR offers increased sensitivity and specificity compared with conventional methods, allowing detection of small numbers of parasites and discrimination between species or genotypes. The specific primers used in nested PCR target polymorphic regions of the parasite genome, such as the SSU rRNA, GP60 and TPI genes, and allow species- or genotype-specific amplification. This specificity ensures accurate identification of the causative agents, overcoming the problems associated with similar morphology of pathogens in the case of co-infections. After nested PCR, gel electrophoresis is used to visualize the amplified fragment. Positive samples can then be subjected to sequencing to further characterise genetic diversity and identify specific species and subtypes. Sequencing facilitates epidemiological studies, genetic profiling, and drug resistance monitoring, contributing to a better understanding and control of these infections.

Kľúčové slová: črevné parazity, protozoa, huby, diagnostické metódy, Nested PCR, primery

Úvod

Črevné protozoárne parazity sú najčastejšie sa vyskytujúce parazitárne ochorenia a spôsobujú významnú chorobnosť a úmrtnosť hlavne v skupine imunokompromitovaných a imunosupresívnych pacientov (Stark a kol., 2009). Medzi najzávažnejšie protozoárne parazity, ktoré sú predmetom aj našej štúdie patria *Cryptosporidium spp.*, *Blastocystis sp.*, *Entamoeba komplex*, *Dientamoeba fragilis* a *Giardia duodenalis*.

Skúmame aj kmeň *Microsporidia* (ríša Fungi), ktorý hyperdiverzným kmeňom spóru-tvoriacich jednobunkových eukaryotických parazitov, ktoré sú schopné infikovať hostiteľov od protozoí až po stavovce, vrátane ľudí, vo všetkých biómoch sveta (Vávra, Lukeš, 2013).

Orofekálna cesta je hlavným mechanizmom prenosu protozoárnych a fungálnych patogénov. Medzi najvýznamnejšie cesty prenosu v životnom prostredí patrí nepochybne

prenos kontaminovanou vodou, potravou a pôdou. Okrem toho sa nachádzajú aj v odpadových vodách. Výskyt a lokalizácia týchto patogénov v životnom prostredí je primárne spôsobená vylučovaním propagačných štádií z infikovaných jedincov. Schopnosť týchto parazitov produkovať veľké množstvo infekčných štádií spôsobuje ohrozenie zdravia zvierat a ľudí. Tieto infekčné štádia odolávajú a prežívajú v prostredí dlhú dobu (Fayer, Xiao 2004; Smith a kol., 2006).

Potravinami a vodou prenosné ochorenia spôsobujúce hnačku majú celosvetovo vážne zdravotné a ekonomické následky, pričom výrazný dopad majú predovšetkým na zdravie detí (Havelaar a kol., 2015; WHO, 2015; Sekse a kol., 2017, Pires a kol., 2015). Na globálnej úrovni, vystavenie patogénom prenášaných vodou a potravinami výrazne koreluje s nízkym sociálno-ekonomickým statusom (WHO, Fabricio, 2017).

Blastocystis sp.

Protozoárne parazity z rodu *Blastocystis* infikujú obrovské množstvo stavovcov aj bezstavovcov vo vyspelých aj v rozvojových krajinách (Clark a kol., 2013, Bart a kol., 2013). Kolonizujú viaceré časti tráviaceho systému hostiteľa. Ich prenos je fekálno-orálnou cestou, prostredníctvom kontaminovanej vody a potravy (Bart a kol., 2013, Lee a kol., 2012). Hypotéza zoonotického prenosu *Blastocystis sp.* bola nedávno rozpoznaná pre ich vysokú frekvenciu výskytu u rôznych druhov zvierat (Hublin a kol., 2020, Lee a kol., 2012). Infekcia *Blastocystis sp.* je spojená s gastrointestinálnymi ochoreniami, urtikáriou a inými extraintestinálnymi príznakmi zápalovej odpovede (Ramírez a kol., 2017). V súčasnosti je známych 28 subtypov *Blastocystis sp.* (ST), ktorých priradenie je založené na sekvenčnej analýze génu SSU rRNA (malej podjednotky) (Maloney a kol., 2020).

Giardia duodenalis

Jednobunkový bilaterálne symetrický parazit *Giardia duodenalis* je zodpovedný za približne 280 miliónov ľudských prípadov hnačky každý rok (celková giardióza získaná všetkými prenosovými cestami) a infikuje vyše 40 živočíšnych druhov (Horlock-Roberts a kol., 2017, Einarsson a kol., 2016). Génová skupina druhu *Giardia duodenalis* pozostáva z ôsmich asambláží A-H (Ryan, Cacciò, 2013). Asambláže A a B sú hostiteľsky nešpecifické a vyskytujú sa u ľudí aj zvierat. Asambláže C, D, E a F sú enzootické a pre ľudí sú neinfekčné (Cacciò a kol., 2017, Gomez-Puerta a kol., 2014)

Klinický prejav infekcií *G. duodenalis* je vysoko variabilný. Zatiaľ čo mnohí infikovaní ľudia zostávajú asymptomatickí, iní vykazujú klinické príznaky, ktoré sú skôr nešpecifické a zahŕňajú závažnú hnačku, bolesť brucha a kŕče, nadúvanie, nevoľnosť, poruchu príjmu a vstrebávania živín, chudnutie a vracanie. U chronicky infikovaných pacientov symptomatický priebeh koreluje so zmeneným črevným transportom a bariérovou dysfunkciou (Feng, Xiao, 2011, Troeger a kol., 2007). Chronické infekcie sú rovnako spojené s potravinovými alergiami, syndrómom dráždivého čreva (IBS), chronickým únavovým syndrómom a artritídou a v pediatrickej populácii je giardióza spojená s rastovými deficitmi (Bartelt, Platts-Mills, 2015, Bartelt, Sartor, 2015).

Entamoeba komplex

Druhy prvokov *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii* a *Entamoeba bangladeshi* sa súhrnne označujú ako komplex *Entamoeba*, pretože sú morfológicky totožné (Bahrami a kol., 2019). Spomedzi týchto druhov je *E. histolytica* pôvodcom amébiózy u ľudí, ktorá je spojená s črevnými a/alebo mimočrevnými prejavmi. Prenos ochorenia začína požitím zreých cýst nachádzajúcich sa v kontaminovanej potrave, vode alebo požitím cýst nachádzajúcich sa na rukách kontaminovaných stolicou (CDC, 2019, Kantor a kol., 2018). Keďže tento prvok sa primárne prenáša fekálno-orálnou cestou, prevalencia infekcie môže skôr súvisieť so socioekonomickými faktormi a individuálnymi hygienickými návykmi (Candela a kol., 2021, Pham Duc, 2011, Kantor a kol., 2018).

Diferenciálna diagnostika patogénneho druhu *E. histolytica* a nepatogénnych druhov *Entamoeba* je kľúčová pri rozhodnutí o nasadení liečby (Gonin, Trudel, 2003). Okrem toho presná diagnóza nepatogénnych améb je nesmierne dôležitá, pretože prítomnosť týchto nepatogénnych druhov naznačuje fekálnu kontamináciu potravy a vody a môže naznačovať možnú expozíciu aj patogénnym organizmom (El-Nadi a kol., 2017). *E. dispar* a *E. moshkovskii* boli identifikované ako nepatogénne améby (Nadia a kol., 2022).

Cryptosporidium spp.

Kryptosporídie patria k jedným z najčastejších enterických prvokov stavovcov, ktoré majú široký hostiteľský rozsah, zahŕňajúc ľudí, domáce a divožijúce zvieratá (Perec-Matysiak a kol., 2023). Tieto mikroorganizmy spôsobujú významné ochorenia tráviaceho traktu a sú bežne

prítomné v kontaminovanej vode, ktorá je vynikajúcim prostriedkom pre ich šírenie (Thompson a kol., 2005).

Zo 44 uznaných druhov *Cryptosporidium* a viac ako 120 genotypov bolo u ľudí hlásených 19 druhov a 4 genotypy, pričom najrozšírenejšie sú *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* a *C. felis* (Ryan a kol., 2021).

Primárnym spôsobom infekcie je oro-fekálna cesta, najmä prostredníctvom kontaminovaných potravín alebo vody. Prenos môže byť aj priamy, pričom pri niektorých druhoch parazita je možný aj zoonotický prenos (Fayer, Xiao, 2008).

Cryptosporidium parvum a *C. hominis* sú patogénne druhy, ktoré sú zodpovedné za viac ako 90% infekcií ľudskej kryptosporidiózy. *C. hominis* infikuje prevažne ľudí a je všeobecne považovaný za antroponotický druh, hoci existujú sporadické správy o zvieracích hostiteľoch. Zoonotické subtypové rodiny *C. parvum*, ktoré sa podieľajú na ľudských infekciách, infikujú aj hovädzí dobytok, najmä teľatá (CDC, 2019). U ľudí sa vyskytujú infekcie hlavne v rozvojových krajinách. Citlivé sú predovšetkým deti mladšie ako 5 rokov, s vrcholným výskytom infekcií a hnačiek u detí mladších ako 2 roky (Bern a kol. 2000, Bhattacharva a kol. 1997, Newman a kol. 1999). U detí môže byť prítomných viacero epizód kryptosporidiózy, čo naznačuje, že získaná imunita voči infekcii *Cryptosporidium* nie je trvalá (Newman a kol. 1999, Xiao a kol. 2001).

Kryptosporídie infikujú bunky epitelu mikrokľkov čreva v gastrointestinálnom trakte (CDC, 2019). Ochorenie je sprevádzané samolimitujúcou hnačkou zvierat a ľudí, až po vážne život ohrozujúce hnačky s dlhotrvajúcim priebehom u imunokompromitovaných jedincov, predovšetkým HIV/AIDS pozitívnych, pacientov s imunosupresívnou kortikosteroidovou liečbou (Cho a kol., 2013, CDC, 2021)

Microsporidia spp.

Mikrosporídie sú spórotvorné striktne intracelulárne parazity. V prostredí môžu pretrvávať vďaka vytváraniu rezistentných spór (Mahmud a kol., 2017). Infikovať môžu článkonožce, rôzne druhy stavovcov a cicavcov, vrátane človeka (Didier, Weiss, 2006). Možným zdrojom nákazy sú infikované jedince, prostredníctvom ktorých sa mikrosporídie vylučujú do prostredia v truse, moči a v sekrétoch z dýchacieho aparátu. Nákaza sa prenáša kontaminovanou vodou a potravou (Anae, Attouchi, 2010).

