

EPIDEMIOLOGIE MIKROBIOLOGIE IMUNOLOGIE

ČASOPIS SPOLEČNOSTI PRO EPIDEMIOLOGII A MIKROBIOLOGII
ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

**IMPAKT
FAKTOR
0,500**

Z OBSAHU:

Piloting an integrated HIV, HCV and syphilis testing approach in community-based voluntary counselling and testing services in Slovakia

Detekce *Babesia* spp. v klíšťatech, v krvi psů a jelenů v České republice

Th17 lymphocytes and Interleukin-17A during the course of severe community acquired pneumonia, comparison with etiology and outcome

Asymptomatic SARS-CoV-2 infection in recipients of hematopoietic stem cells in the Omicron period

Výskyt *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* v hematofágních členovcích na Břeclavsku v roce 2022

Epidemie septických onemocnění u pacientů operovaných na operačních sálech nemocnice primárního typu



VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

září 2024
3/73

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica
Excerptováno v Bibliographia medica Českoslovac
EBSCO – Academic Search Complete
MEDLINE/INDEX MEDICUS, BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS
INIS Atomindex, SCOPUS
IMPAKT FAKTOR 0,500
Časopis je indexován v Seznamu periodik Rady pro výzkum, vývoj a inovace Úřadu vlády ČR.

ISSN 1210-7913
ISSN (On-line) 1805-451X
MK ČR E 4652

EPIDEMIOLOGIE MIKROBIOLOGIE IMUNOLOGIE

ČASOPIS SPOLEČNOSTI PRO EPIDEMIOLOGII A MIKROBIOLOGII
ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

ročník 73

září 2024

číslo 3

VEDOUcí REDAKTORKA

MUDr. Pavla Křížová, CSc.

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 49/48, Praha 10

ZÁSTUPKYNĚ VEDOUcí REDAKTORKY

MUDr. Jana Kozáková

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 49/48, Praha 10

REDAKČNÍ RADA

MUDr. Eliška Běbrová

Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, Praha 5

doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.

3. LF UK, Ruská 87, Praha 10

RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Mikrobiologický ústav LF a FN Plzeň
Edvarda Beneše 13, Plzeň

prof. MUDr. Roman Chlábek, Ph.D.

Vojenská lékařská fakulta Univerzita obrany
Třebešská 1575, Hradec Králové

prof. MUDr. Daniela Kotulová, CSc.

Čestná členka Společnosti pro epidemiologii
a mikrobiologii ČLS JEP, Bratislava

MUDr. Jan Kynčl, Ph.D.

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 49/48, Praha 10

prof. MUDr. Jindřich Lokaj, CSc.

Ústav klinické imunologie a alergologie
LF MU a FN u sv. Anny v Brně
Pekařská 53, Brno

RNDr. Vratislav Němeček, CSc.

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 49/48, Praha 10

prof. RNDr. František Ondriska, Ph.D.

Trnavská univerzita v Trnavě
Univerzitné námestie 1, Trnava

prof. MUDr. Petr Pazdiora, CSc.

Ústav epidemiologie LF v Plzni, UK
Edvarda Beneše 13, Plzeň

RNDr. Petr Petráš, CSc.

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 49/48, Praha 10

prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D.

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny
Pekařská 53, Brno

MUDr. Josef Trmal, Ph.D.

Ústí nad Labem

**doc. RNDr. Danica Valkovičová
Stanecková, Ph.D.**

Slovenská zdravotnícka univerzita
Limbová 14, Bratislava

MUDr. Jana Vlčková, Ph.D.

Ústav veřejného zdravotnictví LF UP
Hněvotínská 3, Olomouc

MUDr. Pavel Žampach

Nemocnice České Budějovice, a. s.
B. Němcové 54, České Budějovice 7



<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2024

EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, IMUNOLOGIE

Online verze časopisu na: www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie

Registrací získáte přístup do online verze časopisu a jeho archivu. Kontakt pro dotazy: info@prolekare.cz nebo +420 602 244 819

OBSAH

PŮVODNÍ PRÁCE

- Valkovičová Staneková D., Wimmerová S., Fernández-López L., Hábeková M., Kovářová A., Takáčová M., Casabona J.:** Riadenie integrovaného prístupu testovania HIV, HCV a syfilisu v komunitných dobrovoľných poradenských a testovacích službách na Slovensku..... 117
- Lukavská A., Kybicová K., Míchalová P., Navrátil J., Lamka J., Schánilec P.:** Detekce *Babesia* spp. v klíšťatech, v krvi psů a jelenů v České republice 124
- Moravec M., Nejtek T., Ibrahimová M., Zazula R., Müller M.:** Th17 lymfocyty a interleukin-17A v průběhu těžké komunitní pneumonie, srovnání s etiologií a výsledkem 131
- Šťastná-Marková M., Roubalová K., Hainz P., Kryštofová J., Labská K., Vosáhllová T., Němečková Š.:** Asymptomatická infekce SARS-CoV-2 u příjemců hematopoetických kmenových buněk v období cirkulace varianty omikron 140
- Mravcová K., Zadražilová S., Vlčková I., Orlíková H., Malý M., Kynčl J., Mendel J., Hubálek Z., Šikutová S., Rudolf I.:** Výskyt *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* v hematofágních členovcích na Břeclavsku v roce 2022 147

KRÁTKÁ SDĚLENÍ

- Prattingerová J., Poloprutská Š., Příkazský V., Smetana J., Valenta V.:** Epidemie septických onemocnění u pacientů operovaných na operačních sálech nemocnice primárního typu 153

OSOBNÍ ZPRÁVY 159

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Valkovičová Staneková D., Wimmerová S., Fernández-López L., Hábeková M., Kovářová A., Takáčová M., Casabona J.:** Piloting an integrated HIV, HCV and syphilis testing approach in community-based voluntary counselling and testing services in Slovakia 117
- Lukavská A., Kybicová K., Míchalová P., Navrátil J., Lamka J., Schánilec P.:** Detection of *Babesia* spp. in ticks and in blood of dogs and red deer in the Czech Republic 124
- Moravec M., Nejtek T., Ibrahimová M., Zazula R., Müller M.:** Th17 lymphocytes and Interleukin-17A during the course of severe community acquired pneumonia, comparison with etiology and outcome 131
- Šťastná-Marková M., Roubalová K., Hainz P., Kryštofová J., Labská K., Vosáhllová T., Němečková Š.:** Asymptomatic SARS-CoV-2 infection in recipients of hematopoietic stem cells in the Omicron period 140
- Mravcová K., Zadražilová S., Vlčková I., Orlíková H., Malý M., Kynčl J., Mendel J., Hubálek Z., Šikutová S., Rudolf I.:** Occurrence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in haematophagous arthropods in the Breclav district in 2022 147

SHORT ARTICLES

- Prattingerová J., Poloprutská Š., Příkazský V., Smetana J., Valenta V.:** An outbreak of septic conditions following surgery in the operating theatres of a primary hospital 153

PERSONAL NEWS 159

Vydává: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Vedoucí redaktorka: MUDr. Pavla Křížová, CSc. **Zástupkyně vedoucí redaktorky:** MUDr. Jana Kozáková

Odpovědná redaktorka: Ing. Lenka Šplíchalová, e-mail: splichalova.l@seznam.cz **Rukopisy zasílejte na adresu:** emi@szu.cz

Tiskne: Prager Publishing – LD, s.r.o., Elišky Přemyslovny 1335, 156 00 Praha 5. **Rozšiřuje v ČR:** Nakladatelství Olympia, a.s., Praha, **do zahraničí (kromě SR):** Myris Trade, s.r.o., V Štíhlách 1311/3, P. O. Box 2, 142 01 Praha 4, e-mail: myris@myris.cz, tel.: +420 296 371 202, **v SR:** www.ipredplatne.sk, infolinka: 0800 188 826, e-mail: info@ipredplatne.sk, objednávky@ipredplatne.sk. **Vychází:** 4krát ročně.

Rukopis byl předán do výroby 5. 8. 2024. **Předplatné:** na rok pro ČR je 560,00 Kč, SR 26,00 €, jednotlivé číslo 140,00 Kč, SR 6,50 €.

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá: ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: +420 296 181 805, 778 775 059, e-mail: nto@cls.cz. **Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky inzerce přijímá:** Prager Publishing – LD, s.r.o., mobil: +420 602 377 675, e-mail: tiskarnaprager@prager-print.cz.

Registrační značka MK ČR E 4652. ISSN (Print) 1210-7913, ISSN (On-line) 1805-451X.

Zaslané příspěvky se nevracejí. Vydavatel získává otiskem příspěvku výlučné nakladatelské právo k jeho užití. Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu. Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována za účelem dalšího rozšiřování v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopíí, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

Piloting an integrated HIV, HCV and syphilis testing approach in community-based voluntary counselling and testing services in Slovakia

Valkovičová Staneková D.¹, Wimmerová S.¹, Fernández-López L.², Hábeková M.¹, Kovářová A.¹, Takáčová M.¹, Casabona J.³

¹Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia

²Institute for Health Science Research Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain

³CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

ABSTRACT

Aim: Aim of the pilot was to increase HIV/HCV/syphilis testing and linkage to care of newly diagnosed persons, improve data collection and transfer using standard data collection tools in CBVCT services.

Methods: Integrated anonymous voluntary testing from blood for HIV, HCV and syphilis was realised using rapid tests in the period of 6 months (03/2019–08/2019). Participants with reactive results were advised to see a specialist for confirmatory testing and/or treatment.

Results: A total of 675 clients were tested for HIV, 410 for HCV, and 457 for syphilis. Participants' median age ranged from 24 to 35.6 (IQR: 24), 75.3% of them were men, 23.7% were women, and 0.6% identified as transgender. In terms of groups at risk 48.9% of 675 clients were men who have sex with men (MSM), 0.3% sex workers (SW), 9.0% people who inject drugs (PWID), 2.4% migrants (Mi) and the rest of clients (8.3%) belonged to groups at combined risk. Pilot revealed HIV, HCV and *T. pallidum* infections in 0.4%, 2.4% and 1.8% of clients, respectively. Just 2 clients, confirmed HIV-positive, were linked to care. The highest prevalence of HIV (4.2%), HCV (30.8%) and syphilis (7.1%) was found among MSM/Mi, PWID and SW/PWID, respectively. Condomless intercourse with SW, PWID, MSM and HIV-positive person in the last 12 months was reported by 5/92, 41/82, 3/78 and 0/88 of responding clients, respectively. Core indicators were included in the yearly national epidemiological report.

Conclusions: Pilot revealed the need to support integrated CBVCT to overcome barriers in confirmatory testing and linkage to care and to integrate core data of monitoring and evaluation (M&E) testing framework at CBVCT services into a national surveillance and M&E systems in Slovakia.

KEYWORDS

integrated testing – HIV – HCV – syphilis – Slovakia

SÚHRN

Valkovičová Staneková D., Wimmerová S., Fernández-López L., Hábeková M., Kovářová A., Takáčová M., Casabona J.: Riadenie integrovaného prístupu testovania HIV, HCV a syfilisu v komunitných dobrovoľných poradenských a testovacích službách na Slovensku

Ciele: Cieľom pilotného projektu bolo zvýšiť testovanie ako aj prepojenie so zdravotnou starostlivosťou o novodiagnostikované osoby s infekciou HIV/HCV/syfilisu a tiež zlepšiť zber a prenos údajov pomocou štandardných nástrojov zberu údajov z komunitných centier poskytujúcich dobrovoľné poradenstvo a testovanie (CBVCT) do národného epidemiologického a monitorovacieho systému.

Metódy: Integrované dobrovoľné anonymné testovanie z krvi na HIV, HCV a syfilis bolo realizované pomocou rýchlych testov v období 6 mesiacov (03/2019 až 8/2019). Účastníkom s reaktívnymi výsledkami sa odporučilo, aby navštívili špecialistu za účelom potvrdenia diagnózy a nasadenia terapie.

Výsledky: Otestovaných bolo 675 klientov na HIV, 410 na HCV a 457 na syfilis. Medián veku účastníkov sa pohyboval od 24 do 35,6 (IQR:24), 75,3% z nich bolo mužov, 23,7% žien a 0,6% transrodových ľudí. Z hľadiska rizika akvírovania testovaných infekcií 48,9% zo 675 klientov boli muži majúci styk s mužmi (MSM), 0,3% osoby pracujúce v sex-biznise (SW), 9,0% injekční užívatelia drog (PWID), 2,4% migranti (Mi) a 8,3% klientov uvádzalo kombináciu týchto rizík. Pilotný projekt odhalil infekciu HIV u 0,4%, HCV u 2,4% a *T. pallidum* u 1,8% klientov. Len 2 klienti, s potvrdenou HIV infekciou boli prepojení s následnou zdravotnou starostlivosťou. Najvyššia prevalencia HIV bola zistená u MSM/Mi (4,2%), HCV u PWID (30,8%) a syfilisu u SW/PWID (7,1%). Bezkonkómový styk so SW, PWID, MSM a HIV pozitívnymi za posledných 12 mesiacov uviedlo 5/92, 41/82, 3/78 a 0/88 odpovedajúcich klientov. Výsledky štúdie boli zahrnuté do ročnej národnej epidemiologickej správy.

Záver: Pilotný projekt odhalil potrebu podpory integrovaného testovania v CBVCT, prekonania prekážok pri potvrdzujúcom testovaní a prepojení so zdravotnou starostlivosťou ako aj potrebu integrácie základných údajov v rámci monitorovania a hodnotenia (M&E) testovania v CBVCT do národných systémov surveillance na Slovensku.

KLÍČOVÉ SLOVÁ

integrované testovanie – HIV – HCV – syfilis – Slovensko

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 117–123
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138062>

INTRODUCTION

Slovakia is one of the countries with the lowest HIV prevalence in Europe. Since the beginning of the HIV epidemic in 1985 to 2020, HIV infection was confirmed in 1284 persons (1061 Slovak citizens and 223 foreigners). Of 1061 Slovaks (953 men, 108 women), 129 (116 men, 13 women) had AIDS, and 58 died due to AIDS. One hundred ten cases of HIV infection were newly diagnosed in 2020 [1]. However, in the last years HIV incidence in Slovakia has slowly increased, from 86 newly diagnosed persons in 2015 (79 Slovaks, 7 foreigners) to 110 in 2020 (83 Slovaks, 27 foreigners) [2].

From 1985 until 2020, the spread of HIV infection was mainly characterized by two phenomena: most cases were men (85–90%) and most of HIV cases were Slovak citizens infected by sexual intercourse (almost 90%). Heterosexual condomless intercourse has been the second most reported mode of transmission (20%). Sex between men was the predominant mode of HIV transmission in Slovakia (70 % in 2020), while HIV transmission due to injection drug use accounted for 1% (18 cases) of HIV diagnoses [1]. Epidemiological surveys indicated 0.2% prevalence of HCV [3] and 0.48 incidence of syphilis in Slovakia in 2019 [4].

Although men who have sex with men (MSM) are in the highest risk of contracting HIV in Slovakia, LGBT rights organizations are not heavily involved in HIV prevention. There are four community-based voluntary counselling and testing (CBVCT) services working in Slovakia, but only one of them, Checkpoint Lighthouse Slovakia, primarily targets MSM. Odysseus, Prima, and Storm, non-governmental organisations (NGOs) working in harm reduction, are targeting people who inject drugs (PWID) and sex workers (SW) on the streets of Bratislava and Nitra. All these NGOs' occasionally offer HIV, HCV, HBV and syphilis testing and through harm reduction programmes contribute to a relatively stable trend in the incidence of HIV among PWID.

Community-based testing contributes to early diagnosis, particularly in vulnerable populations; thus, community-based testing of HIV, STIs, hepatitis B and hepatitis C virus should be included into the framework of national surveillance and measurement and evaluation (M & E) systems. This inclusion should facilitate the gathering and analysis of standardised data while maintaining a balance between the need to be efficient and obtaining the minimum required infor-

mation. ECDC is providing this evidence-based guidance on integrated testing of hepatitis C (HCV), HIV, and hepatitis B (HBV) to assist Member States in their efforts to improve case detection and testing programme uptake as part of the global effort to eliminate viral hepatitis and HIV as public health threats by 2030 [5].

EU project INTEGRATE “Joint Action on integrating prevention, testing and linkage to care strategies across HIV, viral hepatitis, TB and STIs in Europe” allowed to conduct pilot studies in 6 EU countries, including Estonia, Poland, Serbia, Slovenia, Slovakia and Spain [7]. The overall objective of Integrate was to increase early diagnosis and linkage to prevention and care not only for HIV and viral hepatitis, but also for tuberculosis and sexually transmitted infections (STI) in EU Member States by 2020. One of the objectives was to support the integration of testing and linkage to care data obtained at CBVCT sites into national surveillance and M&E systems for HIV, STIs, hepatitis B and hepatitis C virus [8, 9]. In Slovakia, the INTEGRATE project's goals focused on increasing HIV/HCV/syphilis testing, linking to care for newly diagnosed individuals, supporting the integration of data obtained at CBVCT sites into the national epidemiological information system (EPIS), and enhancing prevention strategies.

This article presents extended INTEGRATE's results concerning the national pilot in Slovakia, which focused on extended HIV/HCV/syphilis testing, improved data collection, and transfer using of standard data collection tools in CBVCT services.

