

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Aneta Jalůvková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Rod *Nocardia*
Bakalářská práce

2021

Aneta Jalůvková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Aneta Jalůvková**
Osobní číslo: **C18231**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Rod *Nocardia***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte bakteriální rod *Nocardia*
2. Popište hlavní zástupce rodu *Nocardia*
3. Uveďte laboratorní diagnostiku těchto bakterií
4. Nastíňte terapii onemocnění způsobených bakteriálním rodem *Nocardia*

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Rod *Nocardia* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14.07.2021

Aneta Jalůvková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Moje velké poděkování patří paní Ing. Květě Koryčanové, Ph.D. za cenné rady, skvělou komunikaci, vstřícné jednání, trpělivost a čas strávený při vedení mé bakalářské práce. Také děkuji svému partnerovi a rodině za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací bakteriálního rodu *Nocardia* a popisu hlavních zástupců tohoto rodu. Dále jsou v práci uvedeny laboratorní metody, kterými se bakterie rodu *Nocardia* dají stanovovat. V neposlední řadě je nastíněná možná terapie a prevence onemocnění způsobených bakteriálním rodem *Nocardia* a zpracovaná statistika výskytu nokardiózy v České republice a ve světě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nocardia, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia madurae*, biochemické metody, molekulárně biologické metody, PCR, MALDI-TOF MS, nokardióza, sekvenování

TITLE

The *Nocardia* Genus

ANNOTATION

This thesis deals with the characterization of the bacterial genus *Nocardia* and the description of the main representatives of the genus. Furthermore, the work presents laboratory methods by which bacteria of the genus *Nocardia* can be determined. Last but not least, the possible therapy and prevention of diseases caused by the bacterial genus *Nocardia* along with the statistics on the incidence of nocardiosis in the Czech Republic and in the world are outlined.

KEYWORDS

Nocardia, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia madurae*, biochemical methods, molecular biological methods, PCR, MALDI-TOF MS, nocardiosis, sequencing

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	13
1 CHARAKTERISTIKA RODU	14
1.1 Morfologie	14
1.2 Onemocnění a patogeneze	15
1.3 Metabolismus.....	16
1.4 Biochemické vlastnosti	16
1.5 Ekologie	17
2 HLAVNÍ ZÁSTUPCI	19
2.1 <i>Nocardia asteroides</i>	19
2.1.1 Výskyt a přenos.....	19
2.1.2 Patogenita a faktory virulence.....	20
2.2 <i>Nocardia otitidiscaviarum (Nocardia caviae)</i>	20
2.2.1 Výskyt a přenos.....	20
2.2.2 Patogenita a faktory virulence.....	21
2.3 <i>Nocardia brasiliensis</i>	21
2.3.1 Výskyt a přenos.....	21
2.3.2 Patogenita a faktory virulence.....	22
2.4 <i>Nocardia madurae</i>	22
2.4.1 Výskyt a přenos.....	22
2.4.2 Patogenita a faktory virulence.....	22
3 DIAGNOSTIKA	23
3.1 Mikroskopický průkaz	23
3.2 Kultivace	23
3.3 Biochemické metody	24

3.4	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za přítomnosti matrice (MALDI-TOF MS)	25
3.5	Molekulárně biologické metody	26
3.5.1	Polymerázová řetězová reakce	26
3.5.2	Sekvenování genu 16S rRNA	29
3.5.3	Sekvenování genu <i>sod A</i>	29
3.6	DNA-DNA hybridizace (DDH)	30
4	TERAPIE A PREVENCE	31
4.1	Citlivost a rezistence k antimikrobiálním látkám	31
4.2	Chirurgická léčba	33
4.3	Primární a sekundární profylaxe	33
5	STATISTIKA	34
5.1	Česká republika	34
5.2	Evropa	34
5.3	USA	35
5.4	Ostatní země	35
	ZÁVĚR	37
	POUŽITÁ LITERATURA	38
	CITACE OBRÁZKŮ	49

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Edmond Nocard (Edmond Nocard, le disciple d'Alfort)	14
Obrázek 2: <i>Nocardia</i> sp.	15
Obrázek 3: kolonie <i>Nocardia nova</i>	15
Obrázek 4: Mechanismus rezistence na β -laktamová ATB.....	17
Obrázek 5: Redukce karboxylové kyseliny na aldehyd pomocí CAR.....	17
Obrázek 6: <i>Nocardia asteroides</i> na kultivačním médiu, inkubována při 37 °C.....	19
Obrázek 7: <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> na šikmém Sabouradově agaru, inkubována 3 týdny..	20
Obrázek 8: a) kolonie <i>Nocardia brasiliensis</i> na KA, b) Kinyounovo barvení, c) Gramovo barvení	21
Obrázek 9: <i>Nocardia madurae</i> – rozvětvená mycelia o průměru asi 1 μ m, zvětšení 400x	22
Obrázek 10: <i>Nocardia nova</i> , zvětšeno 2 000x, barveno na částečnou acidorezistenci podle Kinyouna, červeně zbarvená vlákna se rozpadají do kulovitých útvarů.....	23
Obrázek 11: Zleva <i>N. asteroides</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. brasiliensis</i> , kolonie plísňového vzhledu ve žlutavě béžové barvě	24
Obrázek 12: Proces hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	25
Obrázek 13: Extrakční metoda pro získání materiálu z izolátů <i>Nocardia</i>	26
Obrázek 14: Detekce DNA patogenu pomocí PCR.....	27
Tabulka 1: Profily citlivosti <i>Nocardia</i> spp. na antimikrobiální a antituberkulotická činidla detekovaná microplate Alamar Blue test	32
Graf 1: Nokardióza v USA v letech 1962-1984, data převzatá z: Reported morbidity and mortality in the United States	35

SEZNAM ZKRATEK

AIDS	syndrom získaného imunodeficitu (z angl. acquired immune deficiency syndrome)
AST	testování antimikrobiální citlivosti (z angl. antimicrobial susceptibility testing)
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
BCYE	pufrovaný uhlíkový kvasnicový extrakt (z angl. buffered charcoal yeast extract)
BMD	bujónová mikrodiluční metoda (z angl. broth microdilution method)
CARs	karboxylátreduktázy (z angl. carboxylate reductases)
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EFAE	extrakce ethanolem-kyselinou mravenčí (z angl. ethanol-formic acid extraction)
HIV	virus lidské imunodeficiency (z angl. human immunodeficiency virus)
hsp65	65-kDa protein tepelného šoku (z angl. 65-kDa heat shock protein)
MALDI-TOF	matricová laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimum inhibitory concentration)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MSM	médium minerálních solí (z angl. mineral salts medium)
<i>N.</i>	<i>Nocardia</i>
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

PRA	analýza PCR-restrikčních enzymů (z angl. PCR-restriction enzyme pattern analysis)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (z angl. ribosomal ribonucleic acid)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
SOD	superoxid dismutáza (z angl. superoxide dismutase)
sp.	druh (z angl. species)
spp.	druhy (z angl. species - plural)

ÚVOD

Mikroorganismy rodu *Nocardia* jsou grampozitivní aerobní nesporulující tyčinky, které vykazují podobnost s jinými rody bakterií. Složením buněčné stěny se podobají mykobakteriím a morfologií zase aktinomycetám. Na rozdíl od aktinomycet jsou nokardie striktně aerobní. Bakterie tohoto rodu se běžně nacházejí ve vodě a v půdě, odkud se inhalací nebo přes otevřenou ránu dostávají do lidského organismu. Na živných půdách, především na krevním a Sabouradově agaru rostou kolonie v bílých až oranžových barvách, jsou suché a nepravidelně velké. Tyto organismy pod mikroskopem vykazují vláknité větvičkové struktury, které se někdy spojují a vyvíjejí se do svazků, tzv. mycelia. Pro mikroskopické vyšetření se nejčastěji využívá sputum a hnis. Biochemické testy na katalázu a ureázu se jeví pozitivně.

Nokardie jsou původci vzácného onemocnění zvaného nokardióza, které postihuje převážně pacienty s oslabenou imunitou. Vyskytuje se u lidí i u zvířat. Toto onemocnění dělíme podle cesty přenosu na plicní, hematogenní a kožní formu. Plicní forma je nejčastější formou nokardiózy, která svým průběhem připomíná tuberkulózu. Druhy rodu *Nocardia*, které jsou odpovědné za velké procento onemocnění, jsou *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* a *Nocardia otitidiscaviarum*. V současné době rod *Nocardia* obsahuje 80-100 druhů, z nichž více než padesát je považováno za lidské nebo zvířecí patogeny.

Kultivace rodu *Nocardia* může v laboratoři trvat až měsíc. Proto je důležité, aby mikrobiologická laboratoř byla informována o podezření na diagnózu *Nocardia*, aby byla umožněna prodloužená inkubace. Identifikace se často provádí pomocí molekulárních technik (jako je polymerázová řetězová reakce) nebo pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za přítomnosti matrice (MALDI-TOF).

1 CHARAKTERISTIKA RODU

První popis bakterií rodu *Nocardia* vytvořil v roce 1888 francouzský veterinář a mikrobiolog Edmond Nocard [obr. 1], který bakterie objevil v hovězím mase. Na jeho počest byl tento rod bakterií pojmenován *Nocardia* (Lafont, 2020).

Bakterie rodu *Nocardia* patří do řádu *Actinomycetales* a čeledi *Nocardiaceae*. Svými vlastnostmi je řadíme do tzv. aerobních aktinomycet, protože ke svému růstu vyžadují kyslík (Scharfen, 2007). Termín „aktinomycete“ pochází z řečtiny a znamená „paprsková houba“ (Brown-Elliott, 2015). Nokardie se podobají ve složení buněčné stěny korynebakteriím a mykobakteriím (obsahují mykolové kyseliny), morfologicky se podobají aktinomycetám, ale na rozdíl od nich jsou nokardie striktně aerobní (Hurych, 2020). Nokardie řadíme mezi půdní organismy, které se v půdě vyskytují přirozeně a trvale, proto je můžeme označit jako autochtonní (původní). Jsou schopné rozkládat humus a charakterizují se pomalou, ale konstantní aktivitou (Tůma, 2015).

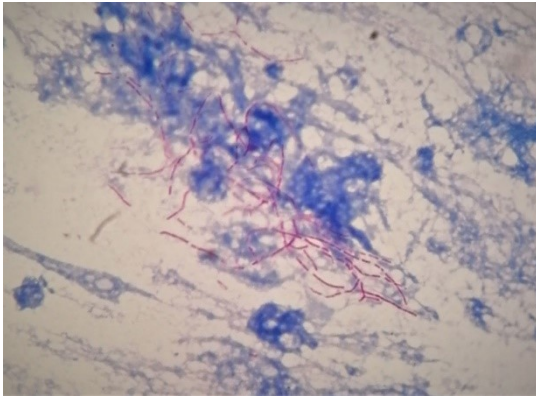


Obrázek 1: Edmond Nocard (Edmond Nocard, le disciple d'Alfort)

1.1 Morfologie

Jedná se o grampozitivní, acidorezistentní tyčinky, které rostou za přísně aerobních podmínek (Henderson, 2017). Jsou nepohyblivé a nesporulující. Pod mikroskopem jeví vláknité a rozvětvené struktury, zabarvení bakterií je modrofialové (Gramovo barvení). Při barvení dle Ziehl-Neelse pozorujeme červené přibarvení jako důkaz slabé acidorezistence [obr. 2] (Hurych, 2020). K růstu kolonií na obohaceném médiu dochází mezi 20 – 45 °C a inkubační doba se odvíjí od daného druhu nokardií a podmínek inkubace. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí několika týdnů (Mangieri, 2020). Na kultivační půdě tvoří kolonie sametový nebo práškový

vzhled, který zapříčiňuje tvorba vzdušných hyf (Brown-Elliott, 2015). Kolonie mohou být jakkoliv zbarvené, ale většina druhů *Nocardia* vytváří karotenové pigmenty, které dávají koloniím zřetelně oranžové, růžové nebo červené zbarvení [obr. 3]. Jejich povrch je zvrásněný, vyvýšený, hladký nebo zrnitý, či dokonce bradavičnatý (Pujic, 2015).