Existuje zhruba 1400 druhov pod takmer 200 rodmi mikrosporídií (Vávra a Lukeš, 2013). *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon cuniculi* patria medzi najdôležitejšie druhy mikrosporídií. Medzi častých pôvodcov infekcií patrí aj *Encephalitozoon hellem* (Valenčáková, Halánová, 2012). U ľudí sú najviac postihnutou populáciou osoby s oslabenou imunitou (Han, Weiss, 2017). Najmä u jedincov s HIV/AIDS a u pacientov s transplantáciou orgánov sa môžu vyskytnúť oportúnne infekcie spojené s pretrvávajúcou hnačkou a úbytkom hmotnosti a systémové infekcie, nefritídy, keratokonjunktivitídy, hepatitídy, encefalitídy a pneumónie (Didier, Weiss, 2011, Galván a kol., 2011, Han a kol., 2021).

Dientamoeba fragilis

Dientamoeba fragilis je nebičíkovitý trichomonádový parazit, ktorý sa vyskytuje v ľudskom hrubom čreve. Na rozdiel od väčšiny ostatných črevných prvokov nemá jeho životný cyklus štádium cysty; teda k infekcii medzi ľuďmi dochádza počas štádia trofozoitu. Po vylúčení z organizmu stolicou ostávajú trofozoity krátkodobo aktívne, ale vplyvom aeróbného prostredia disociujú (Tolba a kol., 2022). *D. fragilis* bol zistený v neupravených odpadových vodách. (Stark a kol., 2012). Prirodzenými hosťiteľmi sú cicavce a vtáky (Cacció a kol., 2012, Stark a kol., 2012). *D. fragilis* celosvetovo rozšírený, spôsobuje gastrointestinálne ochorenia u ľudí. Najčastejšími klinickými príznakmi s akútnou alebo chronickou infekciou *D. fragilis* sú hnačka, bolesti brucha a kŕče. Ochorenie môže mať aj asymptomatický priebeh (Stark a kol., 2012).

Možnosti diagnostiky

Za posledných niekoľko rokov diagnostický prístup k pacientom trpiacich črevnou parazitárnou infekciou, najmä protozoonózou, prešla rýchlym tempom evolúcie vďaka zavedeniu molekulárnych metód do klinického mikrobiologického laboratória (Fabricio, 2017).

Nested polymerázová reťazová reakcia (PCR) sa používa v situáciách, keď je potrebné zvýšiť citlivosť a/alebo špecifickosť PCR, napríklad pri amplifikácii konkrétneho člena polymorfnej génovej rodiny alebo ak v klinickej vzorke prítomnosť hľadanej DNA vo veľmi malom množstve alebo ak vzorka obsahuje heterogénnu populáciu bunkových typov. Nested PCR zvyčajne zahŕňa dve za sebou nasledujúce amplifikačné reakcie, z ktorých každá používa iný pár primerov.

Nested PCR je užitočná na amplifikáciu génov prítomných v malom množstve. Produkt z prvej reakcie PCR s použitím vonkajších primerov je použitý ako templát v druhej reakcii PCR, ktorá je zameraná na menšiu oblasť amplikónu, s použitím vnútorných primerov. Použitie dvoch párov oligonukleotidov umožňuje vykonať vyšší počet cyklov, čím sa zvyšuje citlivosť PCR. Zvýšená špecifickosť reakcie vyplýva z väzby dvoch samostatných súborov primerov na ten istý cieľový templát. Nested PCR je účinná metóda na amplifikáciu segmentov rôzne dlhých templátov, ale vyžaduje si znalosť sekvencie cieľového úseku (Green, Sambrook, 2019, Thompson a kol., 2013).

Cryptosporidium spp.

Molekulárne metódy na detekciu *Cryptosporidium parvum* sú zamerané na rôzne oblasti genómu. Medzi najbežnejšie oblasti detekcie patria gény SSU rRNA oblasti (malej podjednotky), proteínov steny oocýst kryptosporidií (COWP), interného transkribovaného spaceru (ITS), adhezívneho proteínu súvisiaceho s trombospondínom (TRAP), beta-tubulínu a glykoproteínu 60 (GP60; Leetz a kol., 2007). Analýza sekvencie nukleových kyselín lokusu GP60 z ľudských a zvieracích izolátov *C. parvum* dokazuje, že je vysoko polymorfny, oveľa viac ako akýkoľvek doteraz skúmaný lokus kryptosporidií. Tento lokus vykazuje početné jednonukleotidové a jednonukleotidovo-kyselinové polymorfizmy (SNP a SAAP), najmä medzi ľudskými izolátmi genotypu I (Strong a kol., 2000). Na fylogenetickú analýzu, molekulárne epidemiologické vyšetrenie a vyšetrenie ohnisk nákazy je užitočná analýza PCR-RFLP alebo PCR-sekvenovanie rôznych lokusov vrátane SSU rDNA, COWP, GP60 a mnohých ďalších cieľových génov. Najčastejšie cieleným lokusom je GP60 (Robinson, Chalmers, 2012). Primery amplifikujúce gén GP60 majú vyššiu mieru detekcie ako primery zamerané na SSU rRNA v prípade použitia pri *C. parvum* a *C. hominis* (Hatalová a kol., 2017)

V našej štúdii sa zameriavame na amplifikáciu úseku GP60 pomocou primerov GP60-F1 (priamy: 5'-ATGAGATTGTCGCTCATTATG-3) a GP60-R1 (reverzný: 5'-TTACAACAC GAATAAGGCTGC-3') v prvej reakcii, GP60-F2 (priamy: 5'-GCCGTTCCACTCAGA GGAAC-3') a GP60-R2 (reverzný: 5'-CCACATTACAAATGAAGTGCCGC-3') v druhej reakcii nested PCR.

Giardia duodenalis

Genotypy giardií sa identifikujú analýzou jedného alebo viacerých lokusov, ako sú SSU rDNA, beta-giardin, triozinfosfátizomeráza (TPI) a glutamatdehydrogenáza (GDH) (Asher a kol., 2012, Cacció a kol., 2012).

V našej štúdií sa zameriavame na amplifikáciu a sekvenáciu génu TPI pomocou nested PCR. Fragment génu TPI bol získaný pomocou primerov AL3543 (priamy: 5'-AAATTATGCCTGCTCGTCG-3') a AL3546 (reverzný: 5'-CAAACCTTTTCCGCAAACC-3') v prvej reakcii a AL3544 (priamy: 5'-CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3') a AL3545 (reverzný: 5'-GTGGCCACCACTCCCGTGCC-3') v druhej reakcii. Vonkajší pár primerov amplifikuje fragmenty s veľkosťou 605 bázových párov (bp), zatiaľ čo vnútorný pár primerov amplifikuje fragmenty s veľkosťou 530 bp. (Sulaiman a kol.2003).

Entamoeba sp. a Dientamoeba fragilis

Pre *Entamoeba sp.* a *Dientamoeba fragilis* sme vykonávali amplifikáciu pomocou génov SSU rRNA pomocou nested PCR..

Pri Nested PCR *Entamoeba sp.* sa využíva v prvej reakcii ako vonkajší pár primerov, E-1 (priamy: 5'- TAAGATGCACGAGAGCGAAA -3') a E-2 (reverzný: 5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA -3' špecifických na *Entamoeba* komplex. V druhej reakcii využívame špecifické primery na amplifikáciu SSU rRNA génov *Entamoeba histolitica* EH-1 (priamy: 5' AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG 3') a EH-2 (reverzný: 5' AAGAGGTCTAACCGAAATTAG 3'), ktoré ohraničujú oblasť 439 bp. (Parija a kol., 2007).

Gén SSU rRNA, sa zdá byť najlepším diagnostickým cieľom z hľadiska citlivosti a špecificity v porovnaní s testami PCR v reálnom čase zameranými na gény iné ako SSU rRNA (Qvarnstrom a kol., 2005).

Gén SSU rRNA *Dientamoeba fragilis* bol prvýkrát amplifikovaný a kompletne sekvenovaný v roku 1996 (Silberman a kol., 1996). DNA získaná zo stolice sa amplifikuje pomocou sady primerov špecifických pre *D. fragilis*, ktoré ohraničujú fragment génu SSU rRNA o veľkosti 662 bp v prvej reakcii a 366 bp. V druhej reakcii. Primer DF1 (priamy: 5'-CTCATAATCTACTTGGAAACCAATT-3') a DF4 primer (reverzný: 5'- CCCCATTATTCTCTTTGATATT-3') v prvej reakcii a DF322F (priamy: 5' - GAGAAGGCGCCTGAGAGATA

-3') a DF687R (reverzný: 5'- TTCATACTGCGCTAAATCATT -3'), v druhej reakcii (Tolba a kol., 2022, Cacció a kol., 2012).

Microsporidia spp.

V prípade *Microsporidia spp.* môžu byť cieľom nested PCR metódy sprievodné oblasti malej podjednotky (SSU), veľkej podjednotky (LSU), ribozomálnej DNA (rDNA) a interný transkribovaný spacer (ITS).

Priméry používané v našej štúdií sa zameriavajú na oblasť SSU rRNA génu a rozpoznávajú široké spektrum druhov mikrosporidií vrátane *Encephalitozoon spp.* a *E. bienersi* (Sokolova a kol., 2011). Primery MSP-1 (priamy: 5'-TGA ATG KGT CCC TGT-3') a MSP2b (reverzný: 5'-TCACTCGCCGCTACT-3') v prvej reakcii a primery MSP-3 (priamy: 5'-GGAATT CAC ACC GCC CGT CRY TAT-3') a MSP4a (reverzný: 5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGC -3') v druhej reakcii nested PCR.

Blastocystis sp.

U *Blastocystis sp.* je genetická diverzita určovaná analýzou SSU rRNA génov. V našej štúdií používame pár primerov BLAST-F1 (priamy: 5'- GGAGGTAGTGACAATAAATC -3') a BLAST-R1 (reverzný: 5'- CGTTCATGATGAACAATTAC -3') , ktoré ohraničujú oblasť približne 500bp. (Johnson a kol., 1989).

Záver

Prehľadom súčasnej literatúry tento článok zdôrazňuje význam molekulárnej diagnostiky pri zlepšovaní detekcie a liečby parazitárnych protozoárnych a fungálnych infekcií, najmä u vnímavých skupín obyvateľstva. Včasná a presná diagnostika, ktorú umožňuje metóda nested PCR, môže viesť k včasnému nasadeniu špecifickej liečby a môže prispievať k lepšej kvalite života pacientov. Zavedenie nested PCR so špecifickými primermi predstavuje významný pokrok v oblasti parazitológie, ktorý ponúka spoľahlivý a účinný diagnostický nástroj na identifikáciu kryptosporidiózy, giardiózy, blastocystózy, amébiózy, dientamébiózy a mikrosporidiózy v klinických podmienkach.