METHODS

Integrated voluntary anonymous HIV/HCV/syphilis CBVCT was realised in Slovakia during the period of 6 months (03/2019 to 08/2019) by 3 NGOs: “Odysseus” and “Prima” – engaged in street work and/or needle exchange provision and “Checkpoint Lighthouse”. All clients involved in the project requested a testing voluntarily. COBATEST Network online data collection tools [10] implemented into practice during EU project Integrate were used to collect laboratory vs. socio-demographic data. It included an anonymous questionnaire derived from the COBATES Network that clients completed prior to testing either online or with the assistance of an NGO. The data analysed in the pilot project spans a six-month period (March 2019 to Au-

gust 2019). The indicators were estimated within that particular period. All infections were voluntarily and anonymously tested using EC-approved rapid tests: SD BIOLINE HIV-1/2 3.0, Abbott; Determine HIV-1/2 AG/AB Combo, Alere; Determine TP Syphilis, Alere; Multiples HIV ½ Syphilis Ab Test, bioLytical; INSTI HCV Antibody Test, bioLytical. In the case of an HIV-reactive result, CB-VCT services advised their clients to undergo confirmatory testing at the National Reference Centre for HIV/AIDS Prevention (NRC). Following EC-approved test kits were used for confirmation: Genscreen™ ULTRA HIV Ag – Ab (Bio-Rad), and HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics). In addition, participants with HCV/syphilis-reactive results were advised to see a specialist for confirmation testing and, if necessary, treatment. Using the IBM SPSS 28 programme, all test results were analysed concerning the socio-demographic information provided in the questionnaire.

RESULTS

During the study 675 people were tested for HIV, 410 for HCV and 457 for syphilis, with reactivity rates of 0.4% ($n = 3$), 2.4% ($n = 10$) and 1.8% ($n = 8$), respectively. In terms of gender 508 (75.3%) of 657 clients tested for HIV were males, 158 (23.4%) females, and 4 (0.6%) transgenders, 4 unknown (0.6%). The median age of participants was 29, IQR: 24–35.6 (men: 30, IQR: 25–37, women: 27, IQR: 23.55–32 and transgender: 29, IQR: 17.2–41.5). No significant difference was found between the incidence of any of the tested infections based on gender (Table 1). In terms of groups at risk out of 675 clients 330 (48.9%) were MSM, 2 (0.3%) SW, 61 (9.0%) PWID, 16 (2.4%) migrants (Mi). The rest of clients (8.3%) belonged to groups at combined risk: 9 (1.3%) MSM/SW, 3 (0.3%) MSM/PWID, 24 (3.6%) MSM/Mi, 19 (2.8%) SW/PWID, 1 (0.1%) MSM/SW/PWID (Figure 1).

Table 1. Results of rapid testing of HIV, HCV, and syphilis according to gender

Infection	HIV			HCV			Syphilis		
	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive
Men	508	2	0.4	328	8	2.4	343	7	2.0
Women	160	1	0.6	81	2	2.5	128	1	0.8
Transgender	4	0	0.0	1	0	0.0	4	0	0.0
Not answered	3	0	0.0	0	0	n. a.	0	0	n. a.
Total	675	3	0.4	410	10	2.4	457	8	1.8

Explanatory notes: n. a. = not applicable

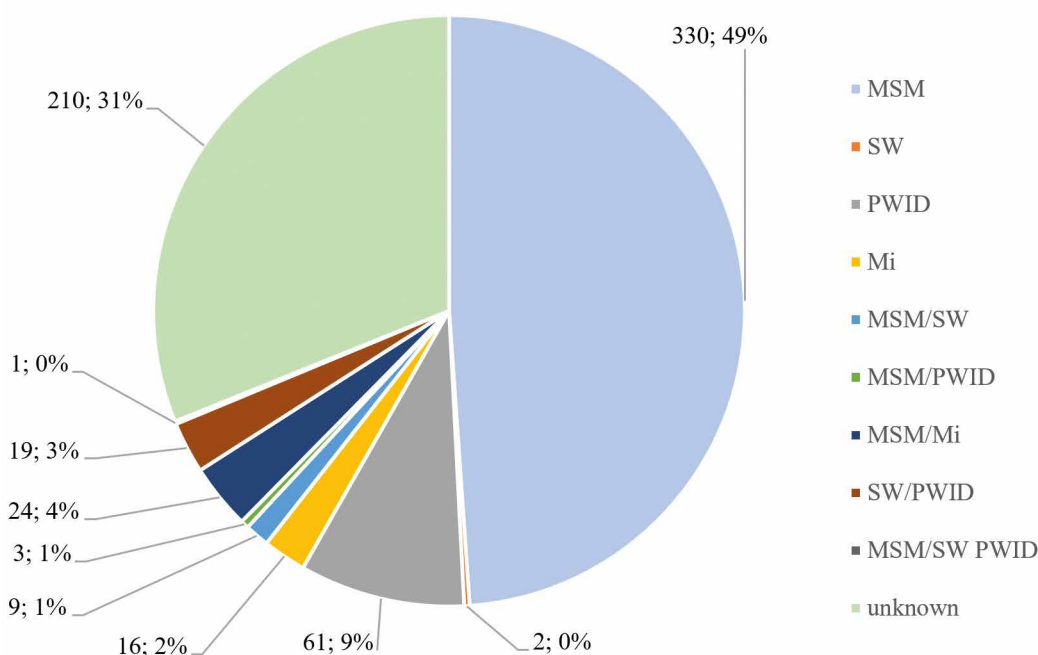


Figure 1. Distribution of clients according to groups at risk of HIV

Explanatory notes: MSM = men who have sex with men, SW = sex workers, PWID = people who inject drugs, Mi = migrants

The highest reactivity rate of HIV (1/40, 4.2%), syphilis (1/14, 7.1%), and HCV (38/26), 30.8 %) was found among MSM/Mi, SW/PWID and PWIDs, respectively. Two of 3 clients with HIV-reactive results were MSM, with one also being a migrant; the third client was female. HCV reactivity was detected entirely among 8 of 26 PWID (2 of them reported previous HCV infection) and by 2 of 10 PWID/SW. Regarding syphilis 5 of 8 men with reactive results were MSM, 1 MSM/migrant, 1 female SW/PWID and 1 man with unknown risk. Previous positivity for syphilis in clients with a reactive syphilis test was not reported. No coinfections were found during the pilot (Table 2).

Two of 3 clients with HIV-reactive results (which both MSM identified in Checkpoint) were confirmed and linked to care, while 1 (a female) did not pass confirmatory testing. Both, MSM were HIV tested 12 months before to the visit, but not at the same facility. No one of these three HIV-positive persons were tested HIV-reactive before the pilot. Due to legal barriers (anonymous testing, lack of health insurance, clinicians' acceptance

of CBVCT results), there was no evidence regarding subsequent confirmatory testing and possible treatment of individuals with HCV or syphilis reactive results. Two core indicators obtained during this study, number of HIV/HCV/syphilis tested persons and percentage of reactive results were included into the national epidemiological report, as the system only collects information on positive cases and not on all tests performed.

HIV testing of 675 clients was mostly conducted by Checkpoint (409, 60.6%), followed by the street work (206, 30.5%) and needle exchange programmes (60, 8.9%). HCV and syphilis testing was mostly offered in Checkpoint (240/410, 58.5% and 216/457, 47.3%, respectively). The most suitable testing site for reaching people with reactive results were needle exchange programmes for HCV (3/25, 12%) and Checkpoint and street work for syphilis (5/216, 2.3% and 1/47, 2.1%, respectively) (Table 3). In addition, 9/10 clients with HCV reactive results were PWID a PWID/SW reached by street work and /or by needle exchange programme.

Table 2. Results of rapid testing of HIV, HCV, and syphilis according to the groups at risk

Infection	HIV			HCV			syphilis		
	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive
MSM	290.0	1.0	0.0	230.0	0.0	0.0	219.0	5.0	2.3
SW	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PWID	46.0	0.0	0.0	26.0	8.0	30.8	47.0	0.0	0.0
Mi	16.0	0.0	0.0	9.0	0.0	0.0	13.0	0.0	0.0
MSM/SW	9.0	0.0	0.0	9.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0
MSM/PWID	3.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0
MSM/Mi	24.0	1.0	4.2	24.0	0.0	0.0	20.0	1.0	5.0
SW/PWID	17.0	0.0	0.0	10.0	2.0	20.0	14.0	1.0	7.1
MSM/SW/PWID	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
Unknown	269.0	1.	0.4	97.0	0.0	0.0	132.0	1.0	0.8
Together	675.0	3.0	0.4	410.0	10.0	2.	457.0	8.0	1.8

Explanatory notes: MSM = men who have sex with men, SW = sex workers, PWID = people who inject drugs, Mi = migrants

Table 3. Results of rapid testing of HIV, HCV, and syphilis according to the testing site

Infection	HIV			HCV			Syphilis		
	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive	No. tested	No. reactive	% reactive
Checkpoint	409	2	0.5	240	1	0.4	216	5	2.3
Street work	206	1	0.5	145	6	4.1	194	2	1.0
Needle exchange	60	0	0.0	25	3	12.0	47	1	2.1
Total	675	3	0.4	410	10	2.4	457	8	1.8

Explanatory notes: CBVCT = community-based voluntary counselling and testing

In terms of HIV testing within the past 12 months, 644 people responded, and of them 234 (36.3%) positively. Additionally, 78/651 (12%) of clients were HIV tested at the same location in the preceding 12 months. Condomless intercourse with SW, PWID, MSM and HIV-positive person in the last 12 months was reported by 5/92, 41/82, 3/78 and 0/88 of responding clients, respectively. Furthermore, 13 of 49 men and 13 of 39 women did not know HIV status of their partner.

DISCUSSION

The pilot was conducted in groups at high risk of HIV infection thanks to the close cooperation of outreach workers with health care services. It revealed a relatively low reactivity rate for HIV (0.4%) but higher for HCV (2.4%) and syphilis (1.8%). Even though two of the three individuals with HIV reactive results were MSM the rate of HIV reactivity in this group was relatively low comparing to previous studies provided in this high-risk group in Slovakia [11]. EU projects SIALON I (2008–2009) and SIALON II (2014–2015) aimed to implement HIV 2nd generation surveillance in MSM in European countries including Slovakia using time location sampling (TLS) and respondent-driven sampling (RDS) respectively. In Slovakia SIALON I and SIALON II reported higher prevalence in MSM 6.1% and 4.3% respectively using TLS and RDS method [12, 13]. In 2017, the subsequent study provided in the general population revealed that a group with the highest risk for HIV infection in Slovakia was not MSM but men who have sex with both men and women (MSMW) [14]. Unfortunately, in this pilot, the Cobatest questionnaire did not allow to focus deeply on this group with high-risk behaviour.

HCV infection was detected in 2.4% of clients, of which only in PWID (30.8%) and PWID/SW (20%). Similarly, in Western countries as well as in the Czech Republic, intravenous drug use represents the major factor in HCV transmission responsible for 50–80 % of newly diagnosed cases [15, 16]. Syphilis was diagnosed in only 1.8% of participants, with the highest rate in SW/PWID (7.1%) but not in PWID at any other risk. MSM without additional risk behaviour were shown to be 7.6 times more likely to contract syphilis than HIV. However, MSM/migrants were shown to have a greater but comparable risk of HIV than syphilis (4.2% vs. 5%, respectively). Therefore, comprehensive intervention strategies that address condom promotion, syphilis detection and treatment, and health education need to be tailored to this vulnerable population to prevent HIV and syphilis infections [17].

The risk of acquiring HIV and HCV infection did not differ by gender, but men were shown to be more at twofold higher risk of syphilis than women. These results could also be influenced by the inequality of the

ratio of men and women involved in the study, with only about a quarter of the participants being women and more than half being MSM. However, almost one-quarter of the participants did not answer that they belonged to any of the defined high-risk groups or were infected with any of the tested infections.

Aim of our pilot was to describe participants awareness and risk behaviour as well. Condomless intercourse in the last 12 months was reported mostly with PWID. This data confirm that drug use is inextricably linked to the risk of STI transmission [18]. Only 26.5% of men and 33.3% of women did not know the HIV status of their partners, whereas in previous study conducted among clients asking for HIV testing for preventive reasons in Slovakia in 2017, this figure was over 60% for both sexes [14]. Persons at increased risk of HIV and STIs appear to be either reluctant to communicate the problem or not concerned about it. On the other hand, more participants in our pilot (36.3%) were tested for HIV in the previous 12 months than those in a study of the general population in 2017 (23.3%) [14]. On contrary, it points to the fact that people at higher risk of STIs are more aware of their risk and are therefore more frequently tested for HIV than the general population. In our pilot study, the proportion of MSM tested for HIV in the previous year was higher compared to that in the SIALON II study (48.1% vs. 37.2% respectively) [13] which points to enhanced prevention in this group in Slovakia.

Our pilot also allowed more actively incorporate CBVCT services, street work, and needle exchange programmes (NEP) services into HIV HCV and syphilis testing and counselling activities. Due to financial reasons, most of all infections were tested in CBVCT service, but the most successful sites for reaching PWID and detecting HCV reactive results have proven to be NEPs. Although providing HCV testing through NEP services seemed feasible and acceptable to PWIDs, previous research has shown that the impact of NEP services on HCV prevention in PWIDs remains unclear, and well-designed research studies employing standardized criteria and measurements are needed to clarify this issue [19].

Approximately one-third of respondents had been tested for HIV in CBVCT services also within previous 12 months, confirming that in Slovakia, similar to other countries, CBVCTs are popular testing locations, that play an important role in reaching individuals at high risk for HIV particularly for MSM [20, 24]. In addition, our pilot confirmed that needle exchange sites and streets are more suitable locations for testing PWID for HCV [22] and SW for syphilis [23] respectively.

During the pilot, 2 of 3 HIV-reactive cases were confirmed to be linked to care and the national epidemiological information system. However, only two core indicators obtained during this study, number of HIV/HCV/syphilis tested persons and the percentage of

reactive results, were included into the national epidemiological report, as EPIS only collects information on positive cases and not on all tests performed [7]. Although everyone with HCV/syphilis reactive results was advised to see specialists during the post-test counselling, the linkage to care for these clients remained unknown due to legal barriers (lack of health insurance practitioners' acceptance of CBVCT results). Therefore, it is necessary to overcome these obstacles, especially for uninsured and homeless people, and to improve and establish new circuits with the corresponding specialised care. Interventions that consider individual provider and health system level factors are required if secondary access NEP services are to become a suitable setting to initiate conversations with clients around HCV treatment and provide linkages to care [27].

Using a standardised data collection tool for CBVCT services ensured that CBVCT M & E indicators could be easily estimated. Therefore, one of the pilot's objectives was to implement standardised data collection tools in CBVCT services. This issue was resolved using COBATEST Network's free standardised data collection tool [10]. Its implementation enabled the assessment of the core indicators [25] i. e. the number of clients tested, the reactivity rate of client results, and for HIV, the percentage of clients linked to care, and included them into annual national epidemiological reports. In addition, COBATEST questionnaire allowed the description of client profiles.

Our pilot project was implemented at the time of the slowly growing HIV epidemic in the Slovak Republic. Despite this, we found a relatively low rate of new HIV cases. Even though this anonymous testing still remains a current and efficient prevention approach, as it eliminates barriers and the fear of testing. Using a standardised data collection tool for CBVCT services ensured that CBVCT indicators could be easily estimated among individuals with higher risk behaviour. Community-based testing contributes to early diagnosis, particularly in key populations; therefore, the national response to HIV STIs and HCV should include community-based testing in the national surveillance and measurement and evaluation (M&E) systems framework [5].

CONCLUSIONS

Integrated HIV/HCV/syphilis testing proved to be an effective tool for STI prevention in groups with high-risk behaviour in Slovakia. PWID and SW remain key groups at risk for HCV and the most successful sites for reaching them are streets and needle exchange sites. Syphilis and HIV are mostly spread among SW and MSM, respectively. Intensive intervention programmes emphasise STI screening and treatment, risk sexual behaviour reduction, and the support of integrated STI

counselling and testing. Our findings indicate the need to focus these activities, particularly on risk groups, in the collaboration of CBVCT services with other health services. The topic of integrating community-based testing data into national surveillance and M&E systems has risen to the top of the agenda.