Obrázek 2: *Nocardia* sp. (Opperman, 2020)



Obrázek 3: kolonie *Nocardia nova* (Scharfen, 2007)

1.2 Onemocnění a patogeneze

Nokardie považujeme za důležité environmentální bakterie, které žijí v půdě a vodě. Odtud se do lidského organismu dostávají inhalací nebo přes otevřenou kožní ránu a způsobují infekci (Lafont, 2020). Nemoci způsobené touto bakterií se nacházejí zejména u imunosuprimovaných pacientů a jedinců se sníženou imunitou. Jedná se například o příjemce transplantovaných orgánů nebo pacienty s pokročilou infekcí HIV (Henderson, 2017). Onemocnění, které způsobují zástupci rodu *Nocardia* nazýváme nokardióza. Je velmi vzácné a jeho průběh je odlišný podle formy nemoci. Jelikož primární cestou pro všechny druhy nokardií je vdechování, nejčastější formou nokardiózy je plicní forma. Dále máme také hematogenní a kožní formu. Protože se nokardióza neprojevuje specifickými vlastnostmi, je její diagnostika náročná a je potřeba komplexní mikrobiologické zpracování. Jako nejčastějším vzorkem pro diagnostiku je využíváno sputum, bronchiální laváž, kousky tkáně a kožních lézí, či aspirát (Hurych, 2020).

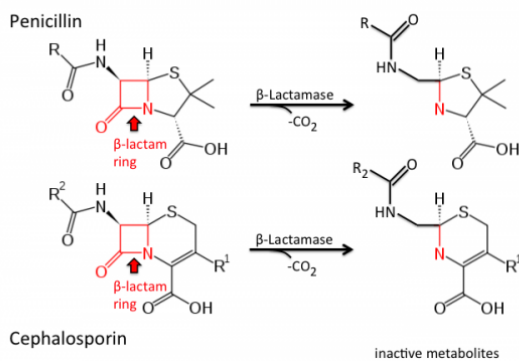
1.3 Metabolismus

Nokardie jsou chemoorganotrofní bakterie, které využívají sacharidy v oxidačním metabolismu. Děj, při kterém bakterie oxidují glukózu molekulárním kyslíkem na oxid uhličitý a vodu, nazýváme dýchání. Nokardie jsou také bakterie aerobní, jelikož pro svou existenci vyžadují vzdušný kyslík a nemohou bez něj žít (Říhová Ambrožová, 2007). Všechny druhy nokardií mohou metabolizovat širokou škálu organických molekul, dokonce i molekuly s obsahem dusíku, a využívat je jako zdroj energie. Nejčastěji ke svému růstu využívají glukózu, ale v závislosti na druhu rostou na široké škále jiných cukrů, jako je například fruktóza, laktóza, D-galaktóza, D-xylóza, sacharóza nebo maltóza. Dobrým zdrojem uhlíku pro většinu nokardií jsou některé polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), octan sodný, glutamát nebo propionát. Kromě toho jsou nokardie schopné syntetizovat všechny potřebné vitamíny a růstové faktory a získávají dusík z látek jako je amoniak, dusičnan nebo dusitan, a to buď samostatně nebo jsou součástí aminokyselin, např. kyseliny glutamové, leucinu nebo isoleucinu (Pujic, 2015).

1.4 Biochemické vlastnosti

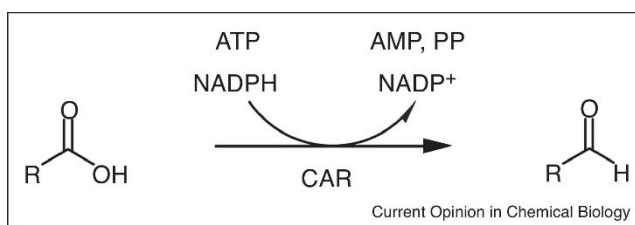
Nocardia spp. jsou potenciálními producenty enzymu L-asparaginázy, ovšem k produkci tohoto enzymu rodem *Nocardia* nemáme k dispozici mnoho informací. L-asparagináza je účinný protinádorový enzym, který katalyzuje hydrolýzu L-asparaginu na kyselinu L-asparagovou a amonný iont. Od doby kdy byl tento enzym získán z *E. coli*, byl využíván při léčbě zejména akutní lymfoblastické leukémie a jeho antineoplastická (=protinádorová) aktivita byla prokázána v séru morčat (Kavitha, 2012).

Téměř ve všech klinických izolátech *Nocardia* může být přítomný enzym β -laktamáza, ve studii Wallace et al. (1978) byla β -laktamáza detekována po použití intaktních buněk z 55 izolátů *Nocardia* u 89 % případů, a u zbytku hodnocených izolátů byl tento enzym nalezen po buněčné frakcionaci. Enzymy β -laktamázy inaktivují beta-laktamová antibiotika hydrolyzací peptidové vazby charakteristického čtyřčlenného beta-laktamového kruhu, což zapříčiňuje neúčinnost antibiotik [obr. 4]. Tyto beta-laktamové enzymy jsou rozděleny do 4 tříd (A, B, C, D) založených na sekvenční podobnosti a katalytickém mechanismu (Majiduddin, 2002).



Obrázek 4: Mechanismus rezistence na β -laktamová ATB (Whipple, 2017)

Nocardia otitidiscaviarum produkuje karboxylátreduktázy (CARs). Jedná se o skupinu jednotlivých enzymů pro jednostupňovou produkci aldehydů přímo z karboxylových kyselin. CARs jsou přírodní katalyzátory, které jsou schopné získat v jediném kroku aldehydy z karboxylových kyselin a vyhnout se tak nadměrné redukci na alkoholový produkt. Aktivují karboxylový substrát pomocí ATP a katalyzují redukční krok za použití NADPH jako donor hydridu [obr. 5] (Winkler, 2018; Weber, 2021).



Obrázek 5: Redukce karboxylové kyseliny na aldehyd pomocí CAR (Winkler, 2018)

1.5 Ekologie

V prostředí ve kterém žijeme se stále objevují nové kontaminující látky způsobené farmaceutickými výrobky, syntetickými barvivy, výrobky pro osobní péči, pesticidy apod. Tyto vznikající kontaminující látky můžeme odstranit bioremediačními metodami. Klíčovými prvky jsou mikroorganismy, zejména bakterie, které jsou všudypřítomné a jsou ideální pro produkci extracelulárních hydrolytických enzymů a ničení kontaminantů (Kumar, 2011). Ve studii Azadi et al. (2020) se zaměřili na screening a charakterizaci druhů *Nocardia* s potenciálem biologického rozkladu z různých iránských ekosystémů. Mezi izoláty nokardií, které vykazují bioremediační schopnosti, patří druhy *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asteroides* a *N. otitidiscaviarum*. U *N. farcinica* víme, že jsou schopné degradovat parafinový vosk, ropu a fenol. *N. cyriacigeorgica* degraduje PAH (polyaromatické uhlovodíky) a thymol.

N. asteroides jsou známy svou degradací ropy, gumy, polyethylenu a benzoanu sodného. Degradace PAH a ropy je také schopné *N. otitidiscaviarum*. Pro stanovení degradační kapacity PAHs vybraných izolátů, druhů *N. farcinica*, *N. kroppenstedtii* a *N. fluminea*, byl jejich růst a rychlost růstu hodnocen v kultivačním médiu MSM (Mineral Salts Medium) za přítomnosti PAH (inkubace při 30°C) měřením optické hustoty při 540 nm ve 24h intervalech. Schopnost izolace fenolu zmiňovaných druhů *Nocardia* byla zkoumána pomocí známek růstu v MSM obohaceném fenolem (inkubace opět při 30°C) a měřením absorbance vzorků odebraných ve 24h intervalech při 540 nm. Stejným způsobem se postupovalo i při zkoumání biodegradace síranu sodného. Zjistilo se, že tuto schopnost mají druhy *N. cashijiensis* a *N. sungurluensis*. Měření množství spotřeby síranu sodného u vybraných izolátů bylo provedeno turbidimetricky. V této studii dospěli k závěru, že různé druhy *Nocardia* mají pro bioremediační účely velký potenciál. Nocardie jsou schopné rozkládat polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, chlorofenoly, sulfonová azobarviva a alkany. Ačkoliv rostou pomaleji než ostatní bioremediační druhy aktinomycet, přesto v kontaminovaném prostředí výborně přežívají nepříznivé podmínky. Důležitou roli hrají mikroorganismy také při bioremediaci těžkých kovů ve vodě a znečištěných půdách. Mezi tyto geneticky modifikované organismy, které mohou redukovat různé typy těžkých kovů patří také nocardie (Verma, 2019).

2 HLAVNÍ ZÁSTUPCI

Významnými druhy rodu *Nocardia*, které nejčastěji způsobují lidskou infekci, jsou *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* a *N. brasiliensis* (Wilson, 2012). Tyto druhy se vyznačují téměř stejnou morfologií buněk a kolonií. Jedná se o grampozitivní tyčinkovité, striktně aerobní bakterie, které při Gramově barvení tvoří rozsáhle rozvětvené substrátové mycelium. Barvení bakterií dle Kinyouna naznačuje, že jejich buněčná stěna je tenká a kyselinovzdorná. Po aerobní inkubaci na krevním agaru s 5 % ovčí krve, při 35 °C a po dobu 3 dnů pozorujeme bílé kolonie s vrásčitým povrchem (Nakamura, 2017).

2.1 *Nocardia asteroides*

Kolem roku 1890 pan Eppinger ohlásil první lidskou infekci druhem *Nocardia* sp. u pacienta s mozkovým abscesem a pneumonií. Následně v roce 1896 tento mikroorganismus pan Blanchard formálně klasifikoval jako *Nocardia asteroides* (McNeil, 1994). Svůj název získaly podle hvězdicovitěho tvaru kolonií [obr. 6] (Schindler, 2014).



Obrázek 6: *Nocardia asteroides* na kultivačním médiu, inkubována při 37 °C (Kaplan, 1969)

2.1.1 Výskyt a přenos

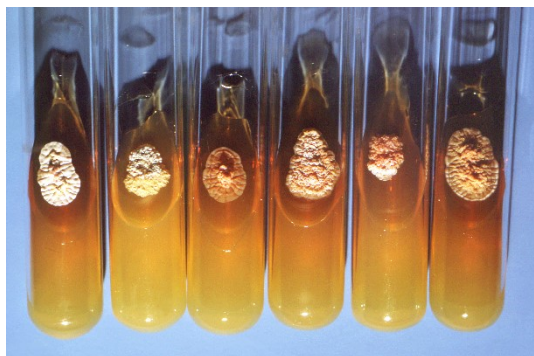
N. asteroides jsou normálně přítomné v půdě a postihují především plíce, ale také měkké tkáně a mozek u imunosuprimovaných osob po transplantaci, protinádorové chemoterapii nebo AIDS (Schindler, 2014). Dále je také můžeme nalézt ve stojaté vodě, plážovém písku, travinách, hnilých organických substrátech nebo ve vzduchu na prachových částicích. Infekci *N. asteroides* získáváme vdechováním, punkčními zraněními, nebo prostřednictvím zvířat při poškrábání (Sorichetti, 2015).