Pod'akovanie

Štúdiá sa realizovala v rámci projektu MŠVVaM SR VEGA č. 1/0359/21.

Literatúra

1. Anane, S, Attouchi, H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. In Gastroenterologie Clinique Et Biologique. ISSN 0399-8320, (2010), vol. 34, no. 8-9, p.450-464.
2. Asher A.J, Waldron L.S, Power M.L. (2012). Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. Parasitol. Res. 110:853– 858. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2565-3>
3. Bahrami, F., Haghighi, A., Zamini, G., Khademerfan, M., Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in faecal samples using nested multiplex PCR in west of Iran Epidemiol Infect, 147 (2019), p. e96, 10.1017/S0950268819000141
4. Bart, A., Wentink-Bonnema ,E.M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J., van Vugt, M., et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp.in 442 patients in a hospital setting in The Netherlands. BMC Infect. Dis. (2013);13(1):389.
5. Bartelt, L.A., Platts-Mills, J.A.,(2015). *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high-prevalence settings? Curr. Opin. Infect. Dis. 29, 502-507.
6. Bartelt, L.A., Sartor, R.B., (2015). Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep, 7, 62.
7. Bern, C., B. Hernandez, M. B. Lopez, M. J. Arrowood, A. M. De Merida, and R. E. Klein. (2000). The contrasting epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63:231–235
8. Bhattacharya, M. K., T. Teka, A. S. Faruque, and G. J. Fuchs. (1997). *Cryptosporidium* infection in children in urban Bangladesh. J. Trop. Pediatr. 43:282–286
9. Cacciò, S.M, Sannella, A.R, Manuali, E., Tosin, F., Sensi, M., Crotti, D., Pozio, E., Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. Emerg Infect Dis. (2012) May;18(5):838-41. doi: 10.3201/eid1805.111093.

10. Cacciò, S.M, Sannella, A.R, Manuali, E., Tosini F., Sensi M., Crotti D, Pozio E., (2012), Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 18:838 – 841. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1805.111093>.
11. Cacciò, S.M., Lalle, M., Svärd, S.G., 2017. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect. Genet. Evol.* In press. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.001.
12. Candela, E , Goizueta, C., Periago, M.V., Muñoz-Antoli, C., Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* spp. and *Entamoeba histolytica* in the village of Fortín Mbororé (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina) *Parasit Vectors*, 14 (2021), pp. 1-15, 10.1186/s13071-021-04968-z
13. CDC – DPDx Amebiasis [online] (2019) Dostupne na: <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
14. Center for Disease Control and Prevention. DPDx – Cryptosporidiosis (2019) (online) dostupné na: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html#print>
15. Center for Disease Control and Prevention. Parasites – Cryptosporidium, General information, 2019, (online) dostupné na: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/general.html>
16. Clark, C.G., Van Der Giezen, M., Alfellani, M.A, Stensvold, C.R., Recent developments in *Blastocystis* research. In *Advances in Parasitology*. ISSN 0065-308X, (2013), vol. 82, p.1-32.
17. Didier ES, Weiss LM. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24:490 – 495. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>.
18. Didier, E. S., Weiss, L. M. (2006). Microsporidiosis: Current Status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19 (5), 485–492. doi: 10.1097/01.qco.0000244055.46382.23
19. Einarsson, E., Ma'ayeh, S., Svärd, S.G., 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 34, 47-52.
20. El-Nadi, N.A., Omran, E.K., Ahmed, N.S., Fadel, E.F., Non-pathogenic protozoa and associated enteric symptom *J Adv Parasitol*, 4 (2017), pp. 47-50, 10.17582/journal.jap/2017/4.4.47.50
21. Fabricio Bruschi, Water-borne protozoa in humans, *Frontiers in parasitology*, (2017), volume 2, ISBN: 978-1-68108-434-3

22. Fayer, R, Xiao, L. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC Press, (2008). P. 1-560. ISBN 978-1-42005226-8
23. Fayer, R, Xiao, L. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC Press, (2008). P. 1-560. ISBN 978-1-42005226-8
24. Feng, Y., Xiao, L., (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 110-140.
25. Galván AL, Sánchez AM, Valentín MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. (2011). First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1301–1306. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01833-10>
26. Gomez-Puerta, L.A, Lopez-Urbina, M.T, Alarcon, V., Cama, V., Gonzales, A.E, Xiao, L. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean region. In *Parasitology International*. ISSN 1383-5769, (2014), vol. 63, no. 1, p. 31-34.
27. Gonin, P., Trudel, L., Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay *J Clin Microbiol*, 41 (2003), pp. 237-241, 10.1128/JCM.41.1.237-241.2003
28. Green, M.R, Sambrook, J., *Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Cold Spring Harb Protoc. 2019 Feb 1; (2019)(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182.
29. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol.* (2019) Apr-Jun;36(2):116-117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
30. Han B, Pan G, Weiss LM. Microsporidiosis in Humans. *Clin Microbiol Rev.* (2021) Dec 15;34(4):e0001020. doi: 10.1128/CMR.00010-20.
31. Han, B., Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016
32. Hatalová, E., A. Valenčáková, J. Kalinová, L. Luptáková, O. Danišová & M. Húska, 2017. Comparison of PCR primers for the identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in calves. *Bulg. J. Vet. Med.*, 20, Suppl. 1, 154–157.
33. Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B.; World Health Organization Foodborne

- Disease Burden Epidemiology Reference Group. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in (2010). PLoS Med. 12, e1001923.
34. Horlock-Roberts, K., Reaume, C., Dayer, G., Ouellet, C., Cook, N., Yee, J. ,2017. Drug-Free Approach to Study the Unusual Cell Cycle of *Giardia intestinalis*. mSphere. 2. pii: e00384-16.
 35. Hublin J.S., Maloney J.G., Santin M. Blastocystis in domesticated and wild mammals and birds. Res. Vet. Sci. (2020);135:260–282
 36. Cho, E.J, Yang, J.Y, Lee, E.S, Kim, S.C, Cha, S.Y, Kim, S.T, Lee, M.H, Han, S.H, Park, Y.S. A waterborne outbreak and detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water of an older high-rise apartment complex in Seoul. In Korean Journal of Parasitology. ISSN 0023-4001, (2013), vol. 51, no. 4, p. 461-466
 37. Ignatius, R., Gahutu, J.B., Klotz, C., Steininger, C., Shyirambere, C., Lyng, M., Musemakweri, A., Aebischer, T., Martus, P., Harms, G., Mockenhaupt, F.P., (2012). High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1677.
 38. Johnson AM, Thanou A, Boreham PFL & Baverstock PR (1989) *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* 68, 283–288.
 39. Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., Ochner C., Entamoeba histolytica: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development Can J Gastroenterol Hepatol, 2018 (2018), pp. 1-6, 10.1155/2018/4601420
 40. Lee, L.I., Chye, T.T., Karmacharya, B.M., Govind, S.K. Blastocystis sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? Parasites Vectors. (2012);5:130
 41. Leetz, A. S., I. Sotiriadou, J. Ongerth & P. Karanis, 2007. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. Parasitology Research, 101, 951–962.
 42. Mahmud, R., Lim, Y. A. L., Amir, A. (2017). “Microsporidia,” in Medical Parasitology (Cham: Springer International Publishing), 71–74.

43. Maloney J.G., Molokin A., Santin M. Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites Vectors*. (2020);13(1):595
44. Nadia, A., Mona, El-Dib, Khater, M., *Entamoeba*, *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Elsevier, (2022), Pages 492-512,
45. Newman, R. D., C. L. Sears, S. R. Moore, J. P. Nataro, T. Wuhib, D. A. Agnew, R. L. Guerrant, and A. A. M. Lima. (1999). Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* 180:167–175
46. Parija, S.C., Khairnar, K. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiol* 7, 41 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-41>
47. Perek-Matysiak A, Hildebrand J, Popiołek M, Buńkowska-Gawlik K. The Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Wild-Living Carnivores in Poland—A Question Concerning Its Host Specificity. *Pathogens*. 2023; 12(2):198. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020198>
48. Pham, P. Duc, H. Nguyen-Viet, J. Hattendorf, J. Zinsstag, P. Dac Cam, P. Odermatt Risk factors for *Entamoeba histolytica* infection in an agricultural community in Hanam province, Vietnam *Parasit Vectors*, 4 (2011), p. 102, 10.1186/1756-3305-4-102
49. Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devleeschauwer, B., Hall, A.J., Kirk, M.D., 791 Duarte, A.S., Black, R.E., Angulo, F.J., (2015). Aetiology-Specific Estimates of the 35 Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS One*. 10, e0142927.
50. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva A. (2005). Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5491–5497.
51. Ramírez JD, Sañchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol* 2014; 22:223–228. doi: 10.1016/j.meegid.(2013).07.020
52. Ramírez J.D., Flórez C., Olivera M., Bernal M.C., Giraldo J.C. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One*. (2017);12(2)

53. Robinson G, Chalmers RM. (2012). Assessment of polymorphic genetic April 2014, Volume 27, Number 2, markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp. Parasitol.* 132: 200 –215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.016>.
54. Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L. An Update on Zoonotic *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Humans. *Animals (Basel)*. (2021) Nov 19;11(11):3307. doi: 10.3390/ani11113307.
55. Ryan, U., Cacciò, S.M. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* 43(12-13), 943- 956.
56. Sekse, C., Holst-Jensen, A., Dobrindt, U., Johannessen, G.S., Li, W., Spilsberg, B., Shi, J., (2017). High Throughput Sequencing for Detection of Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* 8, 2029.
57. Silberman J.D, Clark C.G, Sogin M.L., (1996)., *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76:311–314. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02516-2](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(95)02516-2).
58. Smith, H.V., Cacció, S.M., Tait, A, McLauchlin, J, Thompson, R.C., Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. In *Trends in Parasitology*. ISSN 1471-4922, (2006), vol. 22, no. 4, p. 160-7.
59. Sokolova, O.I, Demyanov, A.V, Bowers, L.C, Didier, E.S, Yakovlev, A.V, Skarlato SO, et al. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2102–2108. doi: 10.1128/JCM.02624-10.
60. Stark D, Barratt JL, van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):634-50. doi: 10.1128/CMR.00017-09.
61. Stark, D., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J.T., Detection and transmission of *Dientamoeba fragilis* from environmental and household samples. *Am J Trop Med Hyg.* (2012) Feb; 86(2):233-6. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0526
62. Stark, D.J, Beebe, N., Marriott, D, Ellis, J.T., Harkness, J., *Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances.* *Trends Parasitol.* (2006); 22:92–96.
63. Strong, W.B, Gut, J., Nelson, R.G., Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization

- of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun.* (2000) Jul;68(7):4117-34. doi: 10.1128/IAI.68.7.4117-4134.2000.
64. Sulaiman I.M, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L (2003) Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9:1444–1452
 65. Thompson, A., Bench, S., Carter, B., Zehr, J., Chapter Three - Coupling FACS and Genomic Methods for the Characterization of Uncultivated Symbionts, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 531, (2013), Pages 45-60, doi.org/10.1016/B978-0-12-407863-5.00003-4
 66. Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S., & Hijjawi, N. S. (2005). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 77–158.)
 67. Tolba M.M, Allam AF, Khalil SS, Elshouki WM, Shehab AY. Evaluation of microscopy and PCR for detection of *Dientamoeba fragilis*. *Trop Parasitol.* 2022 Jul-Dec;12(2):87-93. doi: 10.4103/tp.tp_93_21
 68. Tolba, M.M, Allam, A.F, Khalil, S.S, Elshouki, W.M, Shehab,. AY., Evaluation of microscopy and PCR for detection of *Dientamoeba fragilis*. *Trop Parasitol.* (2022) Jul-Dec;12(2):87-93. doi: 10.4103/tp.tp_93_21
 69. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut.* (2007);56(3):328–35
 70. Valenčáková, A., Halánová, M. Immune response to Encephalitozoon infection. In *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* ISSN 0147-9571, (2012), vol. 35, no. 1, p. 1-7.
 71. Vávra, J., Lukeš, J. (2013). “Chapter Four - Microsporidia and ‘The Art of Living Together,’” in *Advances in Parasitology.* Ed. Rollinson, D. (UK: Academic Press), 253–319.
 72. Vávra, J., Lukeš, J., Microsporidia and 'the art of living together'. In *Advances in Parasitology.* ISSN 0065-380, (2013), vol.82, p. 253-319.
 73. WHO, (2015). *World Health Statistics.* World Health Organisation, Geneva, Switzerland. 955 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf. Accessed 956 11/1/2017.

74. WHO, Foodborne disease, (online) dostupné na: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1
75. Xiao, L., C. Bern, J. Limor, I. Sulaiman, J. Roberts, W. Checkley, L. Cabrera, R. H. Gilman, and A. A. Lal. (2001). Identification of 5 types of Cryptosporidium parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 183:492– 497

Dôkaz anti-*A. phagocytophilum* IgG protilátok u profesionálnych vojakov z východného Slovenska

Zuzana Kalinová, Monika Halánová

Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

Abstrakt

Ľudská granulocytárna anaplazmóza je novo sa objavujúce kliešťami prenášané ochorenie. Pôvodcom nákazy je gram negatívny, obligátne intracelulárny patogén *Anaplasma phagocytophilum*. V Európe, vrátane Slovenska, sa ako vektor prenosu *A. phagocytophilum* uplatňuje výlučne kliešť obyčajný *Ixodes ricinus*. Cieľom práce bolo detegovať anti-*A. phagocytophilum* IgG protilátky u profesionálnych vojakov z východného Slovenska. Celkovo bolo v rámci našej štúdie vyšetrených 322 krvných sér (296 mužov a 26 žien). Na diagnostiku bol použitý komerčný test *Anaplasma phagocytophilum* IFA IgG (f. FOCUS DIAGNOSTIC INC., California, USA). Test je určený na stanovenie IgG protilátok proti *A. phagocytophilum* v ľudskom sére metódou nepriamej imunofluorescencie. Z celkového počtu 322 krvných sér boli IgG protilátky proti *A. phagocytophilum* detegované v 67 (20,8%) prípadoch.

Abstract

Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is emerging tick-borne infectious diseases. The etiological agent of disease is gram-negative, obligate intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. In Europe, including Slovakia, the principal vector of *Anaplasma phagocytophilum* is the common tick *Ixodes ricinus*. The aim of the study was to detect anti-*A. phagocytophilum* IgG antibodies in group of professional soldiers from eastern Slovakia. In total, 322 blood serum samples (296 men and 26 women) were analysed in our study. The commercial *Anaplasma phagocytophilum* IFA IgG test (f. FOCUS DIAGNOSTIC INC., California, USA) was used for diagnosis. A test is intended for the detection of IgG antibodies against *A. phagocytophilum* in human serum by the method of indirect immunofluorescence. From the total number of 322 blood sera, IgG antibodies against *A. phagocytophilum* were detected in 67 (20,8%) cases.

Kľúčové slová: *Anaplasma phagocytophilum*, ľudská granulocytárna anaplazmóza, *Ixodes ricinus*, prevalencia, Slovensko

Úvod

Ľudská granulocytárna anaplazmóza (HGA – human granulocytic anaplasmosis) je novo sa objavujúca kliešťami prenášaná zoonóza. Pôvodcom ochorenia je malá, gram negatívna, nepohyblivá, obligátne intracelulárna baktéria *Anaplasma phagocytophilum*, *A. phagocytophilum* je dôležitým druhom v rode *Anaplasma*. Replikuje sa v cytoplazmatických vakuolách hostiteľských buniek predovšetkým v granulocytoch (neutrofiloch a eozinofiloch) (Chen a kol., 1994; Dumler a kol., 2001).

Najvýznamnejším vektorom *A. phagocytophilum* v Európe vrátane Slovenska je kliešť obyčajný *Ixodes ricinus* (Strle, 2004). Tento kliešť je známy aj ako vektor mnohých iných mikroorganizmov, ako je napr. *Borrelia burgdorferi* sensu lato komplex, vírus kliešťovej encefalitídy, *Coxiella burnetii*, *Babesia* spp. a iné (Kmety a kol., 1990; Kožuch a kol., 1990; Řeháček a kol., 1991).

Hlavným kompetentným rezervoárovým hostiteľom je vysoká lesná zver predovšetkým srnec lesný (*Capreolus capreolus*), jeleň hôrny (*Cervus elaphus*), kamzík vrchovský (*Rupicapra rupicapra*) a daniel škvrnitý (*Dama dama*) (Liz, 2000). Bakteriálna DNA bola potvrdená aj u iných cicavcov, ako medveď hnedý (*Ursus arctos*), líška hrdzavá (*Vulpes vulpes*), vlk dravý (*Canis lupus*), kone, kozy, ovce, hovädzí dobytok a psy (Hulínska a kol., 2004; Vichová a kol., 2010).

Ľudská granulocytárna anaplazmóza sa prejavuje ako chrípke podobné ochorenie. Najčastejšími príznakmi sú horúčka (> 38,5 °C), bolesti hlavy, svalov a kĺbov, únava, malátnosť postihnutie pečene (zvýšené pečeňové transaminázy), poruchy CNS (zmätenosť, neurologické príznaky), gastrointestinálneho systému (nevoľnosť a zvracanie), respiračné príznaky. U niektorých pacientov sa môže objaviť vyrážka (Dumler a kol., 2005).

Cieľom našej práce bolo detegovať protilátky triedy IgG proti *A. phagocytophilum* u profesionálnych vojakov z východného Slovenska.

Materiál a metodika

V rámci našej štúdie bolo na prítomnosť anti-*A. phagocytophilum* IgG protilátok spolu vyšetrených 322 (296 mužov a 26 žien) sér. Vzorky krvných sér boli získané od profesionálnych vojakov, ktorí vykonávajú svoju činnosť na území východného Slovenska (Trebišov – 99 osôb, Michalovce – 101 osôb a Rožňava – 122 osôb).

Vzorky krvi boli odobraté z *vena cubiti* a z nich získané séra boli až do použitia v teste skladované pri teplote -20 °C.

Na stanovenie IgG protilátok proti *Anaplasma phagocytophilum* v ľudskom sére bol použitý komerčný diagnostický test nepriamej imunofluorescencie *Anaplasma phagocytophilum* IFA IgG (f. FOCUS DIAGNOSTIC INC., California, USA). Táto vyšetrovacia metóda má dvojfázový priebeh. V prvej fáze sú séra pacientov riedené v PBS a nanesené na sklíčko do jamiek, na dne ktorých sú fixované neaktívne antigény *A. phagocytophilum*. Sklíčka sú následne inkubované pri teplote 37°C 30 minút. Po inkubácii sú sklíčka premyté v PBS. V druhej fáze je každá jamka pokrytá fluorescenčne značenou protilátkou proti ľudskému IgG. Sklíčka sú opäť inkubované a po premytí, usušení a montovaní sa prezerajú fluorescenčným mikroskopom pri 400-násobnom zväčšení. Pozitívna reakcia sa prejaví ako jablkovo zelená fluorescencia morúl.

Výsledky

Z celkového počtu 322 vyšetrených vzoriek krvných sér boli protilátky triedy IgG proti *A. phagocytophilum* zistené v 67 (20,8%) prípadoch. V kategórii mužov bolo pozitívne detegovaných 64, čo predstavuje 21,6% pozitivitu. Z 26 vyšetrených žien boli pozitívne 3 (11,5% pozitivita). Podľa miesta výkonu povolania bolo v okrese Trebišov pozitívnych 12 (12,1%) osôb, v okrese Michalovce 20 (19,8%) osôb a v okrese Rožňava 35 (28,7%) osôb. Aktívny kontakt s kliešťom udávalo 158 osôb, z nich malo pozitívne anti-*Anaplasma phagocytophilum* IgG protilátky 35 (22,15%).

Diskusia

Priemerná prevalencia *A. phagocytophilum* v infikovaných kliešťoch sa pohybuje v jednotlivých krajinách v rozmedzí od 0,4% do 66,7% (Blanco a Oteo, 2002) v závislosti od počtu vyšetrených vektorov, použitých diagnostických metód, ročného obdobia, v ktorom boli

kliešťoch vyšetované a pod. Z krajín, ktoré susedia so Slovenskou republikou boli anaplazmy v kliešťoch potvrdené v Českej republike (Hulinska a kol., 2002; Rybářová a Široký, 2017), Rakúsku (Sixl a kol., 2003), Ukrajine (Lesiczka a kol., 2023), Poľsku (Grzeszczuk a kol., 2004; Grzeszczuk, 2006; Moniuszko-Malinowska a kol., 2021). Poľsko patrí medzi krajiny s najväčším počtom štúdií, ktoré sa týkajú danej problematiky.

Z ďalších európskych krajín sa anaplazmy v kliešťoch potvrdili v Bulharsku (Christova a kol., 2003; Stanilov a kol., 2023). Pozitívne detegované kliešte hlásili aj v Nemecku (Fingerle a kol., 2001), Španielsku (Oteo a kol., 2001), Francúzsku (Parola a kol., 1998), Taliansku (Santino a kol., 2002; Melis a kol., 2024) a v mnohých iných európskych krajinách.