REFERENCES

1. Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (UVZSR). *Výskyt HIV infekcie v Slovenskej republike k 31.12. 2020* [online]. 2021-03-10 [cit. 2023-03-04]. Available at www.uvzsr.sk/docs/info/epida/HIV_SR_k_31122020.pdf.
2. Flisiak R, Zarębska-Michaluk D, Frankova S, et al. Is elimination of HCV in 2030 realistic in Central Europe? *Liver International*, 2021;41(Suppl. 1):56–60.
3. virusova-hepatitida.sk. *Hepatitída typu C* [online]. 2022 [cit. 2023-03-03]. Available at [www.virusova-hepatitida.sk/hepatitida_typu_c/published on 26.9.2022 cited on 26.9.2022/](http://www.virusova-hepatitida.sk/hepatitida_typu_c/published%20on%2026.9.2022%20cited%20on%2026.9.2022%20/).
4. Národné centrum zdravotníckych informácií (NCZI). *Pohlavné choroby v Slovenskej republike v roku 2019* [online]. 2020-10-15 [cit. 2023-04-03]. Available at www.nczisk.sk/aktuality/Pages/Pohlavne-choroby-v-Slovenskej-republike-v-roku-2019.aspx.
5. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Public health guidance on HIV hepatitis B and C testing in the EU/EEA – An integrated approach* [online]. 2018-11-23 [cit. 2023-04-03]. Available at www.ecdc.europa.eu.
6. Tavoschi L, Hales D. Monitoring of HIV testing services in the EU/EEA. *Euro Surveill*, 2016;21(48):30410.
7. Fernandez-Lopez L, Baros S, Niedźwiedzka-Stadnik M, Valkovičova Stanekova D, et al. Integration of communitybased testing data into national HIV surveillance in Poland, Serbia and Slovakia within the framework of INTEGRATE project. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(Suppl 2):800.
8. Raben D, Casabona J, Cosmaro L, et al. Results from INTEGRATE – the EU joint action on integrating prevention testing and linkage to care strategies across HIV viral hepatitis TB and STIs in Europe. *BMC Infect Dis*, 2021;21(suppl. 2):690.
9. Fernández López L, Klavs I, Conway A, et al. Recommendations for collection and integration of communitybased testing and linkage to care data into national surveillance monitoring and evaluation systems for HIV viral hepatitis and sexually transmitted infections: results from the INTEGRATE Joint Action. *BMC Infect Dis*, 2021;21(suppl. 2):794.
10. COBATEST NETWORK [online]. 2020-07-09 [cit. 2023-02-04]. Available at www.cobatest.org/wp-content/uploads/2023/03/COBATEST-Network-Data-collection-form-Slovakian-21032023.pdf.
11. Staneková D, Wimmerová M, Grambličková I. HIV infection and sexual behaviour among homosexual and bisexual men in Bratislava. *Cent Eur J publ Health*, 2000;3:172–175.
12. Mirandola M, Folch Toda C, Krampac I, et al. HIV bio-behavioural survey among men who have sex with men in Barcelona, Bratislava, Bucharest, Ljubljana, Prague and Verona 2008–2009. *Euro Surveill*, 2009;14(48):19427.
13. Mirandola M, Gios L, Sherriff N, et al. Sialon II Network Socio-demographic Characteristics Sexual and Test-Seeking Behaviours Amongst Men Who have Sex with Both Men and Women: Results from a Bio-behavioural Survey in 13 European Cities. *AIDS Behav*, 2017;21(10):3013–3025.
14. Staneková Valkovičová D, Jaščurová Z, Wimmerová S, et al. HIV Prevalence and Risk Behaviour of Persons HIV-Tested for Preventive Reasons in Slovakia. *JSM Sexual Med*, 2020;4(8):1060.
15. Grebely J, Robaey G, Bruggmann P, et al. Recommendations for the management of hepatitis C virus infection among people who inject drugs. *Int J Drug Policy*, 2015;26(10):1028–1038.
16. Frankova S, Urbanek P, Husa P, et al. Chronic hepatitis C in the Czech Republic: forecasting the disease burden. *Cent Eur J Public Health*, 2019;27(2):93–98.

17. Li Y, Xu J, Reilly KH, et al. Prevalence of HIV and Syphilis Infection among High School and College Student MSM in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One*, 2013;8(7):e69137.
18. Tyndall MV, Patrick D, Spittal P, et al. Risky sexual behaviours among injection drugs users with high HIV prevalence: implications for STD control. *Sex Transm Infect*, 2002;78 (Suppl 1):i170–175.
19. Davis SM, Daily S, Kristjansson AL, et al. Needle exchange programs for the prevention of hepatitis C virus infection in people who inject drugs: a systematic review with meta-analysis. *Harm Reduction Journal*, 2017;14:25.
20. Sulat JS, Prabandari YS, Sanusi R, et al. The impacts of community-based HIV testing and counselling on testing uptake: A systematic review. *Jour of Heal Res*, 2018;32(2):152–163.
21. Munck HNM, Qvist T, Helleberg M, et al. At-Risk Groups of Men Who Have Sex with Men Can Be Reached Through Community-Based HIV Testing in Denmark. *AIDS Educ Prev*, 2021;33(5):439–449.
22. O’Riordan K, Khan M, Mazulis A. CON: Needle Exchange Programs Should Not Be Instituted to Reduce Hepatitis C Virus Transmission. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 2019;12(6):173–175.
23. Dongmin L, Lu W, Wen L, et al. HIV and syphilis infections among street-based female sexworkers in China, 2010–2012. *Chines Med Jour*, 2014;127(4):707.
24. Gunn J, McNally S, John Ryan, et al. Barriers to hepatitis C treatment among secondary needle and syringe program clients and opportunities to intervene. *Int J Drug Policy*, 2021; 96:103387.
25. Euro HIV Edat. *Core indicators to monitor community based voluntary counselling and testing (CBVCT) for HIV Guidelines for CBVCT services Field-test version [online]*. 2012 [cit. 2023-04-24]. Available at [www: <https://eurohivedat.eu/arxius/ehe_cdocs-menu_cdocsmenu_doc_3-CBVCT_core_indicators_field_test_version.pdf>](https://eurohivedat.eu/arxius/ehe_cdocs-menu_cdocsmenu_doc_3-CBVCT_core_indicators_field_test_version.pdf).

Acknowledgement

The research reported was supported by the Joint Action INTEGRATE funded by the European Union’s Third Health Programme for Research and Innovation (Grant Agreement No: 761319). This article

was also created by the realization of the project “Centre of excellence of environmental health” ITMS No. 26240120033 based on the supporting operational Research and development programme funded from the European Regional Development Fund.”

We want to acknowledge the contribution of the following people and organisations to the implementation of the pilots in Slovakia: Jiří Pavlát, NGO Dom svetla Slovensko; Dominika Jašeková, NGO Odyseus; Barbora Kuchárová, NGO Prima.

We also thank the steering committee of the EU project Integrate for its intellectual support: Dorte Raben, Anne Raahauge, Stine Finne Jakobsen, Centre of Excellence for Health, Immunity and Infections (CHIP), Denmark; Christine Kakalou, Centre for Research & Technology Hellas, Institute of Applied Biosciences, Information Technologies institute, Greece; Lella Cosmaro, Fondazione LILA Milano Onlus – Italian League for Fighting AIDS, Italy; Aljona Kurbatova & Julia Hristojeva, National Institute for Health Development, Estonia; Michele Momi & Manuel Maffeo, Arcigay Associazione LGBTI Italiana, Italy; Valerie Delpuch & Meaghan Kall, Public Health England, UK; Jordi Casabona & Laura Fernandez-Lopez, Centre for Epidemiological Studies on STI/HIV/AIDS in Catalonia (CEEISCAT), Health Department, Generalitat of Catalonia, Badalona, Catalonia, Spain; Irena Klavs, National Institute of Public Health, Slovenia; Jack Lambert, University College Dublin, Ireland; Nadia Gasbarrini, Fondazione Villa Maraini Onlus, Italy; Piotr Wysocki & Iwona Wawer, National AIDS Centre Agency of the Ministry of Health, Poland.

The authors contributed equally to this work and share first/last authorship.

Do redakce došlo dne 19. 9. 2023.

Adresa pro korespondenci:

doc. RNDr. Danica Valkovičová Staneková, PhD.

Slovenská zdravotnícká univerzita

Limbová 14

833 03 Bratislava

Slovenská republika

e-mail: danica.valk.stanek@gmail.com

Detekce *Babesia* spp. v klíšťatech, v krvi psů a jelenů v České republice

Lukavská A.¹, Kybicová K.¹, Míchalová P.¹, Navrátil J.¹, Lamka J.², Schánilec P.³

¹Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

²Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

³Klinika chorob psů a koček, Veterinární univerzita Brno

SOUHRN

Cíl: Zjistit výskyt potenciálně patogenních druhů babesii pro člověka v klíšťatech a v krvi psů a jelenů ve vybraných regionech České republiky. Prevalenci *Babesia* spp. v klíšťatech porovnat s výskytem jiných patogenů přenášených klíšťaty jako *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp.

Materiál a metody: Vzorky klíšťat byly jednotlivě homogenizovány, ze vzorků klíšťat a krve živočichů provedena izolace DNA. Detekce *Babesia* spp. byla stanovena metodou PCR 18S rRNA genu a sekvenační analýzou PCR produktů určeny jednotlivé druhy babesii.

Výsledky: V letech 2014–2016 byla analyzována klíšťata a krev psů a jelenů na různých místech České republiky. Ze souboru 675 klíšťat *Ixodes ricinus* dosahovala pozitivita na přítomnost *Babesia* spp. hodnot od 0,0 do 3,3 %. Sekvenační analýzou byly v klíšťatech identifikovány druhy *Babesia venatorum*, *Babesia microti* (patogenní druhy pro člověka) a druh *Babesia capreoli*. Prevalence *Babesia* spp. v klíšťatech byla v porovnání s výskytem jiných patogenů jako *Borrelia burgdorferi* s. l. (29,3 %), *Anaplasma phagocytophilum* (4,9 %) nižší a srovnatelná s *Rickettsia* spp. (1,6 %). U třetiny pozitivních klíšťat na babesie byla zjištěna koinfekce s *Borrelia burgdorferi* s. l. (*B. venatorum* – *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *B. microti* – *B. afzelii*). Ze 109 vzorků krve psů bylo 3,7 % pozitivních na *Babesia* spp. s výskytem druhů *Babesia gibsoni* a *Babesia vulpes*. Z 50 vzorků krve jelenů z přírodního ekosystému dosahovala pozitivita 4,0 %. Identifikován byl druh *Babesia divergens*, nejvíce patogenní druh *Babesia* spp. pro člověka. Z 80 vzorků krve jelenů chovaných na farmách bylo pozitivních 5,0 % s výskytem druhu *Babesia odocoilei*.

Nukleotidové sekvence babesii způsobujících humánní babesiózu byly zaslány do genové banky a přijaty pod čísla ON892053 (*B. venatorum*), ON892061 (*B. microti*), ON892067 (*B. divergens*).

Závěr: Metodou PCR 18S rRNA genu a sekvenací amplikonů byly na území České republiky detekovány tři druhy babesii patogenních pro člověka: *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. microti*. Výskyt těchto druhů babesii znamená potenciální riziko onemocnění babesiózou, zejména pro asplenické a imunokompromitované pacienty. Zjištěné koinfekce s *Borrelia burgdorferi* s. l. mohou být příčinou komplikovaného průběhu onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Babesia spp. – *Borrelia burgdorferi* s. l. – *Anaplasma* spp. – *Rickettsia* spp. – koinfekce – PCR – sekvenace – klíště – pes – jelen – Česká republika

ABSTRACT

Lukavská A., Kybicová K., Míchalová P., Navrátil J., Lamka J., Schánilec P.: Detection of *Babesia* spp. in ticks and in blood of dogs and red deer in the Czech Republic

Aim: To determine the occurrence of species of *Babesia* potentially pathogenic for humans in ticks and in the blood of dogs and deer in selected regions of the Czech Republic. To compare the prevalence of *Babesia* spp. in ticks with that of other tick-borne pathogens, such as *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., and *Rickettsia* spp.

Material and Methods: Tick samples were individually homogenized. DNA was isolated from tick samples and animal blood. The detection of *Babesia* spp. was based on PCR of the 18S rRNA gene, and the identification to the species level was done by sequencing analysis of the PCR products.

Results: In 2014–2016, ticks and blood of dogs and deer collected in various areas of the Czech Republic were analyzed. In a set of 675 *Ixodes ricinus* ticks, the positivity rate for *Babesia* spp. varied from 0.0 to 3.3 %. The species *Babesia venatorum*, *Babesia microti* (both pathogenic for humans), and *Babesia capreoli* were identified in ticks by sequencing analysis. The prevalence of *Babesia* spp. in ticks compared to that of other pathogens such as *Borrelia burgdorferi* s. l. (29.3 %) or *Anaplasma phagocytophilum* (4.9 %) was lower and comparable to that of *Rickettsia* spp. (1.6 %). Co-infection with *Borrelia burgdorferi* s. l. (*B. venatorum* – *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *B. microti* – *B. afzelii*) was found in a third of *Babesia* spp. positive ticks. Out of 109 dog blood samples, 3.7 % were positive for *Babesia* spp., specifically *Babesia gibsoni* and *Babesia vulpes*. Of 50 blood samples of wild deer from the natural ecosystem, the positivity rate reached 4.0 %. The species *Babesia divergens*, a major human pathogen, was identified. Out of 80 blood samples from farmed deer, 5.0 % were positive for the species *Babesia odocoilei*. Nucleotide sequences of the agents causing human babesiosis were deposited in the gene bank under accession numbers ON892053 (*B. venatorum*), ON892061 (*B. microti*), and ON892067 (*B. divergens*).

Conclusions: Using PCR of the 18S rRNA gene and amplicon sequencing, three species of *Babesia* causing human babesiosis were detected in the Czech Republic: *B. divergens*, *B. venatorum*, and *B. microti*. *Babesia* spp. pathogenic for humans pose a potential risk especially in asplenic and immunocompromised patients. The detected co-infections with *Borrelia* spp. can be the cause of a complicated course of the disease.

KEYWORDS

Babesia spp. – *Borrelia burgdorferi* s. l. – *Anaplasma* spp. – *Rickettsia* spp. – PCR – co-infection – sequence analysis – tick – dog – deer – Czech Republic

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 124–130
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138063>

ÚVOD

Klíšťata jsou vektory řady patogenů a jejich monitorování je významné v rámci epidemiologického sledování. Ve střední Evropě představují největší zdravotní riziko klíšťata *Ixodes ricinus*, která vedle nejznámějších patogenů, virů klíšťové encefalitidy a bakterií borrelií, mohou přenášet i tzv. minoritní patogeny, jako *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. a *Babesia* spp. [1, 2]. Více než 100 druhů babesii infikuje řadu domácích a divokých zvířat jako skot, koně, ovce, psy, jeleny, srnce, malé savce aj., ale jen několik druhů infikuje člověka [3]. Jednotlivé druhy se liší ve své virulenci a mohou být příčinou onemocnění (babesioza) lidí a zvířat [4]. U psů je babesioza častá a potenciálně životu nebezpečná infekce [5]. U hovězího dobytka může způsobit fatální hemolytickou anémii stáda, zvláště při souběžné infekci jinými patogeny jako anaplasmou a mycoplasmou [6]. Od roku 1957 bylo v Evropě uveřejněno 56 autochtonních případů lidské babesiozy, které byly způsobeny třemi druhy babesii: *Babesia divergens*, *Babesia venatorum*, *Babesia microti* [7]. Většina pacientů byla asplenická, imunosupresivní nebo s jinými komorbitami. Přestože je hlavním přenašečem infekce klíště, byly zaznamenány i případy přenosu patogenu transfuzí kontaminované krve a krevních produktů [8]. V endemických oblastech USA (severovýchod a severní část Středozápadu) byl zjištěn i kongenitální přenos z matky na dítě [9].

MATERIÁL A METODY

Sběr klíšťat a odběr krve živočichů

V letech 2014 a 2015 bylo provedeno monitorování promořenosti klíšťat *I. ricinus* vybranými patogeny ve čtyřech pražských parcích (Klánovický les, Kunratický les, Satalická obora, Prokopské údolí). Byly zvoleny lokality, které slouží k relaxaci a výletům, kde tráví občané svůj volný čas. Sběr klíšťat byl proveden vlnováním od března do června a v září (období sezonní aktivity klíšťat *I. ricinus* ve střední Evropě). Klíšťata byla individuálně rozdělena do zkumavek a uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do začátku testování.

V roce 2015 byla odebrána krev 109 psů, kteří byli sledováni na Klinice chorob psů a koček, Veterinární univerzity Brno. Vzorky krve s EDTA byly po odběru zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ve spolupráci s Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy Hradec Králové bylo během let 2014–2016 odebráno 50 vzorků krve jelenů volně žijících v Krkonošském národním parku a 80 vzorků krve jelenů chovaných na farmách a v oborách na různých místech Čech (Středočeský kraj, Královéhradecký kraj, Pardubický kraj, kraj Vysočina, Moravskoslezský kraj, Zlínský kraj). Odběry krve jelenů byly uskutečňovány při individuálních imobilizacích jelenů. Vzorky krve s EDTA byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Homogenizace klíšťat a DNA izolace ze vzorků klíšťat a krve

Každý vzorek klíštěte byl mechanicky rozrušen sterilním skalpelem nebo nůžkami v mikrozkumavce ve 180 μl pufru ATL. Na izolaci DNA ze vzorků byl použit kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) a extrakce provedena dle návodu výrobce.

Detekce *Babesia* spp. metodou PCR

Reakce PCR byla prováděna podle protokolu Casati [10]. Pro amplifikaci 18S rRNA genu *Babesia* spp. byly použity primery BJ1 (5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3') a BN2 (5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'), délka amplifikovaného úseku 411–452 pb. Celkový objem reakční směsi byl 25 μl , s 5 μl extrahované DNA jako templátu, 0,5 μM každého primeru, 0,625 jednotek Taq DNA polymeráze v Taq PCR Mixu (Qiagen, Germany). Reakce byla prováděna na přístroji DNA Engine Thermal Cycler (Bio Rad applied Biosystems, USA). Jednokroková PCR reakce sestávala z počáteční denaturace (3 min při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$), 35 cyklů amplifikace (denaturace 1 min při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, annealing 1 min při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, elongace 2 min při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$) a závěrečného kroku 5 min při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Produkty byly po přidání barvy GelRed stain (Biotum Inc., USA) elektroforeticky separovány v 1,2% agarozovém gelu a vizualizovány použitím standardního UV transiluminátoru.

Pozitivní kontroly byly poskytnuty pracovníky Parazitologického ústavu Slovenské akademie věd.