2.1.2 Patogenita a faktory virulence

Důležitým faktorem virulence u patogenní bakterie *N. asteroides* je superoxid dismutáza (SOD) – všudypřítomný antioxidační obranný metaloenzym, který katalyzuje přeměnu kyslíku na oxid uhličitý a peroxid vodíku k ochraně buněk před poškozením ionty superoxidových radikálů (Broxton, 2016). Povrchově asociovaná SOD modifikovaná u *N. asteroides* GUH-2 hraje významnou roli v odolávání mechanismům oxidačního zabíjení fagocytů. Vylučovaná, povrchově asociovaná SOD přítomná na buněčném povrchu může prokázat na těle odolnost vůči mikrobicidnímu působení oxidačních metabolitů (Hou, 2021). Je známo, že *Nocardia* způsobuje širokou škálu klinických onemocnění u lidí i zvířat, ale není prokázán přenos infekce z člověka na člověka nebo ze zvířete na zvíře. U dětí se infekce *N. asteroides* vyskytuje vzácně, první pediatrický případ sinusitidy popsal v kazuistice Sorichetti et al. (2015) po 20letém sledování pacienta. *N. asteroides* GUH-2 inhibuje fúzi fagozom-lysozom, blokuje okyselení fagozomů, je toxický pro buňky a snadno roste v mononukleárních fagocytech. Navrhovaným faktorem virulence je glykolipid trehalóza 6,6'-dimykolát (TDM) zvaný taky jako cord faktor (Itoneda, 1993).

2.2 *Nocardia otitidiscaviarum* (*Nocardia caviae*)

Nocardia otitidiscaviarum poprvé izoloval pan Snijdersem v roce 1924 ze sumaterské jeskyně. Tento druh *Nocardia* je v současné době znám pod názvem *N. otitidiscaviarum*, ačkoliv byl původně navržen název *Nocardia caviae* (Jiang, 2016).



Obrázek 7: *Nocardia otitidiscaviarum* na šikmém Sabouradově agaru, inkubována 3 týdny (Georg, 1968)

2.2.1 Výskyt a přenos

Bakterie *N. otitidiscaviarum* mohou být izolovány z půdy (Chi, 2013). Také se vyskytují stejně jako ostatní druhy nokardií ve stojaté vodě, písku, prachu a hnijícím

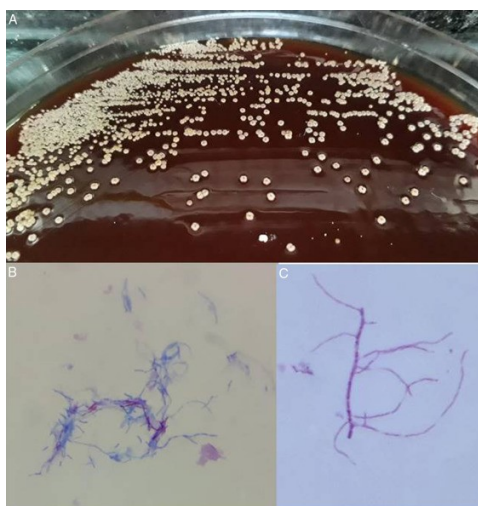
organickém substrátu (Carabelli, 2019). V letech 1979 až 1991 byla v Německu v národní referenční laboratoři izolována *Nocardia* spp. u 131 pacientů, přičemž z toho jen 8 pacientů mělo infekci způsobenou *N. otitidiscaviarum*. Nízký výskyt infekcí tohoto druhu nokardií přičítáme jejich snížené patogenitě nebo nižší prevalenci v půdě (Jiang, 2016).

2.2.2 Patogenita a faktory virulence

N. otitidiscaviarum byla ve studii Taj-Aldeen et al. (2013) nalezena ve dvou případech, a to u abscesu rohovky u imunokompetentního pacienta a těžké pneumonie u pacienta s cystickou fibrózou. Má schopnost hydrolyzovat xanthin i hypoxanthin (Ramamoorthi, 2011).

2.3 *Nocardia brasiliensis*

Nocardia brasiliensis byla poprvé izolována v roce 1909 panem Lindenbergem a popsána v roce 1959 panem Gordonem (Mangieri, 2020).



Obrázek 8: a) kolonie *Nocardia brasiliensis* na KA, b) Kinyounovo barvení, c) Gramovo barvení (Mangieri, 2020)

2.3.1 Výskyt a přenos

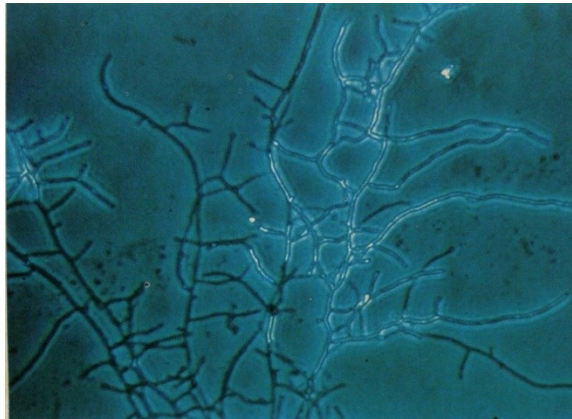
Vyskytuje se v půdách, vodě a v zahnívajících organických substrátech (Mangieri, 2020). Častěji je izolována v oblastech s tropickým a subtropickým podnebím a také způsobuje častěji infekci v jihozápadních nebo jihovýchodních Spojených státech. Kvůli vyprahlému, suchému podnebí s častými větrnými podmínkami se buňky *Nocardia brasiliensis* snadněji aerosolizují a rozptylují, ty jsou pak inhalovány a mohou u člověka způsobit kožní infekci a mycetom (Brown-Elliott, 2006). Infekce *N. brasiliensis* se často vyvíjí jako lokálně progresivní nebo invazivní infekce, která se může šířit (Lerner, 1996).

2.3.2 Patogenita a faktory virulence

N. brasiliensis není přítomna v lidském nebo zvířecím mikrobiomu, ale dokáže u nich způsobit různé patologie (Mangieri, 2020). Způsobuje onemocnění zvané aktinomycetom u lidí i zvířat. Ke zkoumání a objasnění virulence *N. brasiliensis* použili Salinas-Carmona et al. (2011) reportérový plazmid obsahující zelený fluorescenční protein (GFP).

2.4 *Nocardia madurae*

Tento druh nokardií způsobuje chronickou podkožní infekci tzv. „Madurská noha“, kterou jako první jasně popsali v roce 1842 vyšetřovatelé Gill a Colebrook (El-Zaatari, 1993). Termín „Madurská noha“ je odvozen od okresu Madura v jižní Indii (Foltz, 2004).



Obrázek 9: *Nocardia madurae* – rozvětvená mycelia o průměru asi 1 μm , zvětšení 400x (Saksun, 1978)

2.4.1 Výskyt a přenos

Nejčastěji se mohou s infekcí *N. madurae* dostat do styku lidé žijící v tropickém nebo subtropickém podnebí, konkrétně v oblastech jako je Afrika, Súdán, Indie, ale také ve Střední a Jižní Americe, Středomoří a jižní Evropě (Saksun, 1978). Onemocnění tzv. „Madurská noha“ je získáváno po styku s kontaminovanou půdou prostřednictvím poraněné kůže, nejčastěji v oblasti nohou, dolních končetin a rukou. Infekce postupuje dále do sousedních tkání nebo kostí. Mycetom se vyskytuje primárně u mužů ve věku od 20 do 40 let, pracovníků v zemědělství, dělníků a u lidí opakovaně chodících bosí (Foltz, 2004).

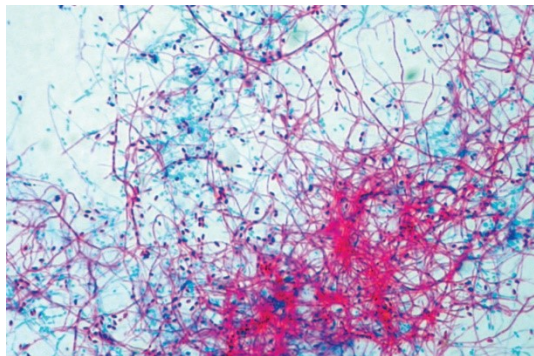
2.4.2 Patogenita a faktory virulence

Nocardia madurae jsou schopné rozkládat kasein, hypoxanthin, tyrosin a hydrolyzovat eskulin (Gordon, 1966).

3 DIAGNOSTIKA

3.1 Mikroskopický průkaz

Průkaz obarvených preparátů klinických vzorků pomocí mikroskopu je běžnou metodou pro počáteční detekci nokardií [obr. 10] (Pujic, 2015). Vyšetření nátěru obarveného dle Grama může ukázat typickou morfologii buněk organismu. U nokardií pozorujeme vláknité, rozvětvené, grampozitivní tyčinky, často také ve spojení s polymorfonukleárními leukocyty (= neutrofilní granulocyty), nebo intracelulárně v makrofázích a mononukleárních buňkách (Brown-Elliott, 2015). Všechny druhy nokardií mají buněčnou stěnu obsahující polymery arabinogalaktanu spojenými s peptidoglykanem složeným z kyseliny mesodiaminopimelové a mykolových kyselin. Jedná se o mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem. Přestože mají nokardie grampozitivní charakter, díky přítomnosti mykolových kyselin v buněčné stěně vykazují částečnou acidorezistenci. Proto se využívá barvení dle Ziehl-Neelsena, které používá koncentrovaný karbolfuchsin aplikovaný za horka. Pod mikroskopem se acidorezistentní bakterie jeví červeným zbarvením (Ozar, 2013).



Obrázek 10: *Nocardia nova*, zvětšeno 2 000x, barveno na částečnou acidorezistenci podle Kinyouna, červeně zbarvená vlákna se rozpadají do kulovitých útvarů (Scharfen, 2007)

3.2 Kultivace

Kultivace je laboratorní postup, kterým lze rozmnožovat buňky nebo tkáň. Základní kultivační technikou v mikrobiologii je množení mikroorganismů na kultivační půdě neboli médiu [obr. 11]. Média rozlišujeme podle skupenství na tekuté (bujóny) a pevné půdy (živné agary) (Hurych, 2020). Mikroorganismy rodu *Nocardia* lze kultivovat na mnoha různých rutinních médiích jako je krevní, čokoládový a Sabouraudův agar, nebo na pufrovaném extraktu z aktivního uhlí a kvasinek (BCYE). Kultury nokardií by měly být inkubovány za aerobních

podmínek obohacených 5% oxidem uhličitým ve vlhké atmosféře, aby nevysychaly. Inkubační doba za těchto podmínek se doporučuje nejlépe po dobu 14 – 21 dní při 37 °C (Lafont, 2020).



Obrázek 11: Zleva *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *N. brasiliensis*, kolonie plísňového vzhledu ve žlutavě béžové barvě (Berd, 2014)

3.3 Biochemické metody

Testování biochemické aktivity bakterií využíváme k identifikaci jednotlivých druhů po jejich úspěšné kultivaci. Druhy bakterií se od sebe liší více či méně ve své biochemické aktivitě, kterou zjišťujeme pomocí sérií testů. Výsledkem těchto testů je většinou pozitivita nebo negativita chemické reakce. U bakterií popisujeme enzymy, které produkují, přičemž těmi nejvýznamnějšími pro diagnostiku jsou kataláza, oxidáza, ureáza a koaguláza (Hurych, 2020).