V Slovenskej republike bola *A. phagocytophilum* v kliešťoch *I. ricinus* prvýkrát detegovaná v roku 2002 (Špitalská a Kocianová, 2002). V roku 2006 bola v oblasti stredného Slovenska v kliešťoch *I. ricinus* zistená 4,4% prevalencia *A. phagocytophilum* (Smetanová a kol., 2006). V roku 2021 Špitalská a kol. potvrdili 13,5% prevalencia tejto baktérie v kliešťoch zozbieraných na území Slovenska (Špitalská a kol., 2021).

V roku 2003 Derdáková a kol. vo svojej štúdií zistili 8,3% premorenosť kliešťov *I. ricinus* baktériou *A. phagocytophilum* v oblasti východného Slovenska (Derdáková a kol., 2003). V ďalšej štúdií v roku 2007 bolo na prítomnosť *A. phagocytophilum* vyšetrených 129 kliešťov *I. ricinus* z oblasti Liptovskej kotliny. Infikovanosť kliešťov baktériou *A. phagocytophilum* bola 3,8% (Nováková a kol., 2008).

Percento prevalencie *A. phagocytophilum* u ľudí sa v Európe pohybuje od 0 do 28%, v závislosti od použitej metódy a od typu vyšetrovanej skupiny ľudí (Strle, 2004). V Európe bol prvý klinický prípad u ľudí opísaný v Slovinsku v roku 1997 (Petrovec a kol., 1997). V nasledujúcich rokoch boli hlásené prípady HGA v niekoľkých ďalších európskych krajinách: Rakúsko (Walder a kol., 2006; Lagler a kol., 2017), Chorvátsko (Topolovec a kol., 2003), Francúzsko (Koebel a kol., 2012), Nemecko (Kowalski a kol., 2006), Taliansko (De La Fuente a kol., 2005), Portugalsko (Santos a kol., 2009), Španielsko (Oteo a kol., 2000) a Švédsko (Dumler a kol., 1997).

V Českej republike boli detegované IgG protilátky proti *A. phagocytophilum* v 7,9% prípadoch (Kurzová a kol., 2004). Ďalšia štúdiá potvrdila u pacientov 18,18% pozitivitu (Hulínská a kol., 2009). U pacientov so suspektnou Lymfskou boreliózou boli zistené anti-*A. phagocytophilum* IgG protilátky v 3,18% prípadoch (Dvořáková-Heroldová a Dvořáčková, 2014).

V Poľsku bola zistená séroprevencia 19,8% u lesných pracovníkov (Zwolinski a kol., 2004). Prevalencia IgG protilátok proti *A. phagocytophilum* u lesných robotníkov z regiónu Białystok (Poľsko) bola 3,9% (Grzeszczuk, 2006). Ostatné poľské štúdie demonštrujú u lesných robotníkov séropozitivitu od 17,7% do 20,0% v stredovýchodnej časti Poľska a 9,6% v severnej a severovýchodnej oblasti Poľska (Tomasiewicz a kol., 2004; Cisak a kol., 2005; Stanczak a Grzeszczuk, 2006).

V roku 2008 Kocianová a kol. popísali 25% séroprevenciu *A. phagocytophilum* u ľudí z oblasti stredného Slovenska, ktorá je endemická pre Lymeskú boreliózu. Sledované osoby udávali opakovaný aktívny kontakt s kliešťom. Vzorky sér boli analyzované HGA IgG IFA testom. Išlo o vôbec prvú štúdiu dokazujúcu riziko infekcie *A. phagocytophilum* u ľudí v prírodnom ohnisku stredného Slovenska (Kocianová a kol., 2008).

V roku 2010 Nováková a kol. prezentovali prvý prípad HGA potvrdený nested PCR u 54 ročného poľovníka zo stredného Slovenska. Klinické príznaky u tohto pacienta boli nešpecifické, zahŕňali dlhotrvajúce subfebrility, malátnosť, bolesti hlavy a kĺbov, erytém. Pacient udával opakovaný aktívny kontakt s kliešťom. Výsledky sérologického vyšetrenia (IFA – IgM a IgG) boli u neho negatívne. Išlo o vôbec prvý priamy dôkaz HGA u človeka na Slovensku. Dovtedy nebol v SR diagnostikovaný pacient s potvrdenou granulocytárnou anaplazmózou (Nováková a kol., 2010).

V skupine pacientov z východného Slovenska s podozrením na Lymeskú boreliózu sa sledovali protilátky triedy IgG proti *A. phagocytophilum*. Zaznamenala sa u nich 7% séropozitivita (Kalinová a kol., 2009). 17,7% prevalencia anti-*A. phagocytophilum* IgG protilátok bola zistená u pacientov s podozrením na kliešťovú encefalitídu (Kalinová a kol., 2015).

Záver

V európskych krajinách, podobne aj na Slovensku, bola prítomnosť *A. phagocytophilum* potvrdená v kliešťoch *I. ricinus* a tiež u rôznych divokožijúcich a domácich zvierat, avšak klinické prípady HGA sú publikované zriedkavo. Na Slovensku nie sú k dispozícii žiadne oficiálne epidemiologické údaje o prevalencii tohto ochorenia. Bolo publikovaných len niekoľko štúdií týkajúcich sa danej problematiky s výsledkami prevalencie v rozmedzí od 7 % do 25 %. Nami potvrdená celková 20,8 % prevalencia protilátok IgG proti *A. phagocytophilum* zodpovedá zisteniam týchto štúdií. Pri podozrení na akékoľvek kliešťami prenášané ochorenie

je veľmi dôležité u pacientov v prípade negatívnych výsledkov hlavne na kliešťovú encefalitídu a lymfskú boreliózu myslieť aj na anaplazmózu. Vo zvýšenom riziku infekcie sú profesionálne exponované osoby (lesníci, poľovníci, poľnohospodári) a osoby, ktoré žijú v endemických oblastiach kliešťami prenášaných ochorení.

Literatúra

1. Blanco JR, Oteo JA: Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8, 763-772.
2. Chen S, Dumler JS, Bakken JS, Walker AR: Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiological agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994, 32, 589-595.
3. Christova I, van de Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, 22, 535-542.
4. Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Wójcik-Fatla A, Polak J, Dutkiewicz J: Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 2005, 12, 127-132.
5. De La Fuente J, Massung RF, Wong SJ, Chu FK, Lutz H, Meli M, et al.: Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol*. 2005, 43, 1309-1317.
6. Derdáková M, Halánová M, Stanko M, Štefančíková A, Čisláková L, Peťko B: Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 2003, 10, 269-271.
7. Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R, Granstrom M: A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J Infect Dis* 1997, 175, 720-722.
8. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51, 2145-2165.

9. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS: Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 2005, 11, 1828-1834.
10. Dvořáková Heroldová M, Dvořáčková M: Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in patients with suspected Lyme borreliosis. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2014, 63, 297-302
11. Fingerle V. et al.: Human granulocytic ehrlichiosis: epidemiological aspects from Germany. Symposium on tick-transmitted diseases, Ljubljana, Slovenia, 13-15 September 2001, Programme and compendium of abstracts, 2001, p. 2.
12. Grzeszczuk A, Stańczak J, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Łozowska W, Prokopowicz D: Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Ann Agric Environ Med* 2004, 11, 99-103.
13. Grzeszczuk A: *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Białystok region. *Adv Med Sci* 2006, 51, 283-286.
14. Hulínska D, Votypka J, Plch J, Vlcek E, Valesová M, Bojar M, Hulínský V, Smetana K: Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *New Microbiol* 2002, 25, 437-448.
15. Hulínská D, Langrová K, Pejcoch M, Pavlásek I: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by realtime polymerase chain reaction. *APMIS* 2004, 112, 4-5, 239-247.
16. Hulínská D, Votypka J, Vaňousová D, Hercogová J, Hulínský V, Dřevová H, Kurzová Z, Uherková L: Identification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients with erythema migrans. *Folia Microbiol* 2009, 54, 246-256.
17. Kalinová Z, Halánová M, Čisláková L, Sulínová Z, Jarčuška Pa: Occurrence of IgG antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* in humans suspected of Lyme borreliosis in Eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 2009, 16, 285-288.
18. Kalinová Z, Halánová M, Čisláková L, Juriš P, Čechová L: Occurrence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* in patients with suspected tick-borne encephalitis. *Ann Agric Environ Med* 2015, 22, 409-411.

19. Kmety E, Řeháček J, Výrosteková V, Kocianová E, Guryčová D: Infestation of ticks with *Borrelia burgdorferi* and *Francisella tularensis* in Slovakia. *Bratisl Lek Listy* 1990, 91, 251-266.
20. Kocianová E, Košťanová Z, Štefanidesová K, Špitalská E, Boldiš V, Hučková D, Stanek G: Serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infections in patients with a history of tick bite in central Slovakia. *Wien Klin Wochenschr* 2008, 120, 427-431.
21. Koebel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y, Jaulhac B, Brouqui P, De Martino S J: Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, 72, 214-218.
22. Kowalski J, Hopfenmüller W, Fingerle V, Malberg H, Eisenblätter M, Wagner J, Miksits K, Hahn H, Ignatius R: Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12, 924-927.
23. Kožuch O, Labuda M, Lysý J, Weismann P, Krippel E: Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol* 1990, 34, 537-544.
24. Kurzová Z, Dřevová H, Plch J: Evidence of antibodies against ehrlichiae in patients in the Czech Republic. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)* 2004, 13, 213-215 (in Czech).
25. Lagler H, Harrison N, Kussmann M, Obermüller M, Burgmann H, Makristathis A, Ramharter M: Direct detection of *Anaplasma phagocytophilum* by polymerase chain reaction followed by electrospray ionization mass spectrometry from human blood. *Int J Infect Dis* 2017, 60, 61-3.
26. Lesiczka PM, Hrazdilova K, Höning V, Modrý D, Zurek L: Distant genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from *Ixodes ricinus* attached to people. *Parasites & Vectors* 2023, 16, <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05654-y>
27. Liz JS: Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. In *Int J Med Microbiol* 2002, 291, Suppl. 33, 104-105.
28. Melis S, Biffignandi GB, Olivieri E, Galon C, Vicari N, Prati P, Moutailler S, Sassera D, Castelli M: High-throughput screening of pathogens in *Ixodes ricinus* removed from hosts in Lombardy, northern Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2024, 15, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102285>
29. Moniuszko-Malinowska A, Dunaj J, Andersson M O, Chmielewski T, Czupryna P, Groth M, Grygorczuk S, Zajkowska J, Kondrusik M, Kruszewska E, Pancewicz S: Anaplasmosis