Sekvenční analýza PCR produktů

PCR produkty (411–452 bp) byly přečištěny použitím kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, US.). Vhodná koncentrace na sekvenaci 5–10 ng/100 pb (DNA koncentrace PCR produktů) byla zjištěna měřením na přístroji Nanodrop (1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA). Sekvence byla prováděna na sekvenačním analyzátoru 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) v sekvenační laboratoři Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. K vyhledávání a porovnávání sekvencí v databázích byl použit FASTA format and BLAST program National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

VÝSLEDKY**Výskyt *Babesia* spp. v klíšťatech z pražských parků, porovnání s ostatními patogeny**

Největší pozitivita klíšťat na přítomnost babesií byla zjištěna v Klánovickém lese (3,3 %). Pozitivní klíšťata byla ve stadiu nymf, a vyskytoval se pouze druh *B. venatorum*. U jednoho klíštěte byla zjištěna koinfekce s borrelií (*B. afzelii*). V Kunratickém lese byla promořenost 2,1 %, 5 nymf, 2 samci, 1 samice. Na této lokalitě se vyskytovalo nejbohatší druhové zastoupení babesií (*B. venatorum*, *B. capreoli*, *B. microti*). U tří nymf a jednoho samce byla zjištěna koinfekce s borreliemi, dvakrát *B. microti* – *B. afzelii*, dvakrát *B. venatorum* – *B. garinii*. Pestrá promořenost souvisí s hojným zastoupením rezervoárových živočichů od malých savců až po velké kopytníky. Vyskytuje se zde srnčí zvěř, mufloni, ptáci a v nivě potoka také hlodavci (hrabošik podzemní). V Prokopském údolí byla pozitivita 1,3 %, pozitivní byl 1 samec (*B. capreoli*). V Satalické oboře babesie v klíšťatech prokázány nebyly. Rozdíly v počtu infikovaných klíšťat na jednotlivých lokalitách jsou dány charakterem biotopu a přítomností rezervoárových živočichů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Výskyt babesií v klíšťatech byl porovnán s výskytem ostatních patogenů. Nejvíce zastoupeny byly *Borrelia burgdorferi* s. l. (30 %), výskyt ostatních patogenů byl podstatně menší a pohyboval se v jednotkách procent. Prevalence *Anaplasma phagocytophilum* 4,9 %, *Babesia* spp. 1,8 %, *Rickettsia* spp. 1,6 %. Vyskytovaly se i koin-

fekce, nejčastěji se jednalo o kombinace s borrelií způsobující lymeskou borreliózu. Borrelie s anaplasmou se vyskytovala u 1,5 % klíšťat, borrelie s rickettsií u 0,9 %, borrelie s babesií 0,7 % a anaplasma s rickettsií byla prokázána u 0,4 % klíšťat (nepublikované údaje).

Identita *Babesia microti* a *Babesia venatorum*

Z potenciálně patogenních druhů babesií pro člověka byly sekvenční analýzou PCR produktů zjištěny druhy *B. venatorum* a *B. microti*. Pořadí bazí amplifikovaných úseků 411–452 bp bylo porovnáno s úseky genů v izolátech pacientů s babesiózou a klíšťat (publikované údaje). Sekvence genů byly staženy z databáze genové banky a porovnána variabilita fragmentů 18S rRNA genu.

Babesia microti

Amplifikovaný fragment o velikosti 451 pb (Acc. No. ON892061) z izolátu klíštěte z Kunratického lesa v lokalitě Glóbus ukázal 100% identitu s 18S rRNA genu prokázaným v izolátu krve pacientky s humánní babesiózou (Acc. No. EF 413181) a v izolátech z klíšťat v kantonu Curych (Acc. No. AY 648882, AY 648883) [11, 10].

Druh *B. microti* vyskytující se v Americe je více virulentní než druh *B. microti* vyskytující se v Evropě a je příčinou importovaných nálezů z USA do Evropy. Porovnáním s úseky genu *B. microti* izolovaném z klíštěte na severovýchodě USA byla identita 99,6 %, odchylka se vyskytovala v 1 páru bazí a v 1 inserci/absenci baze (Acc. No. AY144694).

Babesia venatorum

Tato babesie se vyskytovala v klíšťatech nejhojněji, v Klánovickém lese byla dominantní. Onemocnění způsobené tímto druhem se v klinických projevech velmi podobá příznakům vyvolaným *B. divergens*, ale není tak infekční, průběh onemocnění má mírnější průběh, úmrtí zaznamenáno nebylo. Vykazuje jen 98,2% homologii s *B. divergens* nalezenou u nemocných s babesiózou.

Porovnání úseků genů 414–418 bp z izolátů klíšťat Klánovického lesa vykazovalo 100% identitu s 18S rRNA genu, prokázaným v izolátu krve pacientky s humánní babesiózou (Acc. No. AY046575) [12]. Jednalo se o první případ humánní babesiózy v Německu v roce 2005.

Tabulka 1. Pozitivita klíšťat *Babesia* spp. ve vybraných pražských parcích a jejich druhové zastoupení (2014–2015)**Table 1.** Positivity of ticks by *Babesia* spp. in selected Prague parks and detection of genus (2014–2015)

Lokalita	Počet testovaných klíšťat	Pozitivita klíšťat (%)	<i>Babesia</i> spp.
Satalická obora	70	0/70 (0,0 %)	–
Klánovický les	152	5/152 (3,3 %)	5× <i>B. venatorum</i>
Kunratický les	377	8/377 (2,1 %)	5× <i>B. venatorum</i> 2× <i>B. microti</i> 1× <i>B. capreoli</i>
Prokopské údolí	76	1/76 (1,3 %)	1× <i>B. capreoli</i>

Tabulka 2. Pozitivita krve psů *Babesia* spp. a jejich druhové zastoupení (2015)**Table 2.** Positivity of *Babesia* spp. in dogs blood samples and detection of genus (2015)

Celkový počet vzorků	Počet pozitivních vzorků	Infekční poměr (% positivity)	<i>Babesia</i> spp.
109	4	3,7 %	3× <i>B. gibsoni</i> 1× <i>B. vulpes</i>

Tabulka 3. Pozitivita krve jelenů *Babesia* spp. a jejich druhové zastoupení (2014–2016)**Table 3.** Positivity of *Babesia* spp. in red deer blood samples and detection of genus (2014–2016)

	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních vzorků	Infekční poměr (% positivity)	<i>Babesia</i> spp.
Jelení (v přírodě)	50	2	4,0 %	2× <i>B. divergens</i>
Jelení (v oborách, farmách)	80	4	5,0 %	4× <i>B. odocoilei</i>

100% identita byla také nalezena v izolátech z klíšťat z kantonů Ticino a Neuchatel ve Švýcarsku (Acc. No. AY648877, AY648878, AY648881) [10].

Výskyt *Babesia* spp. v krvi psů

Z celkového počtu 109 vzorků krve psů bylo 3,7 % pozitivních na *Babesia* spp. Ve třech případech byla prokázána *Babesia gibsoni* a v jednom případě *Babesia vulpes* (pes pocházející ze Srbska). Hodnota positivity a druhové zastoupení jsou uvedeny v tabulce 2.

Oba dva druhy babesíí (*Babesia gibsoni*, *Babesia vulpes*) zjištěné v krvi psů jsou patogenní pro psy, u člověka zaznamenány nebyly. Údaje prevalence (3,7 %) a druhová zastoupení jsou obdobná údajům v jiných zemích. Na Slovensku byla zjištěna promořenost 3,6 %, převážně zastoupena druhem *Babesia canis canis* [13], ve Velké Británii 2,4 % s druhovým zastoupením *Babesia gibsoni* [14]. *B. gibsoni* nebyla v Evropě dlouho známa, převážně se vyskytuje v oblastech Asie, Severní Ameriky, Austrálie, avšak několik případů infekce způsobené tímto druhem se potvrdilo v Evropě včetně České republiky [5, 15, 16, 17]. Výskyt *B. gibsoni* mimo endemické oblasti je přisuzován globálnímu oteplování a následnou změnou v rozšíření jednotlivých druhů klíšťat [18]. Vliv má i narůstající migrace psů (cestování, soutěže). Určení správného druhu babesie při onemocněním babesiózou má zásadní význam pro léčbu, neboť dosud používaná tradiční anti-babesiální terapie proti *B. canis* je neefektivní při onemocnění způsobené *B. gibsoni* [19].

Výskyt *Babesia* spp. v krvi jelenů

Z celkového počtu 130 vzorků bylo 50 vzorků krve jelenů žijících ve volné přírodě Krkonošského národního parku a 80 vzorků krve jelenů chovaných na farmách nebo v oborách (Středočeský kraj, Královéhradecký kraj, Pardubický kraj, kraj Vysočina, Moravskoslezský kraj, Zlínský kraj).

U jelenů z přírodního ekosystému dosahovala promořenost babesíemi 4,0 % a ze zjištěných druhů byla zjištěna *B. divergens*, u jelenů chovaných v oboře či na farmě byla pozitivita 5,0 % s druhovým zastoupením *B. odocoilei*. Hodnoty positivity krve jelenů a druhová zastoupení babesíí uvádí tabulka 3.

V krvi jelenů volně žijících v Krkonošském národním parku dosahovala promořenost 4 % a byla zjištěna přítomnost *Babesia divergens*. Obdobné hodnoty prevalence a druhové zastoupení bylo zjištěno i v jiných evropských zemích [1, 20]. Studie provedená v západní části Rakouska prokázala ve 196 vzorcích krve jelenů pozitivitu 5,1 % na *B. divergens* [1]. Z oblasti severní a východní části Tyrolska bylo více než 2,1 % lidí, kteří darovali krev, séropozitivních (IgG) na *B. divergens* [21].

Patogenita druhu *B. odocoilei* zjištěná v krvi jelenů chovaných na farmách nebyla prokázána.

Identita *B. divergens*

B. divergens je nejběžnější a nejvíce patogenní druh pro člověka. Amplifikovaný fragment o velikosti 413 bp z izolátu krve jelena ukázal 100% identitu s 18S rRNA referenčního genu (Acc. No. U16370).

100% identita byla zjištěna u dvou vzorků pacientů s humánní babesiózou ve Španělsku. První byl izolován z krve starší pacientky s intaktní slezinou, která onemocněním podlehl, ve druhém případě se jednalo o případ závažného průběhu onemocnění u imunokompromitovaného muže (Acc. No. MG944238, KF533077) [22, 23].

Shodnost byla také zjištěna v izolátu krve 74leté pacientky s intaktní slezinou v severozápadní části Ruska. Po závažném průběhu s multisystémovým selháním pacientka onemocněním podlehl (Acc. No. MK510929) [24].

100% shoda byla také nalezena v izolátech z klíšťat sajících na skotu v kantonu Ticino ve Švýcarsku (Acc. No. AY 648876, AY 648875) [10].

DISKUSE

Hodnoty prevalence a výskyt jednotlivých druhů babesií byly obdobné jako výsledky jiných prací z České republiky (ČR) a ostatních evropských zemích. První testování klíšťat na přítomnost babesií v ČR provedli pracovníci Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR na jižní Moravě. Rudolf et al. publikoval v roce 2005 článek o výskytu *B. microti* s prevalencí 1,5 % a v roce 2015 Venclíková et al. uveřejnila článek o přítomnosti *B. venatorum* a *B. capreoli*. V klíšťatech městských parků byl index pozitivity 0,4 % a v přírodním lesním ekosystému 1,5 % [25, 26]. V Polsku promořenost klíšťat dosahovala 1,6 % (*B. venatorum*, *B. canis canis*), ve Švýcarsku 0,7–1,7 % (*B. venatorum*, *B. microti*, *B. divergens*) [10, 27]. V Německu proběhla studie testování klíšťat v rekreačních oblastech s hodnotami promořenosti 4,1–6,1 % (*B. venatorum*, *B. capreoli*, *B. microti*, *B. divergens*) [2].

Za účelem vyhodnocení rizika nemocí přenášovaných klíšťaty byly v řadě zemí provedeny studie promořenosti klíšťat více patogeny včetně minoritních. Prevalence převážně duálně infikovaných klíšťat je největší v endemických oblastech severní části USA a Evropy, kde se většina koinfekcí vyskytuje u pacientů s diagnostikovanou lymeskou borreliózou [28].

V letech 2007–2008 proběhla v Nizozemí studie detekce patogenů (metodami PCR) v klíšťatech sajících na lidech a v krvi dobrovolníků po přísátí klíštěte a s erythema migrans. V klíšťatech byla zjištěna prevalence borreliemi ze skupiny *Borrelia burgdorferi* s. l. (způsobující lymeskou borreliózu) 29,0 %, *Neoehrlichia mikurensis* 5,4 %, *Anaplasma/Ehrlichia* spp. 2,5 %, *Babesia* spp. 3,5 % a *Borrelia miyamotoi* (způsobující návratnou horečku) 2,3 %. V případech koinfekcí se ve většině případů jednalo o kombinaci borrelií s jiným patogenem – borrelie s anaplasmou/ehrlíchií 3,2 %, borrelie s babesií 1,0 %, borrelie ze skupiny sensu lato s *B. miyamotoi* způsobující návratnou horečku 0,3 %. Přítomnost patogenů v krvi byla zjištěna u 2,4 % dobrovolníků z celkového počtu 626 vzorků [29].

Studie patogenů v klíšťatech sajících na lidech provedená v Belgii v roce 2017 ukázala na podobné hodnoty infekčnosti klíšťat sledovanými patogeny. Koinfekce byla nalezena u 3,9 % zkoumaných klíšťat, nejběžněji se vyskytující kombinace *B. burgdorferi* s. l. a *Neoehrlichia mikurensis* [30].

Prevalencí patogenů v klíšťatech se zabývá řadu let Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu SZÚ v Praze. Studie z roku 2007, která zjišťovala infekčnost klíšťat na různých místech ČR uvádí promořenost borreliemi ze skupiny *Borrelia burgdorferi* s. l. 17,3 % a *Anaplasma phagocytophilum* 4,4 %. Nejvyšší výskyt anaplasmové infekce v klíšťatech byl v městských parcích v jarních měsících (9,6 %), v podzimních (2,2 %) [31]. Monitorování lokalit v pražských parcích provádě-

děné v posledních letech odhalilo promořenost klíšťat *Borrelia burgdorferi* s. l. 28,0 %, *Anaplasma phagocytophilum* 4,3 %. Nejvyšší hodnota infekčnosti klíšťat borreliemi byla zjištěna v roce 2015, kdy v Prokopském údolí bylo infikováno 60,5 % klíšťat [32].

Koinfikující patogeny mohou změnit účinnost přenosu, způsobit kooperativní nebo kompetitivní interakce patogenů a změnit závažnost onemocnění mezi hostiteli. Modelové pokusy na myších ukazují, že vysoká parazitémie *B. microti* způsobuje nízkou hladinu hemoglobinu u infikovaných myší, která je rovněž pozorována u pacientů s babesiózou. Podobně jako u lidí zvyšuje koinfekce *B. microti* u myší závažnost symptomů podobných lymeské borrelióze. Koinfikované myši *B. burgdorferi* s. l. vykazují nižší parazitémii *B. microti* ve srovnání s myši infikovanými samotnou *B. microti*. To může odrážet zmírnění symptomů babesiózy u některých lidských koinfekcí. Tato zjištění naznačují, že koinfekce *Borrelia burgdorferi* s *B. microti* zmírňuje růst parazitů babesie, zatímco její přítomnost zhoršuje u myší symptomy podobné lymeské borrelióze [33, 34].

Boyer et al. z Institutu bakteriologie Federace translační medicíny Univerzity ve Štrasburku shrnul ve svém článku dosavadní znalosti o koinfekcích mezi *B. burgdorferi* s. l. a jinými patogeny přenášovaných klíšťaty. Z dosud publikovaných údajů vyplývá, že u většiny koinfikovaných pacientů proběhlo onemocnění s klinickými příznaky způsobené jedním patogenem (vlastní jednomu patogenu), proti druhému patogenu byla prokázána séropozitivita. Současný průběh infekcí (klinický průběh dvou aktivních nemocí) způsobený dvěma patogeny byl vzácný. K nejběžněji hlášeným případům koinfekcí patří klíšťová encefalitida a neuroborrelióza. Rovněž výskyt vysoké horečky u pacientů s erythema migrans může naznačovat souběžnou infekci dalším patogenem přeneseným klíštětem, nejčastěji *Anaplasma phagocytophilum*. Z dosud známých údajů vyplývá, že koinfekce se nejčastěji projevuje ve dvou případech:

- pacienti s klinickými příznaky lymeské borreliózy a s erythema migrans doprovázené vysokou horečkou byli koinfikováni *A. phagocytophilum*, virem klíšťové encefalitidy, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *B. miyamotoi* a
- pacienti s neurologickými symptomy virem klíšťové encefalitidy nebo Powassan virem [35].

ZÁVĚR

Molekulárními metodami byly na území ČR v klíšťatech a krvi vybraných živočichů detekovány tři patogenní druhy babesií pro člověka. V klíšťatech pražských parků byly zjištěny druhy *B. microti* a *B. venatorum*, v krvi jelenů žijících ve volné přírodě Krkonošského národního parku *B. divergens*. V krvi jelenů chovaných na farmách nebo oborách a v krvi psů patogenní druhy pro člověka zjištěny nebyly. Sekvence PCR amplifiko-

vaných úseků 411–452 bp ukázala 100% podobnost s 18S rRNA geny babesíí, které byly zjištěny v izolátech pacientů s babesiózou a v izolátech klíšťat z evropského regionu (publikované údaje). Ačkoli se humánní babesióza vyskytuje v Evropě sporadicky, riziková je pro asplenické a imunokompromitované pacienty. V ČR byl dosud zaznamenán případ importované nákazy z USA [36] a přenos nákazy krevní transfuzí připomínající Reiterův syndrom [37].