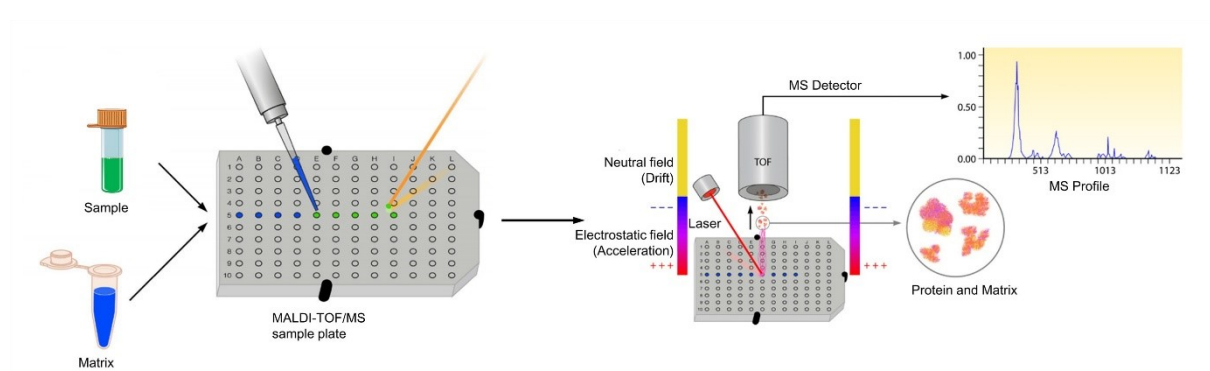
Pro rozlišení třech hlavních patogenních druhů *Nocardia*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis* a *N. otitidiscaviarum* se používají důležité biochemické testy, které zahrnují rozklad kaseinu, xanthinu, tyrosinu a hypoxanthinu. Tato metoda identifikace ale nerozlišuje tzv. komplex *Nocardia asteroides* od nepatogenních druhů *Nocardia*, nebo od druhů příbuzných rodů *Mycobacterium* a *Rhodococcus*. V minulosti samotné použití těchto několika biochemických testů vedlo k tomu, že rod *Nocardia* byl charakterizován extrémní heterogenitou neboli různorodostí (McNeil, 1994).

Identifikování druhů pomocí biochemických metod se postupně stává minulostí, jejich význam klesá a jsou nahrazovány modernějšími postupy. Podle Brown-Elliott (2015) by se neměli v laboratořích těmito metodami pokoušet identifikovat izoláty nokardií na úrovni druhů. Kvůli velkému nárůstu počtu uznaných druhů *Nocardia* za poslední dobu a nedostatku komerčně dostupných biochemikálií jsou tyto metody v podstatě zbytečné.

3.4 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za přítomnosti matrice (MALDI-TOF MS)

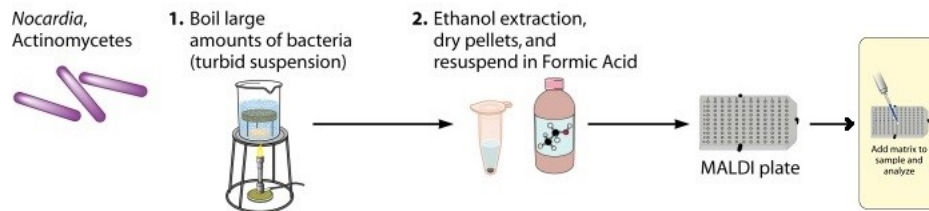
Tuto fyzikálně-chemickou metodu lze považovat v rutinní laboratoři za revoluci v identifikaci bakterií. Umožňuje identifikaci na úrovni druhu většiny grampozitivních i gramnegativních bakteriálních izolátů, zároveň je k identifikaci mikroorganismu potřeba pouze 10^5 - 10^6 buněk. Jedna analýza vzorku trvá pouze kolem 30 sekund a na jednu destičku je možné umístit 48 až 96 vzorků [obr. 12] (Schindler, 2014). Technologie MALDI-TOF má zjevné výhody v rychlé identifikaci patogenu, vysoké účinnosti produktu a také nízkých nákladů na spotřební materiály (Forero Morales, 2018).

Principem metody je analýza vysoce hojných, hlavně ribozomálních proteinů v hmotnostním rozmezí 2 000 až 20 000 Daltonů. Hmotnostní spektrum lze získat z neznámého mikroorganismu a pro zjištění pravděpodobného rodu a druhu se porovnává jeho proteomický otisk prstů s otisky v referenční spektrální databázi (Wattal, 2017). Pro poskytnutí otisků prstů se využívá například systém BioTyperTM, který umožňuje tento proces provést během několika minut (Maier, 2006).



Obrázek 12: Proces hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Clark, 2013)

Na obrázku [obr. 13] vidíme popsanou extrakční metodu pro získání materiálu pro MS materiál MALDI-TOF z izolátů *Nocardia*. Jedná se o kolonie *Nocardia* resuspendované ve vodě a povařeny, aby se podpořila buněčná lýza. Lyzát je poté centrifugován, aby se odstranily buněčné zbytky, následuje přidání ethanolu k vysrážení proteinů obsažených v supernatantu. Precipitované proteiny jsou centrifugovány, sušeny, resuspendovány v 70% kyselině mravenčí a acetonitrilu, finálně centrifugovány, překryty roztokem matrice (kyselina alfa-kyano-4-hydroxycinamová; HCCA) a poté analyzovány pomocí MALDI-TOF MS (Verroken, 2010; Clark, 2013).



Obrázek 13: Extrakční metoda pro získání materiálu z izolátů *Nocardia* (Clark, 2013)

Ve studii Segawa et al. (2015) uvádějí, že při identifikaci kyselinovzdorných bakterií, jako je rod *Nocardia* nelze získat adekvátní spektra pro identifikaci pouze za použití postupů pro obecné bakterie, a to kvůli přítomnosti kyseliny mykolové v buněčné stěně bakterií. Někdy pro hodnocení izolátů *Nocardia* nelze získat hmotnostní spektra dostatečné intenzity vůbec. Aby těmto problémům předešli a zlepšili přesnost identifikace *Nocardia*, vyvinuli v uvedené studii novou metodu bakteriální extrakce, založenou na metodě extrakce ethanol-kyselinou mravenčí (EFAE) s přidáním kuliček oxidu křemičitého. Po zavedení nové metody bylo na úrovni druhů identifikováno 90,6 % izolátů, kdežto před zavedením této metody se jednalo pouze o 15,6 %.

Zdá se, že MALDI-TOF MS nemá dostatečnou diskriminační schopnost rozlišit všechny druhy nokardií patřících do různých fylogenetických subtypů. Chybná identifikace některých druhů může vést ke špatnému zacházení s pacientem, protože tyto druhy nemusí vždy vykazovat stejné profily antibiotik. Platí to zejména pro komplex *N. abscessus*, do kterého patří druhy *N. beijingensis*, *N. asiatica*, *N. abscessus* a *N. arthritidis*, protože *N. beijingensis* a *N. asiatica* jsou obvykle citlivé na antibiotikum Imipenem na rozdíl od *N. abscessus* a *N. arthritidis* které jsou na Imipenem obecně odolné (Durand, 2020).

3.5 Molekulárně biologické metody

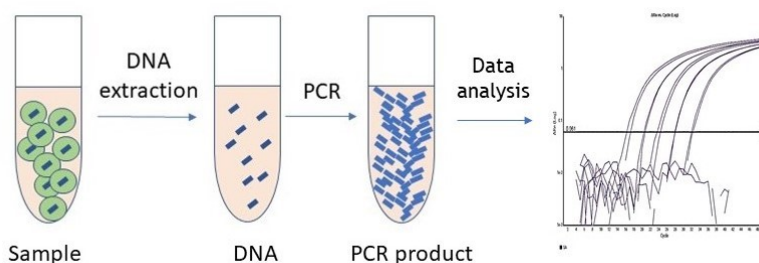
Molekulárně biologické metody byly vyvinuty v 90. letech (Rodriguez-Nava, 2006). Identifikace mikroorganismů založené na molekulárních metodách se využívají převážně ve specializovaných laboratořích (Mangieri, 2020). Genové sekvenování se stalo nejpřesnější metodou pro definitivní identifikaci *Nocardia* na úrovni druhů (Conville, 2018).

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Jednou z prvních molekulárně biologických technik, které se použily k identifikaci a pro charakterizaci druhů *Nocardia* byla samotná PCR (polymerázová řetězová reakce) nebo v kombinaci s jinými metodami molekulární analýzy, jako je PRA (PCR-restriction enzyme

pattern analysis) a RFLP-PCR. Tyto techniky zahrnují PCR amplifikaci 65-kDa heat shock proteins (protein tepelného šoku) genu 16S rRNA nebo genu *hsp65* a následné štěpení specifickými restrikčními endonukleázami pro každý gen (Eshraghi, 2012). PCR-RFLP analýza 65-kDa heat shock proteins genu může být užitečná pro stanovení patogenu *N. asteroides* v různých populačních skupinách a v jejich souvislosti rezistence na léky při volbě nejvhodnější léčby (Armas, 2015). Metoda PCR založená na detekci genu 16S rRNA je schopná rozlišit rod *Nocardia* mezi aerobními aktinomycetami (Rodriguez-Nava, 2006).

Princip metody PCR se opírá o znalost alespoň částečných sekvencí cílové DNA. Jedná se o enzymy řízený proces pro amplifikaci krátkých úseků DNA *in vitro*. Cílová DNA je kopírována termostabilním enzymem DNA polymerázou v přítomnosti nukleotidů a primerů [obr. 14]. PCR metoda má teoreticky potenciál generovat miliardy kopií DNA z jedné kopie za méně než 1 hodinu (Yang, 2004).



Obrázek 14: Detekce DNA patogenu pomocí PCR (Burns, 2020)

Pro identifikaci izolátů *Nocardia* použili Armas et al. (2015) metodu PCR-RFLP a postupovali takto: po úspěšné izolaci DNA *Nocardia* byl amplifikován segment 439-bp genu *hsp65* v 50 μ l PCR reakční směsi, k tomu přidáno 0,5 μ l od každého primeru (TB11, 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') a (TB12, 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') a 5 μ l extrahované DNA. Reakce proběhla ve 40 cyklech (denaturace při 94 $^{\circ}$ C, amplifikace při 60 $^{\circ}$ C a extenze při 72 $^{\circ}$ C) přičemž finální extenze proběhla při 72 $^{\circ}$ C po dobu 10 minut. PCR produkty byly separovány agarózovou elektroforézou s ethidium bromidem a vizualizovány pod UV světlem.

Ve studii Azadi et al. (2020) byly izoláty *Nocardia* ověřeny na úrovni druhů pomocí PCR založené na 596-bp oblasti 16S rRNA. Pro identifikaci druhů byla provedena amplifikace a přímá analýza sekvence 16S rRNA genu. Sekvenování bylo provedeno ve společnosti Bioneer Company a získané sekvence byly ručně srovnány se všemi existujícími sekvencemi blízce příbuzného mikroorganismu získaného z databáze GenBank. Při výběru primeru postupovali

podle studie Laurent (1999), kdy výsledky sekvencí umožnily návrh dvou primerů specifických pro rod *Nocardia*: přední primer NG1 (5'-ACCGACCACAAGGGG-3') a reverzní primer NG2 (5'-GGTTGTAACCTCTTCGA-3'). Podmínky pro samotnou PCR byly následující: po počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 11 minut byla reakční směs podrobena 30 cyklům reakce (denaturace při 94 °C po dobu 1 minuty, amplifikace při 55 °C po dobu 20 sekund a extenze při 72 °C také po dobu 1 minuty). Po těchto cyklech následovala finální inkubace po dobu 10 minut při 72 °C. Vzorky byly analyzovány (2%) agarózovou elektroforézou v horizontálním uspořádání na 2 hodiny při 100 V v Tris-Acetát-EDTA pufru. Pro lepší detekci separovaných molekul bylo přidáno interkalační barvivo – ethidium bromid.

Pro zkoumání genové exprese je velmi užitečná kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), zvaná taky jako PCR v reálném čase (RT-PCR), protože umožňuje určit množství produktu PCR v reálném čase. Nespoléhá se na žádnou následnou analýzu, jako je elektroforéza nebo denzitometrie, a je velice univerzální (Maddocks, 2017).

Princip metody RT-PCR spočívá v monitorování akumulace amplikonů PCR v reálném čase měřením změny v emisi fluorescence z fluorescenčních barviv vázajících DNA, ze specifických fluorescenčně značených primerů, nebo sond přidaných k PCR (Löfström, 2015).