- in Poland - analysis of 120 patients. *Ticks and Tick borne Diseases* 2021, 12, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101763>
30. Nováková M. a kol. *Anaplasma phagocytophilum* a *Borrelia burgdorferi* sensu lato v kliešťoch *Ixodes ricinus* severnej oblasti Slovenska. In Zborník príspevkov: „Zoonózy - spoločná ochrana zdravia ľudí a zdravia zvierat“, Bratislava, 11. - 12. september 2008, s. 66.
 31. Novakova M, Vichova B, Majlathova V, Lesnakova A, Pochybova M, Petko B: First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 2010, 17, 129-133.
 32. Oteo JA, Blanco JR, de Artola VM, Ibarra V: First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis* 2000, 6, 430-432.
 33. Oteo JA, Gil H, Barral M, Pérez A, Jimenez S, Blanco JR, Martinez de Artola V, García-Pérez A, Juste RA: Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 2001, 127, 353-358.
 34. Parola P, Beati L, Cambon M, Brouqui P, Raoult D: Ehrlichia DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol* 1998, 35, 180-183.
 35. Petrovec M, Lotric-Furlan S, Avsic-Zupanc T, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS: Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J Clin Microbiol* 1997, 35, 1556-1559.
 36. Rybářová M, Široký P: Occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in three sympatric tick species in the South Moravia, Czech Republic. *Biologia* 2017, 72, 365-369.
 37. Řeháček J, Úrvolgyi J, Kocianová E, Sekeyová Z, Vavreková M, Kováčová E: Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 1991, 7, 299-303.
 38. Santino I, Del Piano M, Sessa R, Favia G, Iori A: Detection of four *Borrelia burgdorferi* genospecies and first report of human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks collected in central Italy. *Epidemiol Infect* 2002, 129, 93-97.
 39. Santos AS, Bacellar F, Dumler JS: A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 2009, 15, 46-7.

40. Sixl W, Petrovec M, Marth E, Wüst G, Stünzner D, Schweiger R, Avsic-Zupanc T: Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 990, 94-97.
41. Smetanová K, Schwarzová K, Kocianová E: Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078, 312-315.
42. Stanilov I, Blazhev A, Miteva L: *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species in Ixodidae Ticks Collected from Two Regions of Bulgaria. *Microorganisms* 2023, 11, 594. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030594>
43. Stańczak J, Grzeszczuk A: Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among forestry rangers in northern and north-eastern Poland. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1078, 89-91.
44. Strle F: Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 2004, 293 (Suppl 37), 27-35.
45. Špitalská E, Kocianová E: Agents of *Ehrlichia phagocytophila* group and other microorganisms co-infecting ticks in southwestern Slovakia. *Acta Virol* 2002, 46, 49-50.
46. Špitalská E, Boldišová E, Štefanidesová K, Kocianová E, Majerčíková Z, Rusnáková-Taragel'ová V, Selyemová D, Chvostáč M, Derdáková M, Škultéty E: Pathogenic microorganisms in ticks removed from Slovakian residents over the years 2008-2018. *Ticks Tick Borne Dis* 2021, 12, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101626>
47. Tomaszewicz K, Modrzewska R, Buczek A, Stańczak J, Maciukajć J: The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* infection in mideastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2004, 11, 261-264.
48. Topolovec J, Puntaric D, Antolovic-Pozgain A, Vukovic D, Topolovec Z, Milas J, Druško-Barišić V, Venus M: Serologically detected “new” tick-borne zoonoses in eastern Croatia. *Croat Med J* 2003, 44, 626-629.
49. Vichová B, Majláthová V, Nováková M, Straka M, Pet'ko B: First Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European Brown Bear (*Ursus arctos*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2010, 10, 1-3.
50. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, Berek K, Falkensammer B, Huber K, Petrovec M, Dierich M P, Würzner R: Human granulocytic anaplasmosis in Austria: epidemiological, clinical,

and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol* 2006, 296, 297-301.

51. Zwolinski J, Chmielewska-Badora J, Cisak E, Buczek A, Dutkiewicz J: Prevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in forestry workers from the Lublin region. *Wiad Parazytol* 2004, 50, 221-227.

Zdravotné riziká migrantov vstupujúcich na územie Slovenskej republiky

Lenka Balogová ^a, Richard Bárta ^b, Peter Juriš ^c

^a *Klinika infektológie a cestovnej medicíny UPJŠ LF a UNLP, Lekárska fakulta,
Univerzita P. J. Šafárika Košice*

^b *Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava*

^c *Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice*

Abstrakt

Utečenci a migranti sú vystavení predovšetkým infekčným a neinfekčným chorobám, ktoré nie sú bežné v Európe. Vo väčšine krajín EÚ sa ich vyšetrenia upravujú podľa epidemiologickej situácie krajiny pôvodu migrantov. U nás sa podrobujú skriningovému vyšetreniu podľa trasy cesty a krajiny pôvodu. Odporúča sa identifikácia zdravotných problémov u utečencov a migrantov na miestach vstupu krátko po ich príchode, vrátane správnej diagnostiky a liečby. Potrebná zdravotná starostlivosť musí byť zabezpečená prednostne pre špecificky zraniteľné skupiny obyvateľstva - deti, tehotné ženy a starší ľudia. Výsledky skriningu nesmú byť použité ako dôvod alebo oprávnenie na vyhostenie utečenca alebo migranta z krajiny.

Abstract

Refugees and migrants are primarily exposed to infectious and non-infectious diseases that are not common in Europe. In most EU countries, their examinations are adjusted according to the epidemiological situation of the migrants' country of origin. With us, they undergo a screening examination according to the route of travel and the country of origin. Identification of health problems in refugees and migrants at points of entry soon after their arrival, including proper diagnosis and treatment, is recommended. Necessary health care must be ensured primarily for specifically vulnerable groups of the population - children, pregnant women and the elderly. Screening results must not be used as a reason or authorization to expel a refugee or migrant from the country.

Kľúčové slová: utečenci, migranti, skriningové vyšetrenie, diagnostika, liečba, prednostná zdravotná starostlivosť

Úvod

Napriek všeobecnému dojmu, že existuje súvislosť medzi migráciou a dovozom infekčných ochorení, medzi nimi nie je priama väzba. Utečenci a migranti sú vystavení predovšetkým infekčným a neinfekčným chorobám, ktoré sú bežné v Európe, a to nezávisle od sťahovania (Bade, K.J., 2005). Vo väčšine krajín sa vyšetrenia upravujú podľa epidemiologickej situácie krajiny pôvodu migrantov. Spôsob zabezpečenia zdravotnej starostlivosti ovplyvňuje aj množstvo migrantov, utečencov a ekonomické možnosti prijímajúcej krajiny. Migranti v Slovenskej republike sa podrobujú skriningovému vyšetreniu podľa trasy cesty a krajiny pôvodu (Vargová, D., 2006, Berthotyová, E., 2017). Rozsah zdravotnej starostlivosti závisí od zdravotného stavu osoby a úhrada od statusu migranta. U detí, pokiaľ nemajú očkovací preukaz, sa vykonáva povinné očkovanie.

Krajiny Európskej únie čelia čoraz silnejšej vlne nelegálnej migrácie z krajín Afriky a Ázie. Na území Európskej únie sa preto musíme pripraviť na výskyt ochorení, ktoré si migranti so sebou prinesú zo svojej krajiny pôvodu, prípadne z trasy svojho presunu (Brnula, P., 2008, Bejček, J.M., 2016).

ECDC (Hospodárska spolupráca rozvojových krajín) zistilo veľký rozdiel medzi krajinami Európskej únie v systéme skriningových vyšetrení migrantov, rozsahu aj dôrazu na objektivizáciu vyšetrení. Niektoré krajiny sa uspokojia skriningom vo forme dotazníka, iné majú zoznam povinných vyšetrení pre všetkých migrantov. Niektoré krajiny odporúčajú prichádzajúcim deťom svoju obvyklú vakcináciu na dobrovoľnej báze, iné vakcinujú priamo v táboroch. Silnejšie migračné toky do krajín Európskej únie vyvolávajú potrebu zjednotenia základných postupov, úlohou ktorých je ochrana verejného zdravia súvisiaca s migráciou v rámci zdravotnej politiky WHO European Health 2020. V rámci prístupu k zdravotnej starostlivosti Svetová zdravotnícka organizácia WHO podporuje stratégiu poskytovania zdravotnej starostlivosti bez ohľadu na právny štatút migrantov. Tak ako rýchly prístup k zdravotnej starostlivosti môže viesť k vyliečeniu, tak isto môže zabrániť šíreniu chorôb. Je v záujme oboch, migrantov aj prijímajúcej krajiny, aby sa zabezpečilo, že stála populácia nie je zbytočne vystavená dovozu infekčných agensov. WHO v súlade s uznesením číslo WHA 61.17 o zdraví migrantov, schváleným 61. Svetovým zdravotníckym zhromaždením v roku 2008,

podporuje stratégiu poskytovania služieb zdravotnej starostlivosti migrantom a utečencom, bez ohľadu na ich právne postavenie ako súčasť všeobecného zdravotného poistenia. Odporúča sa identifikácia zdravotných problémov u utečencov a migrantov na miestach vstupu krátko po ich príchode, vrátane správnej diagnostiky a liečby. Potrebná zdravotná starostlivosť musí byť zabezpečená prednostne pre špecificky zraniteľné skupiny obyvateľstva (deti, tehotné ženy, starší ľudia) (Králiková, K., 2012). Povinný skrining odrádza migrantov žiadať o lekársku prehliadku a ohrozuje identifikáciu vysokorizikových pacientov. Výsledky skriningu nesmú byť použité ako dôvod alebo oprávnenie na vyhostenie utečenca alebo migranta z krajiny. Výsledok vyšetrení vypovedá, či je osoba schopná pobytu v tábore alebo mieste pobytu, alebo je nebezpečná pre zdravie svojej alebo iných osôb v okolí. Zároveň odhaľuje možné obete násillia a mučenia, zabezpečuje ochranu verejného zdravia a určuje, či je nejaká zdravotná príčina, aby zadržaná osoba bola postavená pod špeciálnu kontrolu alebo obmedzenia (Brnula, P., 2008).

Hlavné zdravotné problémy, ktoré postihujú migrantov v súčasnej migračnej vlne v Európe sú náhodné zranenia, podchladenie, popáleniny, kardiovaskulárne príhody, komplikácie súvisiace s tehotenstvom a pôrodom, diabetes a hypertenzia, riziká spojené s pohybom obyvateľstva psychosociálne poruchy, reprodukčné zdravotné problémy, vyššia úmrtnosť novorodencov, užívanie drog, poruchy výživy a násillie.