Zprávy Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí uvádí, že dosud bylo v Evropě uveřejněno 39 klinicky závažných případů lidské babesiózy přisuzované *B. divergens*, *B. venatorum* a *B. microti*.

Infekce způsobené minoritními patogeny (anaplasmóza, babesióza, riketsióza) jsou méně běžné a v některých případech opomíjené. Zjištěné koinfekce s borelií mohou být příčinou komplikovaného průběhu onemocnění. Pravděpodobnost nákazy více patogeny se doporučuje zvážit při léčbě pacientů s lymeskou boreliózou, u kterých se výrazně projevují příznaky podobné chřipce (zvláště mimo chřipková období), vykazují nevysvětlitelnou splenomegalii, anemii, trombocytopenii nebo selhání odpovědi na antimikrobiální terapii zaměřenou proti *B. burgdorferi* s.l. [33, 34]. V případě neurologických příznaků zvážit koinfekci s virem klíšťové encefalitidy [35]. Jak často tyto infekce způsobují symptomy onemocnění nebo do jaké míry ovlivňují koinfekce průběh lymeské boreliózy, potřebuje další šetření.

LITERATURA

- Cézanne R, Mrowietz N, Eigner B, et al. Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in red deer (*Cervus elaphus*) in Western Austria. *Molecular and Cellular Probes*, 2017;31:55–58.
- Silaghi C, Woll D, Hamel D, et al. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents-Analyzing the host-pathogen-vector interface in metropolitan area. *Parasit Vectors*, 2012;5:191.
- Zimmer AJ, Simonsen KA. Babesiosis. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health, StatPearls Publishing 2021.
- Yabsley MJ, Shock BC. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 2013;2:18–31.
- Vichová B, Horská M, Blaňarová L, et al. First molecular identification of *Babesia gibsoni* in dogs from Slovakia, central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2016;7(1):54–59.
- Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, et al. Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42:8.
- Hildebrandt A, Zintl A, Montero E, et al. Human Babesiosis in Europe. *Pathogens*, 2021;10,1165:1–29.
- Krause PJ. Human babesiosis. *Int J Parasitol*, 2019;49(2):165–174.
- Iyer S, Goodman K. Congenital babesiosis from maternal exposure: a case report. *The Journal of Emergency Medicine*, 2019;56:39–41.
- Casati S, Sager H, Gern L, et al. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*, 2006;13:65–70.
- Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, et al. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007;26:595–601.
- Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, et al. First case of human babesiosis in Germany – Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*, 2007;297:197–204.
- Vichová B, Miterpáková M, Iglódyová A. Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis canis* in *Dirofilaria*-positive dogs from Slovakia. *Vet Parasitol*, 2014;16;203(1–2):167–172.
- Smith FD, Ellse L, Wall R. Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks infesting dogs in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 2013;198:18–23.
- Beck R, Vojta L, Mrljak V, et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol*, 2009;39:843–848.
- Hamel D, Silaghi C, Lescai D, Pfister K. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol Res*, 2012;110:1537–1545.
- Hartelt K, Rieker T, Oehme RM, et al. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2007;7(2):163–166.
- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, 2013;6:1.
- Mosqueda J, Olvera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamú G, Canto GJ. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr Med Chem*, 2012;19(10):1504–1518.
- Zintl A, Finnerty E, Murphy TM, et al. Babesias of red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland. *Veterinary Research*, 2011;42:7.
- Sonnleitner ST, Baumgartner R, Edelhofer R, et al. Are *Babesia* a risk factor for blood products in an alpine area? *Parasites & Vectors*, 2014;7:037.
- Asensi V, González LM, Fernández-Suárez J, et al. A fatal case of *Babesia divergens* infection in Northwestern Spain. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2018;9:730–734.
- Gonzalez LM, Rojo S, Gonzalez-Camacho F, et al. Severe babesiosis in immunocompetent man, Spain, 2011. *Emerg Infect Dis*, 2014;20(4):724–726.
- Kukina IV, Zelya OP, Guzeeva (tm), et al. Severe babesiosis caused by *Babesia divergens* in a host with intact spleen. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2019;10:101262.
- Rudolf I, Golovchenko M, Šikutová S, et al. *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic. *Folia Parasitologica*, 2005;52:274–276.
- Venclíková K, Mendel J, Betasova L, et al. First evidence of *Babesia venatorum* and *Babesia capreoli* in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2015;22:212–214.
- Cieniuch S, Stańczak J, Ruczał A. The first Detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 2009;58:231–236.
- Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, et al. Coinfections Acquired from *Ixodes* Ticks. *Clinical microbiology reviews*, 2006;19(4):708–727.
- Jahfari S, Hoffhuis A, Fonville M, et al. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2016;1–15. doi:10.1371.
- Lernout T, De Regge N, Tersago K, et al. Prevalence of pathogens in ticks collected from humans through citizen science in Belgium. *Parasites Vectors*, 2019; 12:550:1–11.
- Kybicová K, Bašťová K, Malý M. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks *Ixodes ricinus* from the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2017;8(4):483–487.
- Richtrova E, Michalová P, Lukavská A, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban green areas in Prague. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2022;13:1–6.
- Bhanot P, Parveen N. Investigating disease severity in an animal model of concurrent babesiosis and Lyme disease. *International Journal for Parasitology*, 2019;49:145–151.
- Diuk-Wasser MA, Vannier E, Krause PJ. Coinfection by the tick-borne pathogens *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi*: ecological, epidemiological and clinical consequences. *Trends Parasitol*, 2016;32(1):30–42.

35. Boyer PH, Lenormand C, Jaulhac B, et al. Human Co-Infections between *Borrelia burgdorferi* s.l. and Other *Ixodes*-Borne Microorganisms: A Systematic Review. *Pathogens*, 2022;11,282:1–12.
 36. Nohýnková E, Kubek J, Měšťánková O, et al. Případ infekce *Babesia microti* importované do České republiky z USA. *Časopis lékařů českých*, 2003;6:377–381.
 37. Strizova Z, Havlova K, Patek O, et al. The first human case of babesiosis mimicking Reiter's syndrome. *Folia Parasitologica*, 2020;67:031.
-

Do redakce došlo dne 11. 1. 2024.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Kateřina Kybicová, Ph.D.

Národní referenční laboratoř pro lymeskou boreliózu CEM

Státní zdravotní ústav

Šrobárova 49/48

100 00 Praha 10

e-mail: katerina.kybicova@szu.cz

Th17 lymphocytes and Interleukin-17A during the course of severe community acquired pneumonia, comparison with etiology and outcome

Moravec M.^{1,2}, Nejtek T.^{1,2}, Ibrahimová M.¹, Zazula R.¹, Müller M.¹

¹Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

²Department of Anesthesiology and Intensive Care, First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer University Hospital, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Objective: Observational study of patients diagnosed with severe community acquired pneumonia (sCAP) carried out to evaluate levels of interleukin 17A (IL-17A) and T helper 17 (Th17) lymphocyte count in peripheral circulation and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the early course of sCAP of different etiology and to compare them with patient's characteristics and outcome.

Material and methods: Cohort of 74 patients with sCAP was analyzed and respective microbial etiology established. According to pathogens, 3 subgroups of patients were created: bacterial, viral and mixed etiology. Th17 count and IL-17A levels were measured using flow cytometry and ELISA in peripheral blood and BALF. Data were compared with respect to etiology and their correlation with 30- and 90-day mortality was statistically analyzed.

Results: There was no statistically significant correlation in Th17 count and IL-17A levels in blood and BALF between etiological subgroups of CAP and no correlation was found with respect to measured parameters and 30- and 90-day mortality. Nevertheless, increased Th17 cell count and IL-17A levels in peripheral blood, but not in BALF, in the early course of sCAP are correlated with increased relative risk of death from sCAP. Other factors increasing relative risk of death in patients with sCAP found in our cohort were male sex and advanced age.

Conclusions: Systemic Th17 count and IL-17A levels in the early course (up to 7 days from admission) of sCAP may be correlated with severity and outcome of sCAP.

KEYWORDS

severe community acquired pneumonia (sCAP) – Th17 lymphocytes – Interleukin-17A

SOUHRN

Moravec M., Nejtek T., Ibrahimová M., Zazula R., Müller M.: Th17 lymfocyty a interleukin-17A v průběhu těžké komunitní pneumonie, srovnání s etiologií a výsledkem

Cíl: Observační studie pacientů diagnostikovaných s těžkou komunitní pneumonií (sCAP) sledovala hladiny interleukinu-17A a počtu T helper 17 (Th17) lymfocytů v periferní cirkulaci a tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) v časném průběhu komunitní pneumonie různé etiologie a porovnávala je s charakteristikami pacientů a klinickým výsledkem.

Materiál a metody: Kohorta 74 pacientů s těžkou komunitní pneumonií byla analyzována s identifikací jednotlivých původců pneumonie. Podle etiologie byli pacienti rozděleni do tří skupin: bakteriální, virové a smíšené etiologie. Počet Th17 lymfocytů a koncentrace IL-17A byly měřeny s využitím průtokové cytometrie a metody ELISA v periferní krvi a tekutině z BAL.

Data byla porovnána podle etiologie sCAP a statistickou analýzou stanovena jejich korelace s 30- a 90denní mortalitou.

Výsledky: Statistická korelace mezi počtem Th17 lymfocytů a koncentrací IL-17A v krvi ani v tekutině z BAL s 30- a 90denní mortalitou nebyla prokázána. Nicméně, zvýšený počet Th17 lymfocytů v periferní cirkulaci, nikoli však v tekutině z BAL, v časném průběhu sCAP koreloval se zvýšeným relativním rizikem úmrtí. Dalšími faktory zvyšujícími relativní riziko smrti byl věk a mužské pohlaví.

Závěr: Hladiny Th17 a IL-17A v systémové cirkulaci v časném průběhu sCAP (v prvních 7 dnech od diagnózy) mohou korelovat s tíží a mortalitou sCAP.

KLÍČOVÁ SLOVA

těžká komunitní pneumonie (sCAP) – Th17 lymfocyty – interleukin-17A

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 131–139
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138064>

INTRODUCTION

Community acquired pneumonia (CAP) is one of the leading causes of death worldwide. According to the data from Randomized, Embedded, Multi-factorial Adaptive Platform Trial for Community Acquired Pneumonia (REMAP – CAP) platform the annual death toll was estimated at 3 million in 2016. Interestingly, pneumonia as a syndrom itself causes 50% of all cases of sepsis and septic shock [1]. The economic burden of its treatment is enormous and widespread use of antibiotics as a first line treatment is responsible for collateral phenomenon of increasing microbial resistance. The incidence of CAP varies according to different sources between 500–2500 cases per 100000 [2–4]. For developed European countries we can take as a qualified guess for incidence and mortality of CAP recent data (2015) from Germany. The study showed incidence of CAP in adults older then 18 years as 1,054 cases per 100,000 person-years of observation. In adults aged 16 to 59 years, incidence was 551 (with a hospitalization rate of 17%). In adults aged more than 60 years, the respective incidence was 2,032 (with a hospitalization rate of 52%). High mortality of hospitalized CAP in adults older than 18 was observed in-hospital (18.5%), at 30 days (22.9%) and at one-year (44.5%) after CAP onset. Mortality was more than double in older adults in comparison to younger patients [5].

CAP, defined as a lung infection contracted outside hospital settings, is diagnosed using clinical (acute onset of fever, dyspnea, cough, pleuritic chest pain, rales) and radiological (abnormal chest radiograph or CT scan with either lobar, multilobar consolidation or interstitial changes) findings. Severe community acquired pneumonia (sCAP) is subset of CAP (about 10–20% of all CAP) with significantly higher morbidity and mortality requiring hospital and often Intensive Care Unit (ICU) admission. The mortality rate for sCAP is estimated in the range between 16–50% [6–8]. For the diagnosis of sCAP, the most commonly used criteria are those of Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society (IDSA/ATS) 2007 guidelines for sCAP stating that CAP is determined as severe when fulfilling 1 major (out of 2) or 3 minor (out of 9) criteria published in the document [9].

Together with clinical and radiological findings, numerous laboratory parameters are being used to support diagnosis of CAP, to guide clinical management and to predict severity of the disease and its outcome. Although generally accepted definition of CAP presumes immunocompetent host with acute pulmonary infection, interindividual differences in immune system among patients (age, vaccination etc.), variable genetic makeup of innate and adaptive immunity in population and potential subclinical immune challenges prior to contraction of pneumonia make immunological studies in the course of CAP very intriguing tool for

personalized approach to clinical management. Recently, thanks to extensive experimental and clinical research in immunology, new elements of immune system emerged which can be used alongside common parameters, i.e. white blood cells (WBC), neutrophils, lymphocytes, immunoglobulins etc., to precise our prognostic abilities and improve patients' outcomes by guiding conventional and immunomodulatory therapy when available and appropriate.

Such parameters with relevance to sCAP seems to be, apart from many others, CD4+ T helper 17 (Th17) lymphocytes and its signature cytokine, interleukin-17A (IL-17A) [10–13].

Th17 cells is a subset of Th CD3+/CD4+ and together with Th1 and Th2 are part of the family of T helper lymphocytes. Th17 were discovered in 2005 and their role in immunity is intensively studied. Th17 reside predominantly in the lamina propria of the mucosa. Their main function is protecting mucosal barrier against invading pathogen and thus are important players in defence mechanisms against acute infections including pneumonia. However, if the regulatory mechanisms fail to control their primary function, they can become immunopathogenic and are involved in inflammatory pathways of some autoimmune disorders and chronic inflammatory diseases [14,15]. Th17 produces cytokines IL-17 and IL-22.

IL-17A, member of IL-17 cytokine family IL-17A-F, is proinflammatory cytokine which is produced by many cellular components of immune system apart from Th17 cells. These are gamma/delta T cells, cytotoxic CD8+ T lymphocytes, natural killer T cells (NKT), mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, innate lymphoid cells (ILC), and also neutrophils. IL-17 plays essential roles in protecting the host lung from bacterial and fungal infections and in maintaining the barrier integrity of the lung epithelial mucosa [16–19]. Its main function is induction of granulocyte colony – stimulating factor (G-CSF) and chemokines, which promotes neutrophil accumulation and activation at the infected site. Moreover, together with IL-22, IL-17 increases the expression and release of antimicrobial peptides, e.g. defensins and lipocalin 2. Both mechanisms are responsible for subsequent microbial clearance from invading pathogen. On the other hand, IL-17 can activate other inflammatory pathways and may play a detrimental role in autoimmune diseases, such as asthma or allergic pneumonitis, for which it became a target for immunotherapy. Th17 activation is downregulated by many different pathways, among others by T regulatory lymphocytes (T reg) and IL-23 [14, 20].

Primary aim of this study was to evaluate selected parameters of cellular immunity and cytokine response and their dynamics in peripheral blood and in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and to compare them with clinical characteristics of patients with sCAP. By thorough analysis of the results find out, whether these

parameters may predict clinical course and outcome of sCAP.

Secondary aim was to evaluate potentially different patterns of Th17/IL-17A immune response with respect to individual pathogens causing sCAP. The change in microbiological landscape for CAP during Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic coinciding with the study timeframe enable us to compare atypical/viral COVID-19 associated sCAP with other sCAP pathogens.

And the tertiary objective of the study was to test feasibility and clinical applicability of expanded immunological screening of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid for the clinical management of severe pulmonary infections.

METHODS

Study protocol and population

Single centre prospective observational study was carried out in the ICU of The Department of Anesthesiology and Resuscitation of Thomayer University Hospital in Prague, Czech Republic from March 2020 to August 2023 and was approved by the Ethical Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and the Thomayer University Hospital. Adult patients (> 18years) diagnosed with sCAP according to IDSA/ATS criteria were included (Table 1). Exclusion criteria were as follows: moribund patient not expected to survive more than 24 hours from admission, patients deemed to contract pneumonia in health care settings (HCAP), patients with known immunodeficiency, active tuberculosis, patients with cystic fibrosis.

All patients received standard treatment according to national and international guidelines for the treatment of sCAP and time relevant recommendations for COVID-19 pneumonia management. Data collection and clinical characteristics were recorded according to study protocol. Whenever possible, informed consent was sought from the patients or their next of kin. On admission to ICU (time T0), predefined set of microbiological, laboratory and radiological investigations was done according to study protocol. The same procedure was repeated from day 1 (D1) till day 7 (D7) of ICU or hospital stay. Th17 count in peripheral blood and IL-17A in serum were measured on D1, D3 and D7 following admission to ICU. Together with laboratory tests, all relevant clinical variables were measured and all cause mortality at day 30- and 90-day were recorded. Patients' co-morbidities were assessed and thoroughly documented.

On D1, when clinically appropriate, bronchoalveolar lavage was performed using flexible bronchoscope, three 40 ml aliquots of saline were instilled and then gently aspirated from the area corresponding with consolidation found on chest X-ray or in case of inter-

Table 1. IDSA-ATS sCAP criteria

Minor criteria
Respiratory rate ≥ 30 breaths/min
PaO ₂ /FiO ₂ ratio < 250 torr
Chest X-ray: Multilobar infiltrates
Confusion/desorientation
Blood urea nitrogen > 20 mg/dL
Leukopenia (WBC < 4000 cells/mm ³)
Thrombocytopenia (platelet < 100 000 mm ³)
Hypothermia (core temperature < 36 °C)
Hypotension (Systolic blood pressure < 90 mmHg) requiring aggressive fluid resuscitation
Major criteria
Invasive mechanical ventilation
Septic shock with the need for vasopressors

stitial pattern of pneumonia from the right middle pulmonary lobe. First aspirated BALF was used for culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) investigation, 2 remaining aspirates were mixed and sent immediately for immunological analysis into the lab.