Jako fluorescenční barvy se používají barviva SYBR Green a pro měření zesíleného barevného produktu v reálném čase se používají DNA sondy obsahující fluorofor, např. TaqMan (Rahman, 2014). Prvním fluorescenčním barvivem vázajícím DNA použitým pro real-time PCR byl ethidiumbromid, ale od té doby byla použita celá řada méně toxických barviv se zlepšenými fluorescenčními vlastnostmi. Mezi nimi je stále nejrozšířenější SYBR Green I. Toto barvivo se váže pouze na molekuly dvouvláknové DNA a uvolňuje fluorescenci úměrně k množství akumulovaného PCR amplikonu (Löfström, 2015).

Pro amplifikaci a detekci 16S rDNA genu *Nocardia* spp. pomocí real-time PCR můžeme také použít komerční soupravu BactoReal® Kit. Tato sada společnosti Ingenetix GmbH se skládá ze zkušební směsi pro detekci patogenu, pozitivní kontroly a vnitřní pozitivní kontroly. Umožňuje rychlou a citlivou detekci genu 16S rDNA z *Nocardia* spp. z DNA vzorků purifikovaných z biopsie, krve, mléka apod. (Korschineck, 2016).

3.5.2 Sekvenování genu 16S rRNA

V dnešní době je tato metoda nejvíce používaná pro rychlou identifikaci většiny druhů rodu *Nocardia*. K identifikaci většiny patogenních druhů *Nocardia* stačilo prvních 500 nukleotidů na 5' konci, jak odhalila analýza celého genu 16S rRNA (Pujic, 2015). Potenciálním využitím 16S rRNA genové sekvence je poskytnout rodovou a druhovou identifikaci izolátů, které nevyhovují žádnému uznávanému biochemickému profilu, pro kmeny vytvářející pouze „nízkou pravděpodobnost“ nebo „přijatelnou“ identifikaci podle komerčních systémů, které jsou zřídka spojeny s infekčními chorobami lidí (Janda, 2007).

16S ribozomální RNA je složka malé podjednotky 30S prokaryotického ribozomu. Bakteriální gen 16S rRNA obsahuje 9 hypervariabilních oblastí v rozmezí od 30 do 100 párů bází. Sekvenování tohoto genu je široce využíváno, vzhledem k tomu, že je uložen v bakteriích a obsahuje hypervariabilní oblasti, které mohou poskytovat druhově specifické sekvence. Navíc se sekvenování genu 16S rRNA vyznačuje vysokou rychlostí, přesností a nákladovou efektivností (Case, 2007; Yang, 2016).

Sekvenování genu 16S rRNA je vhodnou metodou pro stanovení fylogenetických vztahů a procentuální podobnosti druhů *Nocardia* (Rasouli Nasab, 2018). Sekvenční analýza ribozomálního RNA genu 16S se k identifikaci izolátů *Nocardia* na úrovni druhu používá stále častěji, protože přímé vyšetření, vyšetření kultury a klasické laboratorní metody jsou nedostatečné (Taj-Aldeen, 2013).

3.5.3 Sekvenování genu *sod A*

Gen *sod A* je gen kódující enzym superoxid dismutázu a využívá se pro identifikaci a diferenciaci klinických a environmentálních izolátů na úrovni druhů rodu *Nocardia*, a také pro vyhodnocení jejich účinnosti. Ve studii Sánchez-Herrera (2017) prozkoumávali polymorfismus genu *sod A* u rodu *Nocardia*, využili k tomu 41 kmenů tohoto rodu z mezinárodních sbírek. Po extrakci a izolaci mikrobiální DNA provedli amplifikaci 440 bp fragmentu genu *sod A* a sekvenování pomocí primerů SodV1 (5'-CACCAIWWSAAGCAC CA-3') a SodV2 (5'-CCTTAGCGTTCTGGTACT G-3'), kde Y = C nebo T, W = A nebo T a S = C nebo G (0,6 μ M). Amplifikaci provedly v PCR zkumavkách za použití obou primerů a zahrnovala počáteční denaturační krok při 94 °C po dobu 5 minut. Poté následovalo 35 cyklů reakce (extenze při 72 °C a amplifikace při 55 °C po dobu 60 sekund pro obě teploty) a závěrečná extenze proběhla při 72 °C v délce 10 minut. Získané sekvence byly ověřeny v obou směrech sekvenováním DNA. Tato studie uvádí, že polymorfismus pozorovaný v sekvenci

genu *sod A* obsahuje variabilní oblasti, které umožňují diskriminaci blízce příbuzných druhů *Nocardia*. Závěrem bylo možné říct, že jasná specifita genu *sod A* se jeví jako velká výhoda pro použití v taxonomických studiích a tento gen by mohl být užitečný pro klinické diagnózy rodu *Nocardia*.

3.6 DNA-DNA hybridizace (DDH)

Tato technika je založena na hrubém srovnání celých genomů mezi různými organismy za účelem zjištění jejich celkových genomických podobností. Používá se jako zlatý standard pro číselný popis druhů v klasifikaci prokaryot (Rosselló-Móra, 2011).

Zohlednění genetických a genomických vlastností umožňuje hlubší rozlišení diference, přičemž hybridizace DNA-DNA je v klíčové pozici jako hlavní nástroj při vymezení mikrobiálních druhů (Auch, 2010). Genetická definice druhu je kvantifikovatelná na základě kinetiky reasociace DNA-DNA. Testy hybridizace DNA nejsou bez nedostatků, jsou časově náročné, nákladné a pracné (Janda, 2007). Dnes je provádí stále méně laboratoří po celém světě, přestože se rozsáhle využívaly data a přístupy DNA-DNA hybridizace, byly často kritizovány kvůli jejich vysoké experimentální chybě a neschopnosti generovat souhrnné databáze. Vědci se snažili nahradit metodiku DDH jinými přesnějšími a reprodukovatelnějšími technikami, jako je například multilokusová sekvenční analýza (MLSA), která je založená na sekvenčních analýzách housekeeping genů a měření průměrné nukleotidové identity na základě porovnání genomu s genomem ortologních genů. Avšak data DNA-DNA hybridizace stále zůstávají jako jeden z hlavních parametrů při popisu druhů bakterií (Rosselló-Móra, 2011).

4 TERAPIE A PREVENCE

Výskyt nokardiózy se po celém světě v posledních desetiletích zvyšuje, a to díky pokroku v kultivaci a zdokonalení diagnostiky pomocí molekulárně biologických metod. Kvůli tomu jsou v současné době infekce způsobené nokardiami problémem, který nelze ignorovat. Úmrtnost na nokardiózu klesla ve chvíli, kdy se do léčby zavedly sulfonamidy. Současná míra vyléčení se pohybuje u mozkového abscesu do 50 %, do 90 % u plicní formy infekce a téměř ve 100 % u infekce kůže a měkkých tkání (Wei, 2017). Antimikrobiální terapie pro *N. asteroides* je dlouhodobá a může zahrnovat léčbu trimethoprim-sulfamethoxazolem, minocyklinem, amoxicilin-kyselinou klavulanovou, cefuroximem, cefalosporiny třetí generace, amikacinem nebo imipenem (Sorichetti, 2015). Léčba diseminované nokardiózy vyžaduje kombinovanou systémovou antimikrobiální terapii vedenou po delší časový úsek. V současné době nejsou k dispozici žádné prospektivní studie, které by vedly k účinné terapii. U závažných sekundárních infekcí *N. otitidiscaviarum* je zpočátku doporučována kombinovaná léčba linezolidem, amikacinem a trimethoprim-sulfamethoxazolem, dokud z laboratoře nedorazí výsledky citlivosti na antibiotika (Zheng, 2019). Díky své pomalé replikaci a intracelulární kryptické přítomnosti má *Nocardia* tendenci k relapsu. Proto je nutná prodloužená antimikrobiální léčba po dobu několika týdnů až několika měsíců (Duggal, 2020). Délka léčby závisí na závažnosti případu, klinické formě nokardiózy a imunosupresivním stavu. U viscerálních a diseminovaných forem je z velké části předepsána léčba trvající od 6 do 12 měsíců. Infekcí nokardie jsou nejvíce postiženi pacienti po transplantaci, s chronickým plicním onemocněním, pacienti s malignitou a pacienti dlouhodobě léčení steroidy (Haussaire, 2017). Stává se, že příjemcům transplantátu, kterým je podáván trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT), musí být léčba pozastavena nebo změněna dávka léku kvůli útlumu kostní dřeně nebo renální dysfunkci (Goodlet, 2021). Nokardióza je často chybně léčena antituberkulotickými antibiotiky, protože má stejné příznaky jako tuberkulóza (Zhao, 2017).

4.1 Citlivost a rezistence k antimikrobiálním látkám

Stanovení optimální léčby nokardiózy je obtížné z důvodu nedostatku prospektivních a srovnávacích klinických údajů, proto se většina v současnosti navrhovaných režimů antibiotik spoléhá na mikrobiologické údaje, včetně identifikaci druhů a testování antimikrobiální citlivosti (AST) (Lebeaux, 2019). Pro empirickou léčbu infekce vhodným antibiotikem je zásadní identifikace *Nocardia* na úrovni druhu, vzhledem k různorodosti antimikrobiálních citlivostí spojených s tímto rodem (Mehta, 2020). Studie Zhao et al. (2017) uvádí, že tradiční

metody pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) jako jsou E-test, disková difúzní metoda nebo test na bázi bujónové mikrodiluční metody (BMD) nejsou dostačující a místo nich pro zjištění MIC 32 antimikrobiálních látek proti *Nocardia* spp. použili microplate Alamar Blue test, který je přesnější, rychlejší a stabilnější než zmiňované metody BMD a E-test. Klinická terapie by měla být založena na testování citlivosti léků na izoláty *Nocardia* [tab. 1]. Jenomže její vývoj omezily nedostatečné informace o identifikaci klinické *Nocardia* spp. a antimikrobiální citlivosti po celém světě, a zejména v Číně (Wei, 2017).

Tabulka 1: Profily citlivosti *Nocardia* spp. na antimikrobiální a antituberkulotická činidla detekovaná microplate Alamar Blue test (Zhao, 2017)

ATB	<i>N. asteroides</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>
Ampicillin	R	R	R
Amikacin	S	S	S
Amoxicillin-clavulanic acid	R	S	R
Azithromycin	R	-	R
Ceftriaxone	S	-	R
Cefepime	R	R	R
Cefotaxime	S	-	R
Cefmetazole	-	-	R
Ciprofloxacin	R	R	R
Clarithromycin	R	R	R
Clofazimine	-	S	-
Doxycycline	-	R	S
Ethambutol	R	R	R
Gentamicin	S	S	-
Imipenem	S	R	R
Isoniazid	R	R	R
Kanamycin	-	R	S
Levofloxacin	-	R	-
Linezolid	S	S	S
Meropenem	S	-	-
Minocycline	S	-	-
Moxifloxacin	S	S	S
Ofloxacin	-	R	R
Rifampicin	R	R	R
Streptomycin	-	R	R
Sulfamethoxazole	-	-	R
Tobramycin	-	S	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	S	S	S
Vancomycin	R	R	R

Legenda: S – citlivý, R – rezistentní

Úplně první komplexní studii o hodnocení klinických rysů, identifikace druhů a profilů citlivosti na antibiotika *Nocardia* v Číně provedli Huang et. al (2019) v letech 2009 až 2017. Nasbírali 53 klinických izolátů druhů *Nocardia* z osmi nemocnic v sedmi čínských městech a byla nahlášena citlivost na deset běžně používaných ATB pro nokardie. Testování citlivosti na antibiotika bylo provedeno pomocí E-testu tímto postupem: kolonie identifikovaných izolátů (pomocí sekvenování celé délky genu 16S rRNA, *hsp 65*, genu *secA1*, *rpoB* a *GyrB* genu) rostoucích na krevním agaru byly přeneseny do 0,9% vody s NaCl a poté podrobeny opakovanému víření. Supernatant byl upraven na zákal 1,0 podle McFarlandovy stupnice. Poté byly vzorky rozprostřeny na Petriho misky s Muller-Hintonovým krevním agarem a po 48-72 hodinách inkubace při 35 °C byly stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace, kdy MIC byla definována jako hodnota, při které inhibiční zóna zachytila měřítko na proužku E-testu. Údaje MIC každého antibiotika byly zaznamenány a analyzovány softwarem Whonet 5.6 a byly také vypočítány hodnoty MIC₅₀ a MIC₉₀. Všech 53 izolátů bylo citlivých na linezolid, z toho asi 90,6 % druhů bylo citlivých také na imipenem a 92,5 % druhů na amikacin. Rezistentní vůči trimethoprim-sulfamethoxazolu bylo 25 % izolátů nokardií, ale největší míra rezistence byla zaznamenána u *N. farcinica*, a to na gentamicin, cefepim, ceftriaxon a trimethoprim-sulfamethoxazol.