Zásadný význam pre chronické stavy má prerušenie kontinuálnej liečby, deti sú náchylné k akútnym infekciám, ako sú infekcie dýchacích ciest a hnačky, nedostatok hygieny môže viesť ku kožným infekciám ako svrab, zavšivavenie prípadne kožná leishmanióza. Podľa krajiny pôvodu migrantov odporúča ECDC myslieť na klasické infekčné ochorenia ako sú tuberkulóza, HIV/AIDS, hepatitída, osýpky a rubeola, Chagasova choroba, ale aj ochorenia prenosné potravinami a vodou, bežné, ale aj zriedkavé, ako je polio-myelitída (Sýria, Ukrajina), ochorenia prenášané vektormi v oblasti Stredozemného mora, ako je leishmanióza s ohniskami (Sýria), malária (Kongo). Opačne, pre agensy ako sú Ebola, Marburg a Lassa vírusy alebo Blízkovýchodný respiračný syndróm (MERS) je riziko veľmi nízke. Skúsenosti ukázali, že ak dôjde k ich importu, týka sa viac pravidelných cestujúcich, turistov alebo pracovníkov v zdravotníctve, než utečencov alebo migrantov. Obyvateľom Slovenska môžu hroziť zdravotné riziká najmä z hľadiska možného šírenia infekčných ochorení. V krajinách s teplou klímou sa u domorodého obyvateľstva nepozoruje záškrt (diftéria) dýchacích ciest, lebo s výnimkou dojčiat má celá populácia vysoký stupeň imunity, získanej rýchlo sa šíriacou difterickou nákazou kože, ktorá sa obvykle ani nediagnostikuje. Kožné prípady záškrtu boli nedávno diagnostikované v Dánsku a vo Švajčiarsku u migrantov, ktorí prišli z Eritrey a Somálska. U

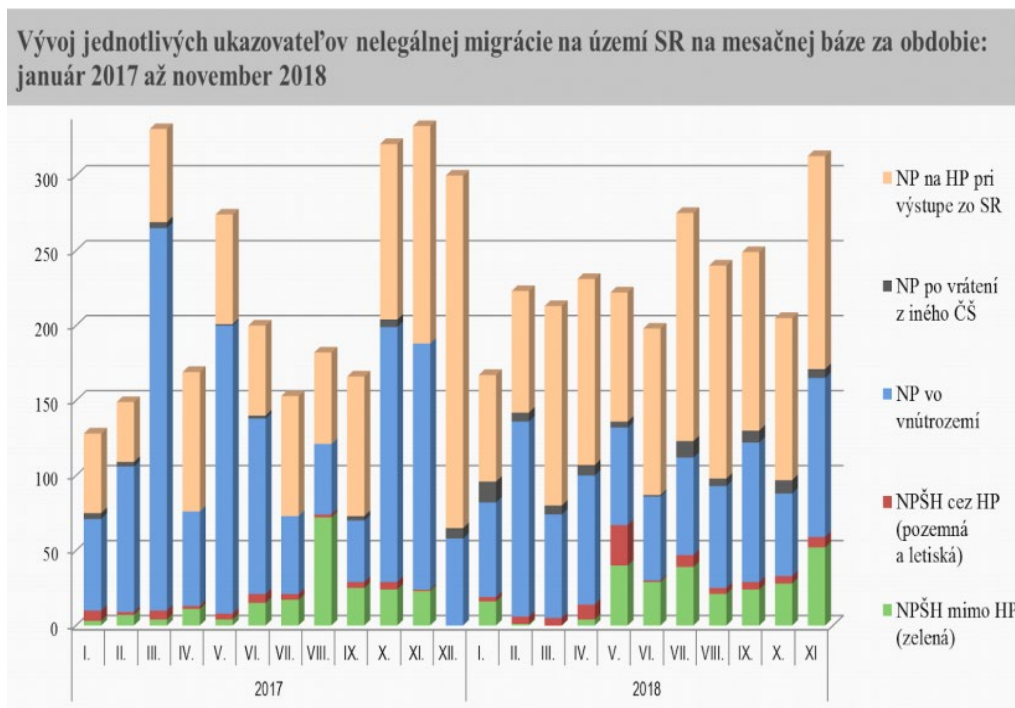
migrantov je častým problémom dopátrať sa dokladu o očkovaní, resp. nevedia povedať, proti ktorým ochoreniam boli v minulosti očkovaní. Pre krajiny v oblastiach trópov a subtropov je typické široké spektrum infekčných chorôb. Okrem ochorení, ktoré sa vyskytujú v miernom pásme, sa tam vyskytujú aj špecifické tropické choroby (napr. kožná leishmanióza, tropické mykózy, parazitárne ochorenia). Nezriedka bývajú u migrantov súčasné infekcie viacerých druhov infekčných agensov, hlavne parazitov (tzv. polyparazitizmus). Slovensko nepatrí k tradičným cieľovým krajinám migrantov a má spomedzi krajín Európskej únie šiesty najnižší podiel cudzincov (Maslen, J., Brnula, P., 2004).

V rámci Európy z celkového počtu 13,1 mil. migrantov boli obyvatelia inej krajiny Európskej únie a zvyšných 20,4 milióna boli štátni príslušníci štátov mimo EÚ. Medzi migrantmi z tretích krajín, žijúcich v niektorej z krajín Európskej únie, majú najväčšie zastúpenie občania Turecka (1,98 mil.), Maroka (1,38 mil.) a Číny (0,72 mil.). Migranti tvoria 7 % celkovej populácie členských krajín EÚ (Keller, J., 2017). Viac ako dve tretiny migrantov v Európskej únii žije v piatich krajinách Európskej únie - v Nemecku, Španielsku, Veľkej Británii, Taliansku a vo Francúzsku. V roku 2015 žilo na Slovensku legálne 81 211 cudzincov, čo predstavuje cca 1,37 % populácie, pričom 2/3 boli z krajín Európskej únie. Z krajín mimo Európskej únie najčastejšie krajiny pôvodu sú Ukrajina, Srbsko, Rusko, Vietnam, Čína, Turecko, Sýria. Bez dokladov bolo v roku 2015 zaznamenaných 2 095 migrantov, z toho 139 podalo žiadosť o azyl (krajiny pôvodu: Sýria, Irak, Afganistan, Kosovo, Bangladéš, Somálsko, Gruzínsko, Ukrajina...), 373 dostalo odopretie vstupu, 355 podstúpilo readmisiu a vyhostených bolo 692 osôb.

Slovensko patrí medzi krajiny s veľmi dobre vybudovaným systémom záchytu prenosných ochorení a nateraz patrí medzi krajiny s menším migračným tlakom.

Do pôsobnosti ministerstva vnútra patrí Migračný úrad SR aj iné špecifické útvary pre zadržaných migrantov. Zdravotná starostlivosť žiadateľov o azyl a ich očkovanie v kompetencii Ministerstva vnútra Slovenskej republiky. Migranti sa v SR a podrobujú skriningovému vyšetreniu podľa trasy cesty a krajiny pôvodu. Žiadatelia o azyl sa v rámci azylovej procedúry dostávajú do záchytného tábora, kde obvykle strávia približne jeden mesiac v uzavretom režime. Žiadateľ je povinný absolvovať zdravotnú prehliadku a základné zdravotné vyšetrenia. U detí, pokiaľ nemajú očkovací preukaz, sa vykonáva povinné očkovanie. Pri lekárskom vyšetrení sa postupuje v zmysle Výnosu č 38. Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky vydaného v roku 2011, ktorým sa ustanovujú podrobnosti o vydávaní lekárskeho posudku, že štátny príslušník tretej krajiny netrpí chorobou, ktorá ohrozuje verejné

zdravie a zoznam chorôb ohrozujúcich verejné zdravie a v zmysle vyhlášky Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 585/2008, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o prevencii a kontrole prenosných ochorení. Proti detskej obrne a osýpkam sa očkujú deti žiadateľov o udelenie azylu, deti azylantov, deti v azylových zariadeniach a deti v detských domovoch pre maloletých bez sprievodu, ktoré na území Slovenskej republiky nesprievádza ich zákonný zástupca a ktoré nemajú záznam o platnom očkovaní.

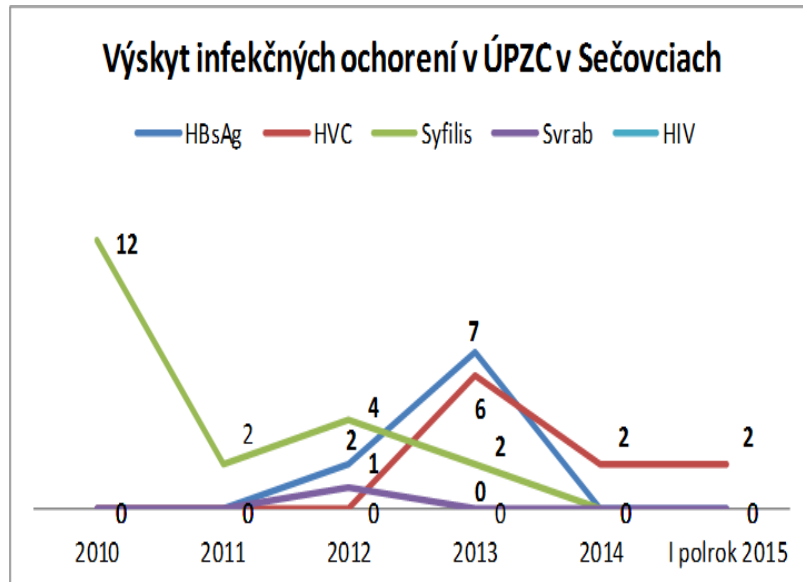


Graf 1 Vývoj jednotlivých ukazovateľov nelegálnej migrácie na území SR na mesačnej báze za obdobie: január 2017 až november 2018

Zdroj: Ministerstvo vnútra Slovenskej republiky Úrad hraničnej a cudzineckej polície, 2017-2018

Do skríningu v Slovenskej republike patrí základné lekárske vyšetrenie – podľa krajiny pôvodu a trasy cesty (žltáčka, horúčky, malária, GIT problémy, kožné defekty...); laboratórne parametre: napr. KO, glykémia, kreatinín, bilirubín, GMT, ALT, FW, VHB, HCV, BWR, moč chem., RTG hrudníka; kontrola vývoja u detí a tehotných; kontrola vakcinácie; skrínung obetí násilia a obchodovania – STD. Zdravotný stav cudzincov na teritóriu Slovenskej republiky doteraz nepredstavoval bezprostredné riziko rozširovania infekčných chorôb. V súvislosti s migrantmi je dôležité pozorne monitorovať aktuálnu situáciu a jej vývoj. Ako ukážku nášho

sledovania uvádzame graf výskytu infekčných ochorení v zariadení pre nelegálnych migrantov a v zariadení pre žiadateľov o azyl (Zákon č. 404/2011 Z. z., Berthotyová, E., 2017).