Control group of healthy volunteers comprised of 20 subjects with no evidence of acute infection or inflammatory process and unknown immune disorder. Peripheral blood Th17 cells count and serum concentration of IL-17A was investigated as one-off measurement in all of them.

Microbiology studies

Microbial pathogen investigation included RT-PCR (Real-time PCR) testing from nasopharyngeal swab, tracheal aspirate or BALF using commercial multiplex kit for respiratory pathogens, single RT-PCR tests for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) or respiratory viruses kit for Influenza A and B, SARS-CoV-2 or Respiratory Syncytial Virus (RSV) combined. All tests were performed at T0 or D1. Moreover, 2 sets of blood cultures were drawn at the time of admission to ICU, tracheal aspirate or sputum were obtained for culture and sent to microbiology for testing. And finally, urinary antigen tests for Legionella pneumophila and Streptococcus pneumoniae were done on admission to ICU. Definitive diagnosis of pathogen was made by combination of the test results and clinical judgment of infectious disease specialist/microbiologist and senior investigator.

Immunology

Flow cytometry analysis

Flow cytometry was used to identify and quantify Th17 cells based on specific surface marker CD4 on T cells and intracellular cytokine IL-17A. The cells were analyzed using a DxFlex flow cytometer (Beckman

Coulter). All reagents used were purchased from BD Biosciences. For each sample, a minimum of 100,000 lymphocyte-gated events were acquired and analyzed using CytExpert software (Beckman Coulter). The gating strategy was based on the selection of single-cell cell populations and gating CD3+ T cell populations. From this population, we expressed the percentages of positive CD4+ IL-17A+ cells.

IL-17A ELISA

The Human Interleukin-17A (IL-17A) High-Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure the concentration of extracellular IL-17A according to the manufacturer’s instructions (ThermoFisher Scientific). The assay utilizes a sandwich enzyme immunoassay technique for the quantitative measurement of IL-17A in pg/mL. Serum and BAL samples were collected from a cohort of participants and stored at -80 °C until analysis. ELISA was performed using a DSX instrument (Dynex Technologies). Absorbance was measured at 450 nm, and IL-17A concentrations in samples were determined by interpolation from the standard curve using DSX software.

Statistics

Unless specified in text otherwise, continuous data are presented as median (1st quartile-3rd quartile), categorical data are displayed as frequency/percentage. For comparison of non-parametric data Wilcoxon/Kruskal-Wallis’ test was used. For post-hoc analysis, Wilcoxon rank sum test with continuity correction was performed. For the discrete data comparison we used Chi-squared test. Pearson correlation analysis was used for evaluation of two quantitative variables correlation. The impact of selected variables on survival was analyzed using Cox’s regression analysis of survival. P value ≤ 0.05 was considered as statistically significant. For all statistical analyses software R 4.3.3 (The R Foundation, Vienna, Austria) with build-up R-Studio 2024.04.0+735 (Posit Software, PBC, Boston, MA, USA) was used.

RESULTS

A total of 74 patients with the diagnosis of sCAP were included in the study out of 80 recruited by inclusion criteria. 5 excluded patients were found having different diagnosis – non pulmonary sepsis, pulmonary edema or heart failure. One patient was excluded for ongoing hematological malignancy. The majority of patients were male (54M vs 20F). The average age of patients was 64.9 years.

46 patients had SARS-CoV-2 associated pneumonia, 28 non COVID-19 sCAP. For statistics and comparisons of the data the study population was divided in 3 pathogen groups: viral (38 SARS-CoV-2, 1 influenza A),

mixed viral and bacterial pneumonia (11 patients, 8 with SARS-CoV-2, 3 of other viral etiology) and finally, bacterial pneumonia (20 patients). In 4 patients the causing pathogen was unknown. The pathogens of sCAP are displayed in Table 2. Mortality according to etiology on day 30 and 90 post admission to ICU is shown in Table 3.

Table 2. The pathogens of Scap

Pathogen	N (%)
SARS-CoV-2	46 (51)
Staphylococcus aureus	10 (11)
Streptococcus pneumoniae	7 (8)
Legionella pneumophila	5 (5)
Haemophilus influenzae	3 (3)
Klebsiella pneumoniae	3 (3)
Streptococcus pyogenes	3 (3)
Enterobacter cloacae	2 (2)
Influenza A	2 (2)
Streptococcus agalactiae	2 (2)
Acinetobacter sp.	1 (1)
Escherichia coli	1 (1)
Chlamydia pneumoniae	1 (1)
Morganella morganii	1 (1)
Human metapneumovirus	1 (1)
Parainfluenza	1 (1)
Serratia sp.	1 (1)

Table 3. Overall mortality according to etiology day 30 and 90 post admission

Mortality	Total	Bacterial	Mixed	Viral
30-day	0,36	0,3	0,36	0,38
90-day	0,49	0,4	0,45	0,54

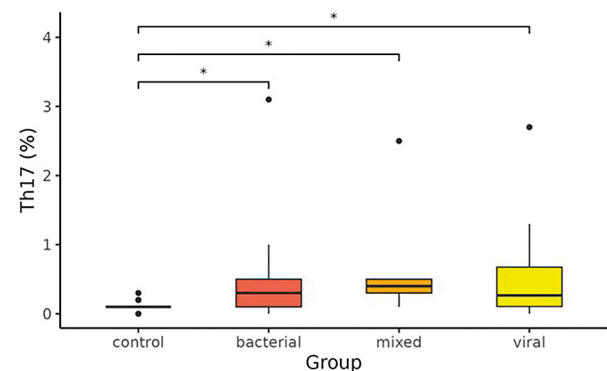


Figure 1. Th17 count in peripheral blood (% of total count of T-lymphocytes)

Comparison of control group with values in study groups on Day 1. Star indicates statistical significance.

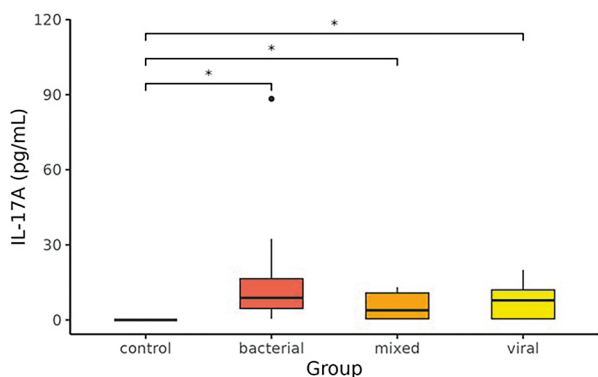


Figure 2. IL-17A serum concentration (pg/mL) Comparison of control group with values in study groups on Day 1. Star indicates statistical significance.

When compared to control group, Th17 subset counts (% of T lymphocytes) in peripheral blood (Figure 1) and IL-17A serum levels (pg/mL) (Figure 2) showed increased activation throughout T0 to D7.

Th17 counts in peripheral blood on D1, D3 and D7 and their respective values in different pathogen groups is shown in Table 4.

Table 4. Th17 count in peripheral blood (% of total count of T-lymphocytes)

Group	Day 1	Day 3	Day 7
Bacterial	0.85 (0.23–1.62)	0.30 (0.20–0.60)	0.30 (0.10–0.50)
Mixed	0.50 (0.20–2.00)	0.65 (0.48–1.20)	0.40 (0.30–0.50)
Viral	0.31 (0.10–0.60)	0.20 (0.10–0.45)	0.26 (0.11–0.67)
Control	0.10 (0.10–0.10)	–	–

IL17-A serum levels on D1, D3 and D7 according to pathogen group is shown in Table 5.

Table 5. IL-17A serum concentration (pg/mL)

Group	Day 1	Day 3	Day 7
Bacterial	10.05 (4.86–18.24)	8.81 (4.59–16.47)	8.94 (0.90–14.96)
Mixed	4.92 (1.92–10.20)	3.87 (0.47–10.77)	1.90 (0.47–5.17)
Viral	6.26 (0.47–10.55)	7.84 (0.47–12.00)	3.84 (0.47–6.99)
Control	0.00 (0.00–0.00)	–	–

Th17 and IL-17A in BALF was measured on D1 in 29 (Th17), resp. 31 (IL-17A) patients.

The data for Th17 and IL-17A in BALF are shown in Table 6.

Table 6. Th17 lymphocytes count (% of total count of T-lymphocytes) and IL-17A concentration (pg/mL) in bronchoalveolar lavage fluid on Day 1 according to etiology of sCA.

Group	Th17	IL-17A
Bacterial	1.40 (0.05–3.30)	3.61 (1.70–16.98)
Mixed	0.05 (0.00–3.22)	2.14 (0.47–9.03)
Viral	1.41 (0.33–2.40)	3.34 (1.84–7.08)

Statistically significant difference in Th17 count and IL-17A levels between pathogen groups was not found. Analysis of BALF on D1 showed high variability of Th17 activation and IL-17A signaling in all pathogen groups. Nevertheless, we did not observe any correlation between Th17 and IL-17A in BALF and mortality in all pathogen groups. Also, there was no correlation between BALF Th17 counts and IL-17A levels and their respective counterparts in systemic circulation (Figure 3–6).

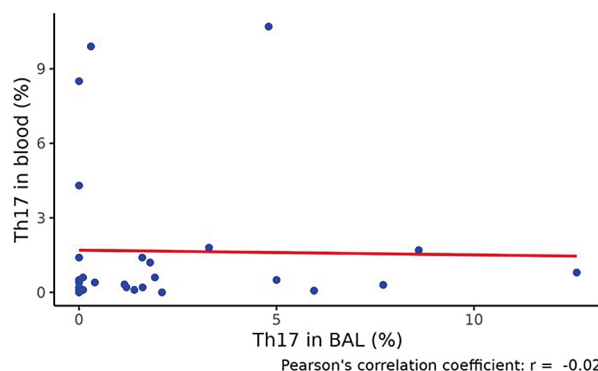


Figure 3. Correlation between Th17 lymphocytes count (% of total count of T-lymphocytes) in blood and in bronchoalveolar fluid

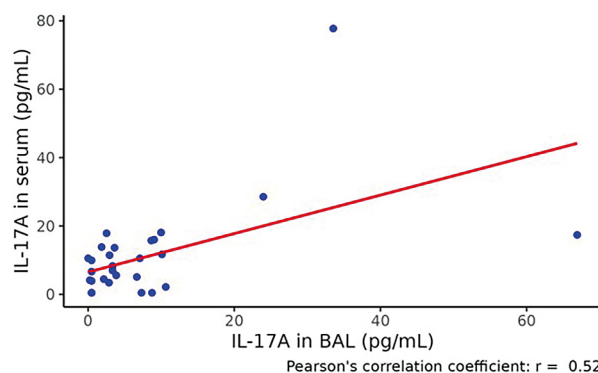


Figure 4. Correlation between IL-17A concentration (pg/mL) in serum and bronchoalveolar fluid

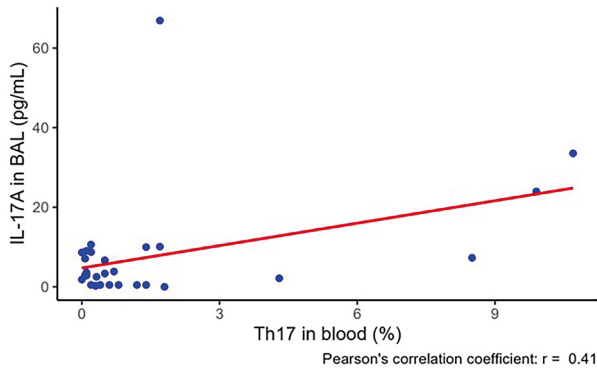


Figure 5. Correlation between Th17 lymphocytes count (% of total count of T-lymfocytes) in blood and IL-17A concentration (pg/mL) in bronchoalveolar fluid

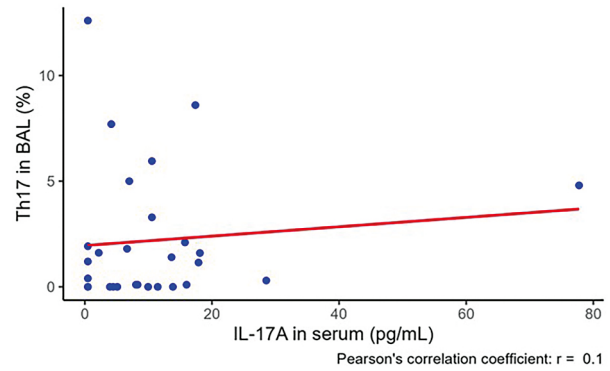


Figure 6. Correlation between IL-17A serum levels (pg/mL) and Th17 lymphocytes count (% of total count of T-lymfocytes) in bronchoalveolar fluid

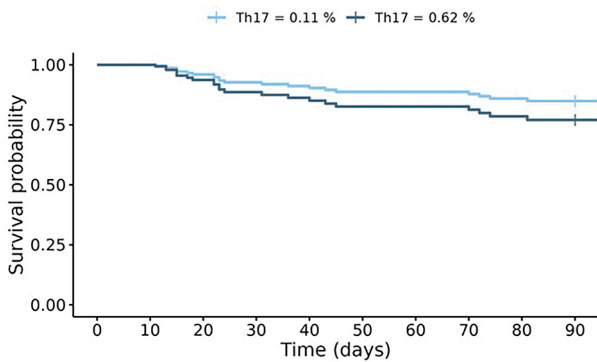


Figure 7. Effect of Th17 lymphocytes count (% of total count of T-lymfocytes) in blood on Day 7 on survival (Cox proportional hazards model)
Th17 values are chosen as 1st quartile and 3rd quartile.

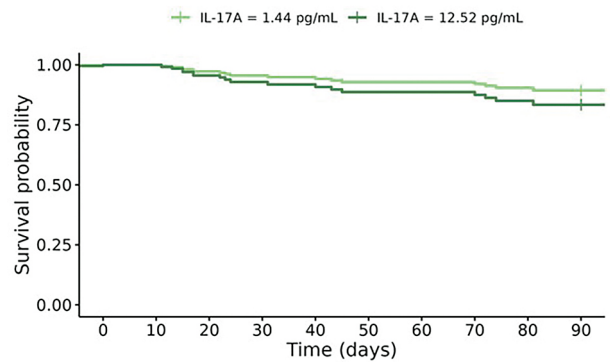


Figure 8. Effect of IL-17A serum levels (pg/mL) on Day 3 on survival (Cox proportional hazards model)
IL-17A concentration values are chosen as 1st quartile and 3rd quartile.

Age, gender, IL-17A serum levels on D3 and Th17 count in peripheral blood on D7 were found as parameters increasing relative risk (RR) of death (Table 7, Figure 7-8).

Table 7. Statistically significant results of Cox survival analysis

Factor	Relative risk of death	p-value
Age	1.06	< 0.001
Male sex	2.6	0.04
Th17 count in blood on Day 7	2.66	0.004
IL-17A serum concentration on Day 3	1.04	0.01

DISCUSSION

There is no doubt that community acquired pneumonia is very complex inflammatory and immunological process and detailed insight in host/defense

interaction and its dynamic in the course of the disease may reveal new aspects in diagnostics and the management of the disease. Nevertheless, the information about diagnostic and prognostic relevance of these immune parameters in clinical settings and their possible impact on patient's outcomes is scarce.

The main finding of the study is evidence of increased activation of Th17 cells in peripheral circulation and marked increase of IL-17A levels in serum of study subjects when compared to control group. Moreover, apart from the expected age and gender correlation with mortality, we have observed in longitudinal analysis of Th17 and IL-17A in systemic circulation statistically significant increased relative risk of death for IL-17A level on D3 and Th17 count on D7 using combined data from study population.

The study showed very high mortality in our cohort. This is even more pronounced in patients with SARS-CoV-2 associated sCAP, the mortality in this group was extremely high overreaching 50% point. The mortality rates are nevertheless in accordance with the data published in the recent literature. Dutch study compared in

the cohort of more than 10000 patients ICU and in-hospital mortality of ICU patients over 70 years of age for COVID-19 and non-COVID-19 (viral and bacterial) pneumonia. They observed significantly higher ICU and hospital mortality rate for COVID-19 (39.7% and 47.6%) vs bacterial (19.5% and 28.6%) and non-SARS-CoV-2 viral pneumonia (20,7% and 28,9%) from pre COVID-19 era. Comparison of mortality rate from the same period during COVID-19 pandemics with non-COVID-19 pneumonias showed very similar results [21]. Interestingly, the other study on mortality of over 1800 mechanically ventilated patients for COVID-19 and non-COVID-19 pneumonia did not find significant difference in 90-day mortality between both groups when subjected to complex adjusted analysis of both cohorts (40.2% and 38%). The study cohort though had lower average age (61 years) and included only mechanically ventilated patients [22].