4.2 Chirurgická léčba

Léčba nokardiózy často vyžaduje lékařský a chirurgický zákrok (Haussaire, 2017). Operace by měla být provedena u pacientů s mozkovými abscesy, pokud jsou dobře přístupné a relativně velké. Terapeutická aspirace je obecně nedostatečná u pacientů se silnými mnohožliskovými abscesy, které obsahují volně tekoucí hnis, včetně pacientů s mycetomy (Corti, 2003). Pacienti léčení kombinací antibiotik a neurochirurgických zákroků mají větší šanci na přežití (Margalit, 2021).

4.3 Primární a sekundární profylaxe

Pacientům s transplantací orgánů se jako prevence před infekcí nokardií podává trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT), který má ochranný účinek a může snížit závažnost infekce (Hemmersbach-Miller, 2018). U imunokompetentních pacientů není sekundární profylaxe podporována, vzhledem k nízkému riziku reinfekce po vhodné léčbě nokardiózy. U jedinců s trvalou imunosupresí lze uvažovat o sekundární profylaxi, ale nízkodávkovaný SXT v prevenci nokardiózy není účinný (Margalit, 2021).

5 STATISTIKA

Nokardióza je onemocnění celosvětového významu. Ročně je hlášeno 500 až 1000 případů v USA a 90 až 130 případů v Itálii. Vyskytuje se i v jiných částech světa, včetně tropických oblastí, jako je Indie, Pákistán, Írán, ale také v Kanadě, Španělsku a Austrálii. Výskyt nokardiózy každým rokem stoupá především z důvodu lepší informovanosti, nárůstu populace a pacientů se sníženou imunitou (Duggal, 2020). Přesto ale neexistují žádné oficiální statistiky, jako tomu je u jiných infekcí. Ani v České republice nejsou vedeny statistiky o nokardióze Státním zdravotním ústavem. Představu o míře výskytu infekce nokardiami ve světě a v ČR si můžeme vytvořit pomocí kazuistik, dostupných ve veřejných databázích.

5.1 Česká republika

V letech 2008-2009 byly zaznamenány dvě kazuistiky nokardiových mozkových abscesů (Plíšek, 2011). V roce 2009 byly vydány další dvě kazuistiky, jednalo se o první izolaci *N. transvalensis* v ČR z abscesu mozku u pacienta po transplantaci ledvin a o izolaci *N. farnicia* u imunosuprimovaného pacienta, taktéž z abscesu mozku (Scharfen ml., 2009; Scharfen ml., 2009). V roce 2017 byl publikován článek o plicní nokardióze u geriatrické pacientky (Kadlecová, 2017). Při procházení systémem Medvik (Medicínská virtuální knihovna) bylo zjištěno, že v České republice jsou známy jen desítky případů během 50 let (1968-2018), jedná se přibližně o 30 článků, které uvádějí záznamy o nokardióze.

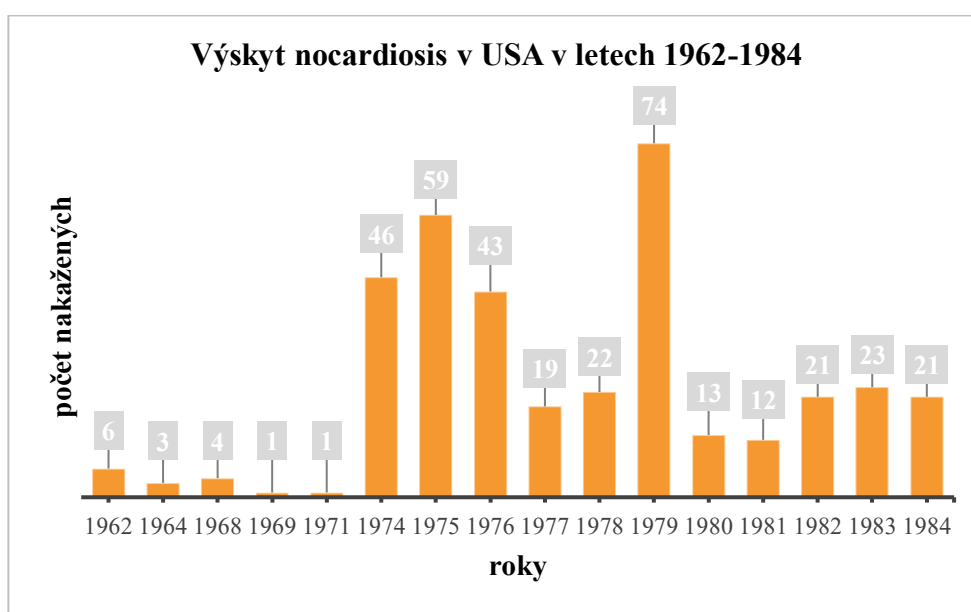
5.2 Evropa

Do retrospektivní studie Ott et al. (2019) bylo zařazeno 43 pacientů z 11 nemocnic ve 4 zemích: Německo, Rakousko, Švýcarsko, Nizozemsko, kterým byla diagnostikována plicní nokardióza v letech 1995-2011. Většina pacientů byla identifikována v Německu (n= 22), následovalo Rakousko (n= 13), poté Švýcarsko (n= 6) a Nizozemsko (n= 2). Dále víme, že od roku 2005 do roku 2011 bylo v Německu celkově hospitalizováno 266 pacientů s plicní nokardiózou jako primární nebo sekundární diagnózou. V italské nemocnici terciární péče bylo podle retrospektivní studie Mazzaferri et al. (2018) v období od roku 2011 do roku 2015 izolována *Nocardia* ve 26 případech. Do studie bylo zahrnuto pouze 14 pacientů, protože zbylých 12 bylo považováno za kolonizované, tedy vyloučené ze studie. Během období 2004-2014 bylo analyzováno 41 pacientů infikovaných *Nocardia* spp. ve fakultních nemocnicích v Marseille, ale jen pro 34 z nich byly k dispozici lékařské záznamy (Hausaire, 2017).

Ve fakultní nemocnici v severním Španělsku byla provedena studie v letech 1992-2014, kdy bylo celkem získáno 253 izolátů *Nocardia* spp. od 179 pacientů (Ercibengoa, 2016).

5.3 USA

Pomocí časopisu „Reported morbidity and mortality in the United States“ z Centra pro kontrolu nemocí (1986) bylo zjištěno, že v letech 1962-1984 se v USA zaznamenalo 368 případů nocardiosis [graf 1]. Vyskytovaly se v různém zastoupení v 18 státech Spojených států amerických (Rare Disease Database, 2021). Článek Rawat et al. (2021) uvádí, že ve Spojených státech je každým rokem diagnostikováno přibližně 500 až 1000 nových případů infekce nokardiózy.



Graf 1: Nokardióza v USA v letech 1962-1984, data převzatá z: Reported morbidity and mortality in the United States (1986)

5.4 Ostatní země

V Číně proběhla retrospektivní studie, do které bylo zahrnuto 11 pacientů s nokardiózou během pětiletého období od roku 2013 do roku 2018. Byly přezkoumány demografické údaje, klinické projevy, radiologické vyšetření, léčba a výsledky pacientů. Jednalo se o sedm mužů a čtyři ženy s průměrným věkem 42 let (Li, 2021). Další retrospektivní analýzu uvádí studie Weheba et al. (2021) v Saudské Arábii v letech 2004 až 2018. Nokardióza byla diagnostikována 35 pacientům a v 90 % případů se jednalo o plicní nokardiózu.

Studie provedena v centru terciární péče v Indii (Uttarakhand) popisuje pět kazuistik s plicní nokardiózou u imunosuprimovaných pacientů. Nejběžnějšími stavy způsobujícími imunosupresi byly Diabetes mellitus II. typu, chronická obstrukční plicní nemoc a plicní tuberkulóza (Mohanty, 2020). V Austrálii (Melbourne) bylo izolováno 68 neduplicitních izolátů *Nocardia* od 67 pacientů v letech 2010-2016. Nejčastějším izolovaným druhem byla *Nocardia nova* (Paige, 2019).

ZÁVĚR

Mikroorganismy rodu *Nocardia* jsou grampozitivní, striktně aerobní, tyčinkovité bakterie, které nevykazují pohyb a jsou částečně acidorezistentní. Nalézáme je po celém světě jako saprofytickou složku normální půdní mikroflóry, vody, prachu a vzduchu. Jsou patogenní pro lidi i zvířata a do těla se mohou dostat vdechováním kontaminovaných prachových částic nebo ranami kontaminovanými prachem nebo půdou. Způsobují lokalizované nebo diseminované infekce plic, CNS a kožní infekce u imunokompetentních a imunosupresivních pacientů. Onemocnění, za které jsou nokardie zodpovědné, nazýváme nokardióza. Nejčastěji uváděnými druhy jsou *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* a *Nocardia otitidiscaviarum*. Plicní formu nokardiózy způsobuje převážně druh *N. asteroides*, naopak *N. brasiliensis* je často původcem kožních nemocí (aktinomycetomů). Zajímavým druhem je *Nocardia madurae*, který způsobuje onemocnění tzv. „Madurská noha“ vyskytující se převážně u lidí chodících bosí, v tropickém nebo subtropickém podnebí.

Základním vyšetřením pro odhalení bakterií rodu *Nocardia* je mikroskopický průkaz z klinického materiálu, kultivace a určení druhů molekulárně biologickými metodami. Laboratorní diagnostika je důležitá hlavně při identifikaci bakterií na úrovni druhu a hraje velkou roli při léčbě nokardiózy. K rychlé detekci nokardií nám pomůžou molekulárně biologické metody, jako je sekvenování genu 16S rRNA a genu *sod A* nebo DNA-DNA hybridizace. Prosazují se také metody PCR-RFLP a MALDI-TOF MS.

Identifikace na úrovni druhu je zásadní také pro léčbu infekce vhodným antibiotikem, vzhledem k různorodosti antimikrobiálních citlivostí spojených s rodem *Nocardia*. Nejčastější skupinou antibiotik pro léčbu nokardiózy jsou sulfonamidy. Délka léčby závisí na závažnosti případu, klinické formě nokardiózy a imunosupresivním stavu. U diseminovaných forem je z velké části předepsána léčba trvající od 6 do 12 měsíců. Léčba nokardiózy často vyžaduje chirurgický zákrok. Měl by být prováděn hlavně u pacientů s mozkovými abscesy. Pro prevenci před infekcí je pacientům s transplantací orgánů podáván trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT), který má ochranný účinek a může snížit závažnost infekce.