Graf 2 Výskyt infekčných ochorení v Útvare Policajného zaistenia pre cudzincov v Sečovciach v rokoch 2010 -2015

Zdroj: Migrácia a zdravie verejnosti v Slovenskej republike

Okrem sledovania ochorení u migrantov rezort Ministerstva vnútra Slovenskej republiky sleduje aj chorobnosť príslušníkov policajného a hasičského zboru, ktorí vstupujú do kontaktu s migrantmi ako prví (Zákon č. 404/2011 Z. z., Harajdič, J., 2015).

V súvislosti s výkonom služby sú príslušníci policajného zboru a zamestnanci v migračných táboroch vystavení rôznym rizikovým faktorom. Z biologických môžeme spomenúť pľúcnu formu TBC u migrantov, vírusovú hepatitídu typu A či B, HIV, syfilis, svrab, dyzentériu, rôzne endo a ektoparazitózy (Juriš, P. a kol., 2009). Na ochranu svojich príslušníkov vynakladá rezort značné finančné prostriedky na očkovanie proti hepatitíde A a B a proti kliešťovej encefalitíde. Vďaka očkovaniu a používaniu osobných ochranných pracovných prostriedkov sa nám podarilo vylúčiť tieto ochorenia ako príčinu choroby z výkonu služby. Rýchlo a efektívne reagovať na príchod veľkých skupín ľudí zo zahraničia vyžaduje efektívnu koordináciu a spoluprácu medzi krajinami a vo vnútri krajín, ako aj medzi

jednotlivými sektormi. Pripravenosť zdravotníckeho systému je potrebné zabezpečiť tvorbou adekvátnych kapacít krajiny v stredne a dlhodobom časovom horizonte, ktorá si vyžiada epidemiologické údaje a migračnú inteligenciu, starostlivé plánovanie, školenia a predovšetkým dodržiavanie zásad ľudských práv a definovaním pohotovostných scenárov, ktoré zlepšia koordináciu medzi početnými zúčastnenými zložkami pri potenciálne veľkom príleve migrantov do krajiny a pomôžu vyhnúť sa narušeniu zdravotného systému (Dudinská, D. a kol. 2018).

V rámci implementácie politiky Zdravie 2020 pre WHO/EURO región sa kladie dôraz na pružnosť odpovede zdravotných systémov na nové výzvy pri ochrane verejného zdravia, rozloženie migračnej záťaže medzi krajiny EÚ, zabezpečenie prístupu k zdravotnej starostlivosti, imunizáciu, prípravu zdravotníkov na „zabudnuté“ ochorenia a kontrolu TBC, HIV, parazitóz. Kvalitná starostlivosť pre skupiny migrantov nemôže byť zabezpečená len zdravotníckymi systémami.

Sociálne determinanty zdravia akými sú vzdelávanie, zamestnanosť, sociálne zabezpečenie a bývanie, majú významný vplyv na zdravie migrantov. Úlohou pre celú spoločnosť je zabezpečiť prístup zraniteľných skupín, ako sú malé deti, k akútnej starostlivosti pri bežných aj vážnych stavoch, zdravotnícki pracovníci by sa mali učiť rozpoznať a liečiť prenosné choroby, ktorými sa bežne nestretávajú a posilniť svoju pripravenosť na komunikáciu s cudzincami, ktorí hovoria rôznymi jazykmi a pochádzajú z rôznych kultúrnych prostredí (prostredníctvom tlmočnických služieb alebo iných prostriedkov), (Teater, B. 2010, Šustrová, M., 2012).

Prenos chorôb do populácie hostiteľskej krajiny, ktorým je možné predchádzať očkovaním, je rovnako tak pravdepodobný pri návrate obyvateľa danej krajiny z dovolenky, ako po príchode migranta z krajiny jeho pôvodu. Náležitý prístup k očkovaniu má mimoriadny význam a je jedným z cieľov Európskeho vakcinačného plánu 2015 – 2020. Plán navrhuje, aby všetky krajiny v regióne venovali osobitnú pozornosť a zaistili voliteľnosť a prístup prístupným, medzinárodným cestujúcim a marginalizovaným skupinám obyvateľstva k vhodným očkovacím službám a informáciám (Kovács, A. a kol., 2006). Na európskej úrovni nie je stanovená jednotná očkovacia stratégia pre deti migrantov. Väčšina krajín sa rozhoduje sama, akú stratégiu očkovania migrantov zvolí. Doteraz nie je k dispozícii oficiálna správa na európskej úrovni, ktorá by informovala o prehľade očkovaní momentálne prichádzajúcich migrantov do jednotlivých krajín. Európske centrum pre prevenciu a kontrolu ochorení (ECDC) vydalo správu k zabezpečeniu zdravotnej starostlivosti o migrantov, kde odporúča, aké

preventívne opatrenia by mali byť vykonávané v prijímacích centrách alebo zariadeniach, kde sa tieto osoby nachádzajú. V prijímacích centrách, ktoré registrujú migrantov, sa odporúča prvotné zhodnotenie zdravotného stavu, prípadne skrining a prvotné očkovanie. Očkovanie by sa v prípade chýbajúceho očkovania malo vykonávať podľa národných očkovacích programov. Ak osoby podstúpili určité očkovanie, má sa ďalšie očkovanie realizovať tiež v súlade s platnými národnými imunizačnými programami. Momentálne prichádzajúci migranti vo väčšine prípadov nemajú k dispozícii údaje o očkovaní. Mali by sa všetci očkovať podľa platných národných imunizačných programov. ECDC odporúča zväziť očkovanie migrantov proti infekčným ochoreniam preventabilných očkovaním ako osýpky, diftéria, čierny kašeľ, poliomyelitída, meningokokové infekcie, varicella, chrípka, vírusová hepatitída typu A alebo brušný týfus. Toto sú najčastejšie očkovaním preventabilné ochorenia, ktoré sa môžu rýchlo šíriť a spôsobovať epidémie na miestach s vyšším počtom osôb. Slovenská legislatíva nestanovuje očkovaciu stratégiu migrantov, preto na základe odporúčaní ECDC, Národného imunizačného programu v Slovenskej republike a s ohľadom na aktuálnu epidemiologickú situáciu Ústav verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (metodické usmernenie Ústav verejného zdravotníctva Slovenskej republiky č.p. OE/8169/2015 zo dňa 5. 10. 2015) odporúča očkovať deti migrantov, ktoré neboli očkované a sú vo veku 2 – 15 rokov (Zákon č. 577/2004 Z. z.).

Literatúra

1. BADE, K. J., 2005, *Evropa v pohybu: evropská migrace dvou století*, Praha, ČR, 80 s., ISBN 80-7106-559-5.
2. BERTHOTYOVÁ, E., 2017, *Pobyt cudzincov*, Trnava, SR, 223 s, ISBN 978-80-8168-729-7.
3. BEJČEK, J.M., 2016, *Úvod do práce s rodinami migrantů s udelenou mezinárodní ochranou*, C. H. Beck vydavatelství, 188 s., ISBN 978-80-7452-123-2.
4. BRNULA, P., 2008, *Sociálna práca so žiadateľmi o azyl a azylantmi*, Prešov, SR, 88 s., ISBN 978-80-89295-10-4.
5. DIVINSKÝ, B., 2005, *Zahraničná migrácia v Slovenskej republike*, 2005, Bratislava, SR, 216 s., ISBN 80-89149-04-9.

6. DUDINSKÁ, D. A kolektív, 2018, *Dilema hraníc v interdisciplinárnej perspektíve*, Prešov, SR, 147 s., ISBN 978-80-555-2051-3.
7. HARAJDÍČ, J., 2015, *Judikatúra vo veciach azylu*, vydavateľstvo Wlters Kluwer, SR, 602 s., ISBN 978-80-8168-167-7.
8. KOVÁCS, A. a kol., 2006, *Praktická sociálna práca s utečencami*, Budapešť, 246 s., Maďarská republika, ISBN 963-06-08626, 246.
9. JURÍŠ, P. A kol., 2009, *Infektológia a vyšetrovacie metódy používané vo verejnom zdravotníctve*, Košice, SR, Vydavateľstvo Harlequine, s.r.o., ISBN 978-80-89082-17-9.
10. KELLER, J., 2017, *Evropské rozpory ve světle migrace*, Praha, ČR, 227 s., ISBN 978-80-7419-249-4.
11. KRÁLIKOVÁ, K., 2012, *Aplikácia systému Schengenského acquis v oblasti starostlivosti štátnej správy o imigrantov v podmienkach SR*, GEORG, Žilina, SR, 152 s. ISBN 978-80-89401-91-8.
12. MASLEN, J., BRNULA, P., 2004, *Sociálna práca s utečencami*, Bratislava, SR, 107 s., ISBN 80-89185-06-1.
13. ŠUSTROVÁ, M., 2012, *Sociálna práca v zdravotníctve*, Bratislava, SR, 122 s., ISBN 978-80-8132-041-5.
14. TEATER, B. (2010) An introduction to applying social work theories and methods.
15. Berkshire: Open University Press. 218 p. ISBN 978-0-33-523778-4.
16. TRBOLA, R. a RÁKOCZYOVÁ, M., *Institucionální podmínky sociální integrace cizinců v ČR I.*, 2011, ISBN 978-80-87474-19-8, 184 s.
17. VARGOVÁ, D., 2006 *Fenomén utečenectva*, Bratislava, 32 s., ISBN 80-8052-269-3
18. Zákon č. 480/2002 Z. z. o azyle a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov
19. Zákon č. 404/2011 Z. z. o pobyte cudzincov a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov
20. Zákon č. 577/2004 Z. z. o rozsahu zdravotnej starostlivosti uhrádzanej na základe verejného zdravotného poistenia a o úhradách za služby súvisiace s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení.

Aktuálne problémy epidemiológie a mikrobiológie vo výskume a klinickej praxi
Zborník vedeckých príspevkov

Zostavovatelia: prof. MVDr. Monika Halánová, PhD.
Dr. h. c. prof. MUDr. Leonard Siegfried, CSc.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2024
Počet strán: 122
Rozsah: 6,8 AH
Vydanie: prvé



ISBN 978-80-574-0306-7 (e-publikácia)