Not surprisingly, the advanced age was found to be a major factor for excessive mortality of sCAP in our cohort. This finding is supported by large number of published studies on sCAP outcome. The obvious explanation for increase vulnerability of older patients to sCAP is immunosenescence, decreased functional reserve and increased number of co-morbidities in this subgroup [23]. There seem to be an interesting point related to findings of our study and possible connection between age and Th17 immunity. According to some investigators, typical pattern of Th17 response in advanced age is increased Th17 levels in elderly patients, absolute or relative in Th cell compartment. Moreover, most of the patients in this age group has decreased T regulatory lymphocytes (Treg) count, which may be an explanation for prolonged Th17 response with limited Treg opposing downregulation of activated Th17 cells in the setting of sCAP in older patients. Elderly thus may be primed to shift the initial protective role of Th17 in the course of the disease to harmful prolonged inflammation of the lungs with consequent unfavorable outcome [24–26]. Female gender was found by most published data as a protective factor for sCAP mortality [27]. There is many possible explanations for this observation, hormonal differences between sexes and increased number of co-morbidities in males being among the leading ones. And again, with respect to Th17 role in host/pathogen interaction in pneumonia, we can find intriguing link between estradiol and Th17. Estradiol seems to curb Th17 activation in the tissues and may be the protective factor against hyperinflammation leading to increased mortality from CAP [25].

Our data showed very low counts of Th17 in peripheral blood of healthy individuals, lower than the most literature sources published recently [24,26]. The explanation may be related to flow cytometry methodology. We were able to quantify the presence of intracellular and extracellular IL-17 in unstimulated human cells and serum, providing a objective snapshot of immune re-

sponses in sCAP. However, the use of unstimulated cells brings along the disadvantage of analyzing a lower number of cells. Additionally, unlike other studies using gating strategy related to CD4+ T cells, we express the population of CD4+IL-17+ positive cells (Th17) as a percentage of the total CD3+ lymphocytes (T cells).

Some authors present Th17 cells count as a absolute number of cells rather than a proportionate count. On the other hand quoting percentage number for T cells subset is widely used in the literature on this topic [24,26,28,29]. We felt that proportion of Th17 cells in total T cell count will reflect better potential expansion of this Th cell lineage in the course of sCAP and being aware of low yield of total detected count of Th17 cells we opted for proportionate display of the result in line with majority of published work. The same approach was used in the study conducted by Brunialti group in 2012 in septic patients in comparison with healthy volunteers with respect to immunocyte counts [30].

Nevertheless, we used this method for all analyzed samples including controls throughout the study and therefore we believe the results are objective and presentable. The accuracy of results for IL17A levels is robust, it was measured by commercial ELISA kit and there were strict rules for samples handling and processing.

As expected, in majority of subjects, we found significant activation of both Th17 cells and IL-17A in peripheral circulation in the early course of sCAP in comparison with control group. The findings of IL-17A levels on D3 and Th17 counts on D7 correlating with relative risks of death deserves further attention. They represent one of the hallmarks of our study. From the extensive information about ambivalent roles of Th17 and IL-17A in the setting of acute lung infection we can explain our data as evidence for increasingly harmful role of Th17/IL-17A signalling during the course of the disease process [25, 31]. When initial protective mechanism of Th17/IL-17A response is not downregulated in time, it may cause sustained pro-inflammatory state with tissue damage and increased mortality. Similar results were reported by Brunialti et al. observing sustained elevation of Th17 cells in blood on D7 of treatment in septic patients in non-survivors and its decrease on D7 in survivors. The study included healthy controls and there was over 40% of patients with pulmonary sepsis in septic cohort [30].

Th17 and IL-17A expression in other types of inflammation, infection and sepsis is described in many experimental studies on rodents, mainly in the model of pneumonia or peritonitis induced by cecal ligation. Number of human studies on systemic Th17/IL-17A response in non-pulmonary sepsis is limited. Elevated Th17 and IL-17A were found in patients with burns and this finding was correlated with increased susceptibility to infection and sepsis [32,33]. Similarly, increased levels of IL-17A were observed following myocardial

infarction with ischemia/reperfusion injury. Costa studied Th derived cytokines in peripheral blood in first two weeks of sepsis diagnosis and found surprisingly low levels of IL-17A [34]. These studies support organ related source of IL-17A, either gamma/delta T cells or Th17 cells increasing IL-17A production induced by inflammatory insult.

The findings of Th17 and IL-17A in BALF deserves further comment. Overall, we did not find any relevance of Th17 counts or IL-17A levels in BALF with the disease course and mortality of studied population. No statistically significant differences were detected even between the pathogen subgroups. And finally, there was no significant correlation between tissue (lung) and systemic (peripheral) blood Th17 count and IL-17A levels and pneumonia etiology or patient's characteristics. The first possible explanation is low number of patients in BALF cohort (31), obvious obstacle for statistical significance. Secondly, collecting BAL fluid for quantitative analysis remains cumbersome. The results depending on the technical skills, appropriate choice of the lung region, the amount of retracted fluid among other factors. Counting cells and measuring substance levels in such samples even following strict BALF protocol for interindividual comparison is questionable. And third possible explanation is that the data are correct and objective, and they only represent differences in patient's phenotypes, as well as pathogen related mucosal response set-up telling us, that the consistent and predictable Th17/IL-17A activation in sCAP at the mucosal site cannot be found. There is interesting point though. Lowest, although not clinically significant Th17 count was found in mixed (viral and bacterial) etiology group. Viral pathogen presumably preceded bacterial superinfection, so we can speculate, that this may be an explanation for depleted mucosal Th cellular compartment when bacterial infection occurs. This difference was not observed in BALF IL-17A levels. Again, speculative, but viable explanation may be other sources of IL-17A found in BALF, which were not affected by previous viral invasion of the mucosa (neutrophils, monocytes, MAIT cells etc.) [35, 36].

Based on our data, we cannot provide sufficient evidence of different pattern of mucosal and systemic response in Th17/IL-17A axis and its correlation with pneumonia course and outcome. The data showed very heterogeneous data from mild to very strong activation and signalling in both compartments (BALF and peripheral blood), but no correlation with either clinical characteristics neither specific pathogen were observed.

To support our findings and for illustration of the complexity of immune response to acute pneumonia, we can extrapolate the data gathered during COVID-19 pandemics. Immunological pathways in SARS-CoV-2 associated pulmonary infection seem to be very heterogeneous. Even in patients with the most severe con-

dition requiring ICU support one can distinguish variable type and intensity of immunological processes. As for T cells, there are patterns typical of strong CD4+ and CD8+ response, which is sustained during the first week of the hospital stay. On the other hand, certain proportion of patients display almost no activation of T helper and T cytotoxic lymphocytes. The increased severity and poor outcome of the disease was observed in both immune profiles [37]. It is likely, that Th17 in peripheral blood would show similarities with other T helper lymphocytes during acute phase of SARS-CoV-2 pneumonia [38] i.e. sustained activation contributing to prolonged inflammatory state of the lungs in some, or low level of Th17 response resembling immunoparalysis in others. Poor outcomes are to be expected among patients from both groups.

Our study has several limitations. First, although intended as prospective observational, we were not able to include all patients fulfilling the inclusion criteria in study period. Main reason was overwhelming critical situation in hospital during COVID-19 pandemic, when many patients escaped enrolment in the study. The other reason was limited availability of immunological studies in weekend periods. Low number of study subjects in the cohort, carried out in single centre is another major limitation. The same applies for low number of BALF investigations, suitability of BALF samples for quantitative analysis and comparative purposes making any reasonable conclusions about mucosal Th17/IL-17A role in host defense very difficult. These factors are responsible for difficulties to assess the potential meaning of differences between mucosal and systemic counts and levels of Th17 and IL-17A in the course of sCAP. And finally, the other important limitation is low number of individual pathogens (especially in bacterial and mixed sCAP group) to observe possible typical patterns related to specific microbial etiology, Th17/IL-17A response and outcome.

Being aware of all these limitations, we were very cautious in interpreting gathered data and formulating objective conclusions. On the other hand, we believe our study produced some relevant and interesting findings.

We have observed and documented significant activity of Th17 cells and increased IL-17A signaling during the early course of sCAP in both, tissue (BALF) and systemic (peripheral blood) compartments. We aimed to contribute to extensive research into the role of Th17/IL-17A in the host defence against the sCAP. We designed our research purely as clinical and thus tested the feasibility of extended immune monitoring in the course of the disease in critically ill patient, bearing in mind the complexity of the nature of immune and inflammatory pathways in such scenario. Unlike majority of similar studies in this field, we have included the patients with different microbial etiology for comparison.

CONCLUSIONS

Th17 lymphocytes and IL-17A serum levels were significantly elevated from D1 to D7 during the early course of sCAP when compared to healthy controls. Increased serum IL-17A levels on day 3 and Th17 count in peripheral blood on day 7 were correlated with increased relative risk of death in patients with sCAP in our cohort. There was no correlation between mucosal and systemic Th17/IL-17A signaling related to specific pathogen in our cohort. sCAP carries the risk of high mortality, older age and male gender are significant risk factors for poor prognosis and death.

REFERENCES

1. REMAP-CAP Trial Internet. 2024 cited 2024 May 13. Available at [www: https://www.remapcap.org](https://www.remapcap.org).
2. Restrepo MI, Faverio P, Anzueto A. Long-term prognosis in community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.*, 2013;26:151–158.
3. Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Aldaz P, et al. Incidence and risk factor prevalence of community-acquired pneumonia in adults in primary care in Spain (NEUMO-ES-RISK project). *BMC Infectious Diseases*, 2016;16:645.
4. Tsoumani E, Carter JA, Salomonsson S, et al. Clinical, economic, and humanistic burden of community acquired pneumonia in Europe: a systematic literature review. *Expert Review of Vaccines*. 2023;22:876–884.
5. Theilacker C, Sprenger R, Leverkus F, et al. Population-based incidence and mortality of community-acquired pneumonia in Germany. *PLoS One*, 2021;16:e0253118.
6. Ferrer M, Traverso C, Cilloniz C, et al. Severe community-acquired pneumonia: Characteristics and prognostic factors in ventilated and non-ventilated patients. Kou YR, editor. *PLoS ONE*, 2018;13:e0191721.
7. Niederman MS, Torres A. Severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir Rev.*, 2022;31:220123.
8. Sligl WI, Marrie TJ. Severe Community-Acquired Pneumonia. *Critical Care Clinics*, 2013;29:563–601.
9. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis.*, 2007;44:S27–S72.
10. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.*, 2009;2:403–411.
11. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WEJJ, et al. T helper 17 cells are involved in the local and systemic inflammatory response in community-acquired pneumonia. *Thorax*, 2013;68:468–474.
12. Paiva IA, Badolato-Corrêa J, Familiar-Macedo D, et al. Th17 Cells in Viral Infections—Friend or Foe? *Cells*, 2021;10:1159.
13. Rathore JS, Wang Y. Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine*. 2016;34:1504–1514.
14. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and Immunology*, 2017;61:49–56.
15. Paroli M, Caccavale R, Fiorillo MT, et al. The Double Game Played by Th17 Cells in Infection: Host Defense and Immunopathology. *Pathogens*, 2022;11:1547.
16. Lu B, Liu M, Wang J, et al. IL-17 production by tissue-resident MAIT cells is locally induced in children with pneumonia. *Mucosal Immunology*, 2020;13:824–835.
17. Luo Y, Li C, Zhou Z, et al. Biological functions of IL-17-producing cells in mycoplasma respiratory infection. *Immunology*, 2021;164:223–230.
18. Tsai H-C, Velichko S, Hung L-Y, et al. IL-17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An Update on the Role of Th17 Cell Differentiation and IL-17R Signaling in Host Defense against Infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013;2013:1–12.
19. Valeri M, Raffatellu M. Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. Napier B, editor. *Pathogens and Disease*, 2016;74:ftw111.
20. Thomas R, Qiao S, Yang X. Th17/Treg Imbalance: Implications in Lung Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.*, 2023;24:4865.
21. Haas LEM, Termorshuizen F, den Uil CA, et al. Increased mortality in ICU patients ≥ 70 years old with COVID-19 compared to patients with other pneumonias. *J Am Geriatr Soc.*, 2023;71:1440–1451.
22. Nolley EP, Sahetya SK, Hochberg CH, et al. Outcomes Among Mechanically Ventilated Patients With Severe Pneumonia and Acute Hypoxemic Respiratory Failure From SARS-CoV-2 and Other Etiologies. *JAMA Netw Open*, 2023;6:e2250401.
23. Sirvent JM, Carmen de la Torre M, Lorenzo C, et al. Predictive factors of mortality in severe community-acquired pneumonia: a model with data on the first 24h of ICU admission. *Med Intensiva*, 2013;37:308–315.
24. Niu H-Q, Zhao X-C, Li W, et al. Characteristics and reference ranges of CD4+ T cell subpopulations among healthy adult Han Chinese in Shanxi Province, North China. *BMC Immunol.*, 2020;21:44.
25. Orlov M, Wander PL, Morrell ED, et al. A Case for Targeting Th17 Cells and IL-17A in SARS-CoV-2 Infections. *The Journal of Immunology*, 2020;205:892–898.
26. Xu D, Wu Y, Gao C, et al. Characteristics of and reference ranges for peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cell subsets in healthy adults in Shanxi Province, North China. *J Int Med Res.*, 2020;48:0300060520913149.
27. Corica B, Tartaglia F, D'Amico T, et al. Sex and gender differences in community-acquired pneumonia. *Intern Emerg Med.*, 2022;17:1575–1588.
28. Chen G, Zhang P-G, Li J-S, et al. Th17 cell frequency and IL-17A production in peripheral blood of patients with non-small-cell lung cancer. *J Int Med Res.*, 2020;48:300060520925948.
29. Sánchez-Vargas LA, Hernández-Flores KG, Thomas-Dupont P, et al. Characterization of the IL-17 and CD4+ Th17 Cells in the Clinical Course of Dengue Virus Infections. *Viruses*, 2020;12:1435.
30. Brunialti MKC, Santos MC, Rigato O, et al. Increased percentages of T helper cells producing IL-17 and monocytes expressing markers of alternative activation in patients with sepsis. *PLoS One*, 2012;7:e37393.
31. Feng C-M, Wang X-M, Li M-D, et al. Serum interleukin-17 predicts severity and prognosis in patients with community acquired pneumonia: a prospective cohort study. *BMC Pulmonary Medicine*, 2021;21:393.
32. Song Y, Li Y, Xiao Y, et al. Neutralization of interleukin-17A alleviates burn-induced intestinal barrier disruption via reducing pro-inflammatory cytokines in a mouse model. *Burns Trauma*, 2019;7:37.
33. Sasaki JR, Zhang Q, Schwacha MG. Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns*, 2011;37:646–651.
34. Costa RT, Araújo OR de, Brunialti MKC, et al. T helper type cytokines in sepsis: time-shared variance and correlation with organ dysfunction and hospital mortality. *Braz J Infect Dis.*, 2019;23:79–85.
35. Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010;5:120–127.
36. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010;21:443–448.
37. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020;369:eabc8511.
38. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2 – specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.*, 2020;5:eabd2071.

Do redakce došlo dne 20. 5. 2024.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Michal Moravec

Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK a FTN

Vídeňská 800

140 59 Prague 4 – Krč

e-mail: michal.moravec@ftn.cz

Asymptomatic SARS-CoV-2 infection in recipients of hematopoietic stem cells in the Omicron period

Šťastná-Marková M.¹, Roubalová K.², Hainz P.², Kryštofová J.², Labská K.³, Vosáhlová T.^{4,5}, Němečková Š.²

¹Transplantation and Intensive Care Unit, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

²Department of Immunology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

³Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁴Department of Non-commercial Clinical Studies, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁵Science and Research Centre, Faculty of Health Sciences, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

ABSTRACT

Aim: We aimed to determine the prevalence of SARS-CoV-2 infection, including both symptomatic and asymptomatic courses, and to identify predictors of asymptomatic or symptomatic SARS-CoV-2 infection in patients within seven months after allo-HSCT (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) in the Omicron period.

Methods: Prevalence of the past SARS-CoV-2 infection was determined in patients within seven months after allo-HSCT in the Omicron period using the cellular and humoral immune response against the SARS-CoV-2 nucleoprotein (NCP).

Results: Positive markers of past infection were identified in 45.2% of patients (n = 42). The infection was asymptomatic in 68.4% of anti-NCP positive patients. The search for risk factors for symptomatic SARS-CoV-2 infection in allo-HSCT recipients revealed that a low level of B cell reconstitution was the only significantly associated risk factor.

Conclusion: A high proportion of allo-HSCT recipients who were asymptotically infected within up to seven months after transplantation from 2022 to 2023 despite being immunosuppressed and unvaccinated indicates an attenuation of the circulating virus and may signal less risk for transplanted patients from SARS-CoV-2 infection in the Omicron period. Vaccination of these patients against SARS-CoV-2 was shown to be associated with a low but significant risk of exacerbation of cured chronic GVHD (graft versus host disease) and the risk of de novo GVHD. The low level of B-cell reconstitution was the only significant risk factor for symptomatic SARS-CoV-2 infection in HSCT recipients.

KEY WORDS

asymptomatic SARS-CoV-2 infection – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – Omicron variant – T cell response – nucleoprotein

SOUHRN

Šťastná-Marková M., Roubalová K., Hainz P., Kryštofová J., Labská K., Vosáhlová T., Němečková Š.:
Asymptomatická infekce SARS-CoV-2 u příjemců hematopoetických kmenových buněk v období cirkulace varianty omikron

Cíl: Zaměřili jsme se na stanovení prevalence infekce SARS-CoV-2 se symptomatickým nebo asymptomatickým průběhem a na identifikaci prediktorů symptomatické nebo asymptomatické infekce SARS-CoV-2 u pacientů během sedmi měsíců následujících po transplantaci alogenních hematopoetických kmenových buněk (alo-HSCT) v období cirkulace varianty omikron.

Metody: Prevalence proběhlé infekce SARS-CoV-2 byla detekována u pacientů během sedmi měsíců po allo-HSCT v omikronovém období pomocí buněčné a humorální imunitní odpovědi proti nukleoproteinu SARS-CoV-2 (NCP).