Výskyt nokardiózy každým rokem stoupá, především díky lepší informovanosti, vyspělejší diagnostiky a většímu nárůstu pacientů se sníženou imunitou. V USA je ročně hlášeno 500-1000 případů nokardiózy, v České republice je to jen pár desítek během posledních 50 let (1968-2018). V rámci Evropy se nokardióza vyskytuje nejčastěji v Itálii, Španělsku, Německu a Rakousku.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ARMAS, Y., C. FERNÁNDEZ, R. DÍAZ, N. STEFANO, G. WISSMANN a E. CALDERÓN, 2015. PCR-RFLP Methodology to Identify *Nocardia* Isolates in Cuba. *Advances in Microbiology*. **05**(10), 724-729. ISSN 2165-3402. Dostupné z: doi:10.4236/aim.2015.510076
2. AUCH, A. F., M. VON JAN, H. P. KLENK a M. GÖKER, 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*. **2**(1), 117-134. ISSN 1944-3277. Dostupné z: doi:10.4056/sigs.531120
3. AZADI, D. a H. SHOJAEI, 2020. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by *Nocardia* species isolated and characterized from Iranian ecosystems. *Scientific Reports*. **10**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-78821-1
4. BERD, D., 2014. Public Health Image Library (PHIL). In: *Centers for Disease Control and Prevention*. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=18858>
5. BROWN-ELLIOTT, B., J. BROWN, P. CONVILLE a R. WALLACE, 2006. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. **19**(2), 259-282. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.19.2.259-282.2006
6. BROWN-ELLIOTT, B., P. CONVILLE a R. WALLACE, 2015. Current Status of *Nocardia* Taxonomy and Recommended Identification Methods. *Clinical Microbiology Newsletter*. **37**(4), 25-32. ISSN 01964399. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinmicnews.2015.01.007
7. BROXTON, Ch., V. CULOTTA a D. SHEPPARD, 2016. SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. *PLOS Pathogens*. **12**(1). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1005295
8. BURNS, L., 2020. Pathogen Detection by DNA. In: *Cicadea Biotech, LLC*. St. Louis [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://cicadeabiotech.com/pathogen-detection-by-dna/>

- 9 . CARABELLI, T., V. RONDA a K. MORENO, 2019. *Nocardia otitidiscaviarum* Infection in an Immunocompetent Patient. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*. **55**(1), 59-60. ISSN 1579-2129. Dostupné z: doi:10.1016/j.arbr.2018.11.004
- 1 0 . CASE, R., Y. BOUCHER, I. DAHLLÖF, C. HOLMSTRÖM, W. DOOLITTLE a S. KJELLEBERG, 2007. Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(1), 278-288. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01177-06
- 1 1 . CLARK, A., E. KALETA, A. ARORA a D. WOLK, 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**(3), 547-603. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00072-12
- 1 2 . CONVILLE, P., B. BROWN-ELLIOTT, T. SMITH, A. ZELAZNY a C. KRAFT, 2018. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. **56**(1), 01419-17. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01419-17
- 1 3 . CORTI, M. E. a M. E. VILLAFañE FIOTI, 2003. Nocardiosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*. **7**(4), 243-250. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/S1201-9712(03)90102-0
- 1 4 . DUGGAL, S. D. a T. D. CHUGH, 2020. Nocardiosis: A Neglected Disease. *Medical Principles and Practice*. **29**(6), 514-523. ISSN 1011-7571. Dostupné z: doi:10.1159/000508717
- 1 5 . DURAND, T., F. VAUTRIN, E. BERGERON et al., 2020. Assessment of VITEK® MS IVD database V3.0 for identification of *Nocardia* spp. using two culture media and comparing direct smear and protein extraction procedures. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **39**(3), 559-567. ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-019-03758-x
- 1 6 . Edmond Nocard, le disciple d'Alfort. In: *Institut Pasteur*. Paris [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/edmond-nocard-disciple-alfort>

17. EL-ZAATARI, M. M. a M. R. MCGINNIS, 1993. Mycotic Mycetoma. MURPHY, J. W., H. FRIEDMAN a M. BENDINELLI, ed. *Fungal Infections and Immune Responses*. Boston, MA: Springer US, s. 325-334. Infectious Agents and Pathogenesis. ISBN 978-1-4899-2402-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4899-2400-1_13
18. ERCIBENGOA, M., E. PÉREZ-TRALLERO a J. M. MARIMÓN, 2016. Autochthonous *Nocardia cerradoensis* Infection in Humans, Spain, 2011 and 2014. *Emerging Infectious Diseases*. **22**(1), 109-111. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2201.150771
19. ESHRAGHI, SS., 2012. Molecular Typing of *Nocardia* Species. *Journal of Medical Bacteriology*. **1**(1-2), 38-45. ISSN 2251-8649.
20. FOLTZ, K. D. a L. M. FALLAT, 2004. Madura foot: Atypical finding and case presentation. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. **43**(5), 327-331. ISSN 10672516. Dostupné z: doi:10.1053/j.jfas.2004.07.002
21. FORERO MORALES, M., R. HOPPRICH, R. WISE, L. SHEPHARD a G. WELDHAGEN, 2018. Cost-effective implementation of a custom MALDI-TOF library for the identification of South Australian *Nocardia* isolates. *Pathology*. **50**(7), 753-757. ISSN 00313025. Dostupné z: doi:10.1016/j.pathol.2018.08.006
22. GEORG, L. K., 1968. Public Health Image Library (PHIL). In: *Centers for Disease Control and Prevention*. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21118>
23. GOODLET, K. J., S. TOKMAN, A. NASAR, L. CHERRIER, R. WALIA a M. D. NAILOR, 2021. *Nocardia* prophylaxis, treatment, and outcomes of infection in lung transplant recipients: A matched case-control study. *Transplant Infectious Disease*. **23**(2). ISSN 1398-2273. Dostupné z: doi:10.1111/tid.13478
24. GORDON, R. E., 1966. Some Criteria for the Recognition of *Nocardia madurae* (Vincent) Blanchard. *Journal of General Microbiology*. **45**(2), 355-364. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-45-2-355
25. HAUSSAIRE, De., P. E. FOURNIER, K. DJIGUIBA et al., 2017. Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004–2014. *International Journal of Infectious Diseases*. **57**, 13-20. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2017.01.005

- 2 6 . HEMMERSBACH-MILLER, M., J. E. STOUT, M. H. WOODWORTH, G. M. COX a J. L. SAULLO, 2018. *Nocardia* infections in the transplanted host. *Transplant Infectious Disease*. **20**(4). ISSN 13982273. Dostupné z: doi:10.1111/tid.12902
- 2 7 . HENDERSON, N. a R. SUTHERLAND, 2017. *Nocardia* and Actinomyces. *Medicine*. **45**(18), 753-756. ISSN 1357-3039.
- 2 8 . HOU, S., W. WANG, G. CHEN, L. XIA, Z. WANG a Y. LU, 2021. Identification of a secreted superoxide dismutase (SOD) from *Nocardia seriolae* which induces apoptosis in fathead minnow (FHM) cells. *Journal of Fish Diseases*. **44**(1), 63-72. ISSN 0140-7775. Dostupné z: doi:10.1111/jfd.13268
- 2 9 . HUANG, L., X. CHEN, H. XU et al., 2019. Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of *Nocardia* species in China: 2009–2017. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **94**(2), 165-172. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.007
- 3 0 . HURYCH, J. a R. ŠTÍCHA, 2020. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Vydání 1. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-844-4.
- 3 1 . CHI, M. H., R. HUI, Ch. F. LU, L. Ch. YANG a S. Y. LI, 2013. Actinomycetoma caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: Report of a case in Taiwan with long-term follow-up. *Dermatologica Sinica*. **31**(3), 149-153. ISSN 10278117. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsi.2012.11.005
- 3 2 . IONEDA, T., B. L. BEAMAN, L. VISCAYA a E. T. ALMEIDA, 1993. Composition and toxicity of diethyl ether soluble lipids from *Nocardia asteroides* GUH-2 and *Nocardia asteroides* 10905. *Chemistry and Physics of Lipids*. **65**(3), 171-178. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(93)90015-U
- 3 3 . JANDA, J. M. a S. L. ABBOTT, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**(9), 2761-2764. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01228-07
- 3 4 . JIANG, Y., A. HUANG a Q. FANG, 2016. Disseminated nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum* in an immunocompetent host: A case report and literature review. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **12**(5), 3339-3346. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2016.3755

- 3 5 . KADLECOVÁ, M., B. JURAŠKOVÁ a J. ZAJÍC, 2017. Pulmonary nocardiosis in a geriatric patient. *Geriatric a gerontologie*. **6**(2), 94-97. ISSN 1805-4684.
- 3 6 . KAPLAN, W., 1969. Public Health Image Library (PHIL). In: *Centers for Disease Control and Prevention..* [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3146>
- 3 7 . KAVITHA, A. a M. VIJAYALAKSHMI, 2012. A Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. *The Scientific World Journal*. **2012**, 1-5. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1100/2012/160434
- 3 8 . KORSCHINECK, I., 2016. *BactoReal® Kit Nocardia spp.* Vienna: ingenetix GmbH [cit. 2021-06-03]. Dostupné z: <https://www.ingenetix.com/en/product/veterinary/Nocardia+spp./>
- 3 9 . KUMAR, A., B. BISHT, V. JOSHI a T. DHEWA, 2011. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal on Environmental Sciences*. **1**, 1079-1093.
- 4 0 . LAFONT, E, P. L. CONAN, V. RODRIGUEZ-NAVA a D. LEBEAUX, 2020. Invasive Nocardiosis: Disease Presentation, Diagnosis and Treatment – Old Questions, New Answers?. *Infection and Drug Resistance*. **13**, 4601-4613. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S249761
- 4 1 . LAURENT, F. J., F. PROVOST a P. BOIRON, 1999. Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**(1), 99-102. ISSN 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.37.1.99-102.1999
- 4 2 . LERNER, P. I., 1996. Nocardiosis. *Clinical Infectious Diseases*. **22**(6), 891-905. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/clinids/22.6.891
- 4 3 . LI, Y., T. TANG, J. XIAO, J. WANG, B. LI, L. MA, S. XIE a D. NIE, 2021. Clinical analysis of 11 cases of nocardiosis. *Open Medicine*. **16**(1), 610-617. ISSN 2391-5463. Dostupné z: doi:10.1515/med-2020-0196

- 4 4 . LÖFSTRÖM, C., M.H. JOSEFSEN, T. HANSEN, M.S.R. SØNDERGAARD a J. HOORFAR, 2015. Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. Elsevier, s. 219-248 ISBN 9780857098016. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-85709-801-6.00009-5
- 4 5 . MADDOCKS, S. a R. JENKINS, 2017. Quantitative PCR. *Understanding PCR*. Elsevier, s. 45-52. ISBN 9780128026830. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6
- 4 6 . MAIER, T., S. KLEPEL, U. RENNER a M. KOSTRZEWA, 2006. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*. **3**(4). ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth870
- 4 7 . MAJIDUDDIN, F., I. MATERON a T. PALZKILL, 2002. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**(2), 127-137. ISSN 14384221. Dostupné z: doi:10.1078/1438-4221-00198
- 4 8 . MANGIERI, N., D. GUEVARA NUÑEZ, G. ECHAVARRÍA, E. BERTONA, L. CASTELLO, G. BENCHETRIT a A. DE PAULIS, 2020. Nocardiosis esporotricoides por *Nocardia brasiliensis*. *Revista Argentina de Microbiología*. ISSN 03257541. Dostupné z: doi:10.1016/j.ram.2020.06.007
- 4 9 . MARGALIT, I., D. LEBEAUX, O. TISHLER, E. GOLDBERG, J. BISHARA, D. YAHAV a J. COUSSEMENT, 2021. How do I manage nocardiosis?. *Clinical Microbiology and Infection*. **27**(4), 550-558. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2020.12.019
- 5 0 . MAZZAFERRI, F., M. CORDIOLI, E. SEGATO et al., 2018. *Nocardia infection* over 5 years (2011-2015) in an Italian tertiary care hospital. *New Microbiologica*. EDIMES, **41**(2), 136-140. ISSN 1121-7138.
- 5 1 . MCNEIL, M. a J. BROWN, 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **7**(3), 357-417. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.7.3.357
- 5 2 . MEHTA, H. H., Y. SHAMOO a K. A. KLINE, 2020. Pathogenic *Nocardia*: A diverse genus of emerging pathogens or just poorly recognized?. *PLOS Pathogens*. **16**(3). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1008280

- 5 3 . MOHANTY, A., S. MEENA, S. P. KUMAR, P. K. GUPTA, N. KAISTHA, P. GUPTA, M. K. JHA a S. REKHA, 2020. Incidental Finding of *Nocardia*: A Case Series from a Tertiary Care Centre in Uttarakhand. *Case Reports in Infectious Diseases*. 1-5. ISSN 2090-6625. Dostupné z: doi:10.1155/2020/6874625
- 5 4 . NAKAMURA, I., T. NAGAKURA, H. FUJITA, S. FUKUSIMA a T. GONOI, 2017. *Nocardia elegans* infection: a case report and literature review. *International Journal of Infectious Diseases*. **54**, 15-17. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2016.10.031
- 5 5 . OPPERMAN, Christoffel J., 2020. Etymologia: *Nocardia*. *Emerging Infectious Diseases*. **26**(11), 2789-2789. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2611.ET2611
- 5 6 . OTT, S. R., N. MEIER, M. KOLDITZ et al., 2019. Pulmonary nocardiosis in Western Europe - Clinical evaluation of 43 patients and population-based estimates of hospitalization rates. *International Journal of Infectious Diseases* **81**, 140-148. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2018.12.010
- 5 7 . OZAR, F., S. KOYUNCU, C. KIZILAY a O. OZGENC, 2013. The *Nocardia farcinica* infection developing after total knee arthroplasty surgery. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology, **47**(3), 212-217. ISSN 1017-995X. Dostupné z: doi:10.3944/aott.v47i3.6314
- 5 8 . PAIGE, E. K. a D. SPELMAN, 2019. Nocardiosis: 7-year experience at an Australian tertiary hospital. *Internal Medicine Journal*. **49**(3), 373-379. ISSN 1444-0903. Dostupné z: doi:10.1111/imj.14068
- 5 9 . PLÍŠEK, S., K. HONEGR, J. KAPLA a J. SCHARFEN, 2011. Brain abscesses caused by *Nocardia* - Two case reports. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*. **74**(1), 78-82. ISSN 1210-7859.
- 6 0 . PUJIC, P., B. BEAMAN, M. RAVALISON, P. BOIRON a V. RODRÍGUEZ-NAVA, 2015. *Nocardia* and Actinomyces. *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, s. 731-752. ISBN 9780123971692. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00040-8
- 6 1 . RAHMAN, M., M. QASIM, Sh. A. BUKHARI a T. SHAHEEN, 2014. Bt Crops. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Elsevier, s. 125-142. ISBN 9780128008768. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800876-8.00006-0

- 6 2 . RAMAMOORTHI, K., B. Ch. PRUTHVI, N. R. RAO, J. BELLE a K. CHAWLA, 2011. Pulmonary nocardiosis due to *Nocardia otitidiscaviarum* in an immunocompetent host- A rare case report. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **4**(5), 414-416. ISSN 19957645. Dostupné z: doi:10.1016/S1995-7645(11)60116-8
- 6 3 . *Rare Disease Database: Nocardiosis*, 2021. Danbury: National Organization for Rare Disorders [cit. 2021-06-03]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/nocardiosis/>
- 6 4 . RASOULI NASAB, M., S. HABIBNIA, P. HEIDARIEH, M. FATAHI-BAFGHI, A. HASHEMI-SHAHRAKI a S. ESHRAGHI, 2018. Molecular Identification of *Nocardia* Strains from the Soil by hsp65 Gene: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Analysis of Sequence 16S rRNA Gene. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. **13**(4). ISSN 2345-2641. Dostupné z: doi:10.5812/archcid.14962
- 6 5 . RAWAT, D., V. RAJASURYA, R. K. CHAKRABORTY a S. SHARMA, 2021. Nocardiosis. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing [cit. 2021-06-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526075/>
- 6 6 . *Reported morbidity and mortality in the United States: MMWR*, 1986. Centers for Disease Control (CDC).
- 6 7 . RODRIGUEZ-NAVA, V., A. COUBLE, G. DEVULDER, J.-P. FLANDROIS, P. BOIRON a F. LAURENT, 2006. Use of PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis and Sequencing Database for hsp65 Gene-Based Identification of *Nocardia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**(2), 536-546. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.44.2.536-546.2006
- 6 8 . ROSSELLÓ-MÓRA, R., M. URDIAIN a A. LÓPEZ-LÓPEZ, 2011. DNA-DNA Hybridization. *Taxonomy of Prokaryotes*. Elsevier, s. 325-347. Methods in Microbiology. ISBN 9780123877307. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-387730-7.00015-2
- 6 9 . ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., 2007. Chemoorganotrofní organismy. In: *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník*. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=C005

- 70 . SAKSUN, J.M., J. KANE a R.K. SCHACHTER, 1978. Mycetoma caused by *Nocardia madurae*. *Canadian Medical Association Journal*. **119**(8), 911-914. PMID: PMC1819081. PMID: PMC1819081.
- 71 . SALINAS-CARMONA, M. C. a M. R. ROCHA-PIZAÑA, 2011. Construction of a *Nocardia brasiliensis* fluorescent plasmid to study Actinomycetoma pathogenicity. *Plasmid*. **65**(1), 25-31. ISSN 0147619X. Dostupné z: doi:10.1016/j.plasmid.2010.09.005
- 72 . SÁNCHEZ-HERRERA, K., H. SANDOVAL, D. MOUNIEE, N. RAMÍREZ-DURÁN, E. BERGERON, P. BOIRON, N. SÁNCHEZ-SAUCEDO a V. RODRÍGUEZ-NAVA, 2017. Molecular identification of *Nocardia* species using the sod A gene. *New Microbes and New Infections*. **19**, 96-116. ISSN 20522975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2017.03.008
- 73 . SEGAWA, S., M. NISHIMURA, K. SOGAWA et al., 2015. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Proteomics*. **12**(1). ISSN 1542-6416. Dostupné z: doi:10.1186/s12014-015-9078-5
- 74 . SCHARFEN ML., J., T. BERGEROVÁ, M. BUNČEK, P. URBÁŠKOVÁ, T. REISCHIG a H. STÁRKOVÁ, 2009. First isolation of *Nocardia transvalensis* in the Czech Republic from a brain abscess of a kidney transplant recipient. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: SZÚ, **18**(9), 290-294.
- 75 . SCHARFEN ML., J., S. PLÍŠEK, M. FRIDRICHOVÁ et al., 2009. *Nocardia farcinica* from a cerebral abscess in an immunocompromised patient. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: SZÚ, **18**(5), 172-174.
- 76 . SCHARFEN, Josef, 2007. Nokardie - smrtící krásky. *Živa: časopis přírodnický*. **55**(2), 161-168. ISSN 0044-4812.
- 77 . SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopln. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4771-2.
- 78 . SORICHETTI, B., B. WESTERBERG, R. TAN a F. KOZAK, 2015. *Nocardia asteroides* sinusitis in a pediatric patient: Case report with 20 year follow-up and review of the literature. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. **79**(7), 1152-1154. ISSN 01655876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijporl.2015.04.022

- 79 . TAJ-ALDEEN, S., A. DESHMUKH, S. DOIPHODE, A. ABDUL WAHAB, M. ALLANGAWI, A. ALMUZRKCHI, C. KLAASSEN a J. MEIS, 2013. Molecular Identification and Susceptibility Pattern of Clinical *Nocardia* Species: Emergence of *Nocardia crassostreae* as an Agent of Invasive Nocardiosis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. **24**(2), 33-38. ISSN 1712-9532. Dostupné z: doi:10.1155/2013/256025
- 80 . TŮMA, Ivan, 2015. *Mikrobiologie (pro zahradnické obory)*. Vydání první. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-227-4.
- 81 . VERMA, S. a A. KUILA, 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*. **14** ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2019.100369
- 82 . VERROKEN, A., M. JANSSENS, C. BERHIN, P. BOGAERTS, T.- HUANG, G. WAUTERS a Y. GLUPCZYNSKI, 2010. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Nocardia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**(11), 4015-4021. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01234-10
- 83 . WALLACE, R., P. VANCE, A. WEISSFELD a R. MARTIN, 1978. Beta-Lactamase Production and Resistance to Beta-Lactam Antibiotics in *Nocardia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **14**(5), 704-709. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.14.5.704
- 84 . WATTAL, C., J. OBEROI, N. GOEL, R. RAVEENDRAN a S. KHANNA, 2017. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **36**(5), 807-812. ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-016-2864-9
- 85 . WEBER, D., D. PATSCH, A. NEUMANN, M. WINKLER a D. ROTHER, 2021. Production of the Carboxylate Reductase from *Nocardia otitidiscaviarum* in a Soluble, Active Form for in vitro Applications. *ChemBioChem*. ISSN 1439-4227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.202000846

- 86 . WEHEBA, I., A. ABDELSAYED, A. ALRAJHI, S. AL-THAWADI a A. MOBEIREEK, 2021. Nocardiosis at an organ transplant center in Saudi Arabia: 15 years' experience. *Journal of Global Infectious Diseases*. **13**(1), 7-12 ISSN 0974-777X. Dostupné z: doi:10.4103/jgid.jgid_66_20
- 87 . WEI, M., P. WANG, J. QU, R. LI, Y. LIU, L. GU a Ch. YANG, 2017. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **11**, 183-187. ISSN 22137165. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgar.2017.08.011
- 88 . WHIPPLE, C. a A. HSIUNG, 2017. Resistance to β -Lactam Antibiotics: New Solutions to an Old Problem. In: *Hardy Diagnostics Headquarters*. California [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://blog.hardydiagnostics.com/2017/11/resistance-%ce%b2-lactam-antibiotics-new-solutions-old-problem/>
- 89 . WILSON, John W., 2012. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clinic Proceedings*. **87**(4), 403-407. ISSN 00256196. Dostupné z: doi:10.1016/j.mayocp.2011.11.016
- 90 . WINKLER, M., 2018. Carboxylic acid reductase enzymes (CARs). *Current Opinion in Chemical Biology* **43**, 23-29. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.006
- 91 . YANG, B., Y. WANG a P.-Y. QIAN, 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. **17**(1). ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-016-0992-y
- 92 . YANG, S. a R. ROTHMAN, 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*. **4**(6), 337-348. ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(04)01044-8
- 93 . ZHAO, P., X. ZHANG, P. DU, G. LI, L. LI a Z. LI, 2017. Susceptibility profiles of *Nocardia* spp. to antimicrobial and antituberculous agents detected by a microplate Alamar Blue assay. *Scientific Reports*. **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep43660
- 94 . ZHENG, S.-W., 2019. Disseminated nocardiosis due to *Nocardia otitidiscaviarum*: A case report and literature review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **12**(4). ISSN 1995-7645. Dostupné z: doi:10.4103/1995-7645.257120

CITACE OBRÁZKŮ

- 1 . BERD, D., 2014. Public Health Image Library (PHIL). In: Centers for Disease Control and Prevention. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z:<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=18858>
- 2 . BURNS, L., 2020. Pathogen Detection by DNA. In: Cicadea Biotech, LLC. St. Louis [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://cicadeabiotech.com/pathogen-detection-by-dna/>
- 3 . Edmond Nocard, le disciple d'Alfort. In: Institut Pasteur. Paris [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/edmond-nocard-disciple-alfort>
- 4 . GEORG, L. K., 1968. Public Health Image Library (PHIL). In: Centers for Disease Control and Prevention. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21118>
- 5 . KAPLAN, W., 1969. Public Health Image Library (PHIL). In: Centers for Disease Control and Prevention. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3146>