Výsledky: Pozitivní markery prodělané infekce byly identifikovány u 45,2 % pacientů (n = 42). Infekce byla asymptomatická u 68,4 % pacientů s anti-NCP pozitivitou. Hledání rizikových faktorů pro symptomatickou infekci SARS-CoV-2 u příjemců alo-HSCT odhalilo, že nízká úroveň rekonstituce B buněk byla jediným signifikantně souvisejícím rizikovým faktorem.

Závěr: Vysoký podíl příjemců alo-HSCT, kteří byli asymptomaticky infikováni do sedmi měsíců po transplantaci v letech 2022–2023, přestože byli imunokompromitováni a neočkovaní, ukazuje na oslabení cirkulujícího viru a může signalizovat pro pacienty po transplantaci menší riziko onemocnění SARS-CoV-2 v omikronovém období. Ukázalo se, že očkování těchto pacientů proti SARS-CoV-2 je spojeno s nízkým, ale významným rizikem exacerbace vyléčené chronické reakce štěpu proti hostiteli (GVHD – Graft Versus Host Disease) a s rizikem de novo GVHD. Nízká úroveň rekonstituce B-buněk byla jediným významným rizikovým faktorem pro symptomatickou infekci SARS-CoV-2 u příjemců alo-HSCT.

KLÍČOVÁ SLOVA

asymptomatická infekce SARS-CoV-2 – alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk – varianta omikron – odpověď T buněk – nukleoprotein

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 140–146
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138065>

INTRODUCTION

Studies on COVID-19 infection initiated by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) have demonstrated high mortality in immunocompromised allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT) during the initial period of the pandemic [1, 2]. Over time the outcomes of the COVID-19 patients have improved in the association both with newly emerged Omicron variants and with advancements in therapeutic management for hospitalized patients [3, 4]. The twelve-week overall survival of infected patients increased between 2020 and 2022 from 77.3% to 95.3% [5].

In meta-analysis the median of the earliest detection of IgG response in patients with SARS-CoV-2 infection from general population is shown to be at day 12, peak of seroprevalence at day 25, start of titer decline at day 60, and persistence of IgG has a median of 120 days [6]. The IgG positivity against the nucleocapsid protein (NCP) can be used for determining previous SARS-CoV-2 infection. However, in some subjects, precise estimation of seropositivity is complicated by the waning antibody levels during recovery and requires the using a highly sensitive immunoassay [7] such as dual antibody assay [8]. The NCP-specific T cell response in recovered patients appears to be more long-lived and stable compared to the circulating antibody levels [9, 10].

The present study aimed to determine the true prevalence of SARS-CoV-2 infection including both symptomatic and asymptomatic course and to identify predictors of asymptomatic or symptomatic SARS-CoV-2 infection in patients within seven months after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells.

MATERIAL AND METHODS

Study participants

Sixty-three adult patients who underwent allo-HSCT at the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, between March 2020 and April 2023, were recruited for this study. All transplanted patients obtained peripheral blood stem cells as a graft. They were categorized into three cohorts. In cohort I there were patients with haematological malignancies who were transplanted between April 2020 and July 2021

(n = 21), and with the exception of three patients, were not vaccinated against SARS-CoV-2 during the follow-up period. Cohort II was intended to be a control group of patients transplanted between April 2021 and April 2022 for clinical morbidity of Covid-19 evaluation (n = 71). The patients in the cohort III were transplanted between February 2022 and April 2023. They were not vaccinated during the follow-up period, some of them (64%) received one dose of Evusheld™ (100 mg) (mix of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2) on day + 30 after HSCT (n = 42). Completed vaccination before transplantation was reported in 18 patients of cohorts I and III. The follow-up period for Covid-19 was seven months when patients donated a blood sample for the analysis of SARS-CoV-2-specific T cell and antibody responses. The plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated and frozen stored for further analyses. Frozen PBMCs isolated from 13 blood donors between 2011 and 2018 were used as SARS-CoV-2 negative controls. All the participants provided written informed consent. This study was approved by the institutional ethical board. The patients' residences were dispersed across the country.

Measurement of SARS-CoV-2-specific antibodies

The presence of antibodies against SARS-CoV-2 spike (S) and nucleoprotein (NCP) antigens was detected in plasma samples by Anti-SARS-CoV2 ELISA (IgG) assay or Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) assay (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany) as described previously [11].

Detection of a SARS-CoV-2-specific T cell response

T-cell responses against S1, S2, and NCP SARS-CoV2 antigens were measured after *ex vivo* stimulation with the pools of 15-amino-acid-long overlapping peptides (PepMix™) using an in-house ELISPOT-IFN γ assay described previously [11]. The mean values of the spot-forming units (SFUs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultivated without the peptides were subtracted from those in stimulated cultures. Frozen PBMCs collected from blood donors between 2011 and 2018 were used to establish the cut-off for a positive cellular response. The ELISPOT method was validated using a Quan-T-cell ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany). Results of both methods (Table 1) correlated significantly mutually and with the incidence of Covid in transplanted recipients.

Table 1. Correlation analysis of ELISPOT-IFN γ and QuanT-cell ELISA results and prevalence of SARS-CoV-2 infection

	COVID-19 after Tx			NCP-ELISPOT		
	Spearman r	95% CI	p value	Spearman r	95% CI	p value
NCP-ELISPOT	0.7086	0.3627–0.8829	0.0006			
Quan-T-cell ELISA	0.5730	0.1613–0.8149	0.0082	0.6457	0.2576–0.8545	0.0028

Flow cytometric evaluation of immune system reconstitution after HSCT

For the quantitative and qualitative analysis of the major immune cell populations in HSCT recipients at the 7th month post HSCT a 9-colour panel of antibodies: CD8-alexa700, CD4- pacific blue (Exbio, Prague); CD3-APC-Cy7, CD56-BV510 (BioLegend); CD45-BV605, CD16-FITC (Sony); CD19-BV786 (BD Biosciences); LIVE/DEAD™ for UV-blue (Invitrogen) was employed. Flow cytometry was performed using a BD LSR Fortessa 5 L flow cytometer (BD Biosciences) equipped with five lasers. The obtained data were analyzed using the FlowJo 10.5 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). We evaluated the frequency of B cells, monocytes, αβ T cells, NK cells, and NKT cells.

Collection of epidemiological data

A cumulative overview of newly confirmed cases of COVID-19 infection reported daily to the Information System of Infectious Diseases (ISIN) by the Regional Public Health Authority and laboratories was downloaded from an official Czech website maintained by the Ministry of Health (COVID-19 in the Czech Republic: Open datasets and datasets for download are available at <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/api/v2/covid-19>) [12]. The file containing the information about the rate of COVID-19 sequencing along with the absolute numbers and percentage distributions of the variants of concern (VOC) by week and country was downloaded from the ECDC website (www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/data-virus-variants-covid-19-eueea).

pa.eu/en/publications-data/data-virus-variants-covid-19-eueea).

Statistical analysis

All statistical tests were conducted at a significance level of > 0.05. All calculations and data plots were performed using the GraphPad Prism software, version 10.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

SARS-CoV-2 specific immune response in HSCT recipients

The immune response against SARS-CoV-2 antigens in HSCT recipients from cohorts I+III was measured at a median of 6.7 months (range 6.1–15.1) after HSCT (Figure 1). Anti-NCP T cell response was related (Table 2) to SARS-CoV-2 infection within seven months after HSCT, anti-S1 and S2 T cell responses, and levels of anti-NCP IgG. No association was found between anti-NCP T cell response and anti-S IgG or the transplantation conditions (diagnosis, recipient’s age, gender, conditioning regimen, extent of HL-A matching between donor and recipient, or the incidence and treatment of acute or chronic graft versus host disease (GVHD), or recipient’s pre-transplant COVID-19 infection and SARS-CoV-2 vaccination status. No relationship between the recipient’s anti-NCP immune response and donor’s previous COVID-19 disease or vaccination status was found.

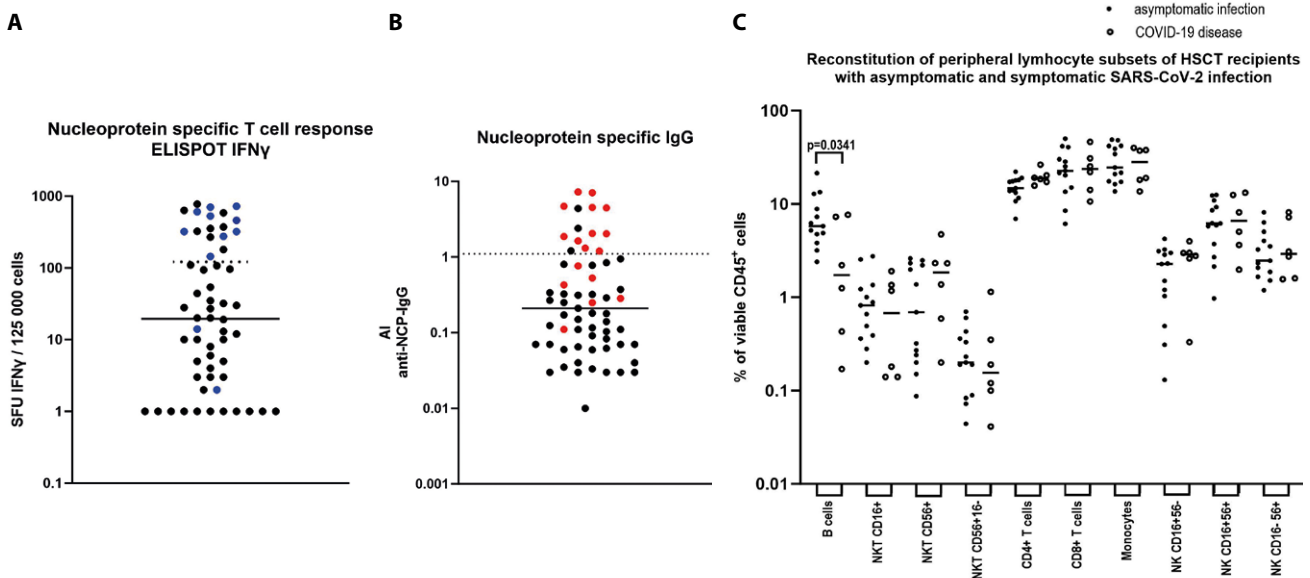


Figure 1. Immune system of SARS-CoV-2- infected HSCT recipients

Nucleoprotein specific immune response (A, B): T cell response was detected by ELISPOT-IFN γ in patients after follow-up period. Cut-off value shown as dotted line was determined as mean + 2 s.d. of the response in healthy donors. The SFU values that were simultaneously positive for anti- NCP IgG antibodies are shown in blue symbols (A): NCP- specific IgG. Dotted line stands for ELISA Antibody Index (AI) cut-off value. Anti-NCP IgG values that were positive in ELISPOT-IFN γ assay are shown in red symbols (B): Reconstitution of peripheral lymphocyte subsets (C): Lymphocyte subsets in the patients from cohort III with asymptomatic (n = 36) or symptomatic (n = 6) SARS-CoV-2 infection were quantified by flow cytometry using the NKBMT panel at month 7 after transplantation. Statistical significance of the differences was tested by the Kolmogorov-Smirnov test.

Table 2. Univariable simple linear regression models for NCP-specific T cell response and symptomatic COVID-19 disease

Reference category	NCP IFN γ (SFU/125 000)			Symptomatic COVID-19 disease (n=134) ^d		
Variable	Estimate (slope)	95% CI	P value	Estimate (slope)	95% CI	P value
Age ^a	0.001847	-0.01233–0.01602	0.7952	2.881	-1.876–7.637	0.2331
Female Gender ^a	-0.0002082	-0.0008044–0.0003880	0.4873	-0.1823	-0.3834–0.01887	0.0753
Diagnosis (myeloid or lymphoid) ^a	-0.0001491	-0.0006008–0.0003025	0.5111	-0.03333	-0.2348–0.1681	0.7439
Conditioning regimen ^a	-0.0000735	-0.0005388–0.0003918	0.753	-0.08143	-0.2510–0.08819	0.344
HLA match (MUD or MRD) ^a	0.0003999	-0.0002977–0.001098	0.2558	-0.08957	-0.5087–0.3295	0.6731
anti-NCP IgG ^a	0.003078	0.001564–0.004592	0.0001			
COVID-19 after HSCT ^a	0.0009328	0.0006678–0.001198	< 0.0001			
S1 IFN γ (SFU/125 000) ^b	0.2884	0.04666–0.5302	0.0207			
S2 IFN γ (SFU/125 000) ^b	0.9573	0.7112–1.203	< 0.0001			
anti-S-IgG ^b	0.003976	-0.0003893–0.008341	0.073			
Vaccination before HSCT (number of doses) ^b	0.000575	-0.001251–0.002401	0.514			
COVID-19 before HSCT ^b	-0.0002385	-0.0009317–0.0004546	0.490			
Vaccination of HSC donor ^c	0.0002901	-0.001612–0.002192	0.756			
COVID-19 of HSC donor ^c	-0.0001286	-0.001039–0.0007820	0.7713			
aGVHD grade	0.0005205 ^a	-0.001218–0.0001770	0.1407	0.01034	-0.2838–0.3045	0.9447
cGVHD grade	0.00005562 ^a	-0.0006459–0.0007572	0.8745	0.1701	-0.04882–0.3889	0.1267

^aEvaluation was performed using samples of patients in cohort I and III (n = 63).

^bEvaluation was performed using samples of patients from cohort III (n = 42).

^cEvaluation was performed using available information from donors for patients in cohort III (n = 23).

^dEvaluation was performed using available clinical data of patients in cohorts I, II and III (n = 134).

Prevalence of IgG antibodies against NCP at seven months post HSCT (22%) was lower than the prevalence of NCP-specific T cell responses (28%) – Figure 1AB. The positivity detected by T cells was confirmed by anti-NCP-IgG positivity in 41.2% of the cases only (see Figure 1A). Whereas anti-NCP-IgG positivity was confirmed in 78% of the cases by NCP-specific ELISPOT-IFN γ (Figure 1B). Our results corroborate the previous findings that the waning of NCP specific IgG is faster than that of the cellular response [13]. For further analysis of SARS-CoV-2 infection in HSCT recipients, the NCP-specific immune response (IgG and T cell) was used as a marker of recent virus infection.

Prevalence of SARS-CoV-2 infection during seven months post HSCT

Symptomatic infection was defined based on the respiratory symptoms going along with the detection

of laboratory markers of SARS-CoV-2 infection (the virus antigen or RNA positivity in oropharyngeal or nasal swab). Asymptomatic infection was defined by NCP-specific T-cell or antibody positivity in the absence of clinical respiratory symptoms during the observational period. The highest prevalence of COVID-19 in HSCT recipients was found in cohort II (23.9%) and cohort III (14.3%) (Table 3). The difference between the cohorts was not significant (Fisher's exact test; Odds ratio 1.889; 95% CI 0.7203–5.232; p = 0.2392). The number of COVID-19 cases in cohort I was too low for analysis.

Using immune response analysis, we found that the proportion of asymptomatic SARS-CoV-2 infection in cohort III was 68.4%. No association was observed between Evusheld and the prevalence of asymptomatic infection (χ^2 test; OR 0.9091; 95% CI = 0.08923–15.57; p = 0.9432).

Table 3. COVID-19 disease and SARS-CoV-2 infection in HSCT recipients

Period	Circulating SARS-CoV-2 variant	N = 140	COVID-19 (%)	Median of interval of COVID-19 positivity after HSCT	Infected patients anti NCP positive (%)	Asymptomatic among infected (%)	Comparison of asympt. infection rate in cohorts I and III p value
Cohort I. 29.4.20 - 28.7.21	Other VOC, Alpha, Delta	21	1 (9.5%)	208 (202–214)	3 (14.3%)	3 (75.0%)	
Cohort II. 9.4.21 - 29.4.22	Alpha, Delta, Omicron	71	17 (23.9%)	167.5 (17–210)	n.d.	n.d.	n.d.
Cohort III. 27.2.22 - 21.4.23	Omicron	42	6 (14.3%)	41.5 (5–202)	19 (45.2%)	13 (68.4%)	n.s.

Further analysis revealed that reconstitution of the immune system affects the outcome of the infection. The proportions of the main lymphocyte subpopulations in PBMCs were determined using flow cytometry in cohort III. Compared to the asymptomatic infection, the symptomatic infection was associated with a lower frequency of B cells (see Figure 1C) ($p = 0.0341$, Kolmogorov-Smirnov D 0.6667). The differences in other lymphocyte subpopulations were not statistically significant.

The impact of the SARS-CoV-2 epidemiological situation in the Czech Republic on the prevalence of Covid-19 post HSCT

The circulation of SARS-CoV-2 variants changed during the study. Fluctuations in the seasonal inci-

dence of new cases are shown in Figure 2A, and the local prevalence of the sequenced variants of concern is presented in Figure 2B. While cohort I patients may have been exposed to the Alpha variant or ancestral variants, patients in cohort II may have come into contact with the Alpha, Delta, and Omicron variants. The cohort III patients were enrolled during the wave of Omicron variants. Incidences of Covid-19 in cohorts I, II, and III (9.5%, 23.9%, and 14.3%, respectively, see Table 3) seem to reflect the ascending and descending course of the epidemic at particular intervals. Patients in cohorts I and II were more likely to become infected in later months after transplantation than those in cohort III. The median intervals from HSCT to SARS-CoV-2 diagnosis were 208, 167.5, and 41.5 days in cohorts I, II, and III, respectively.

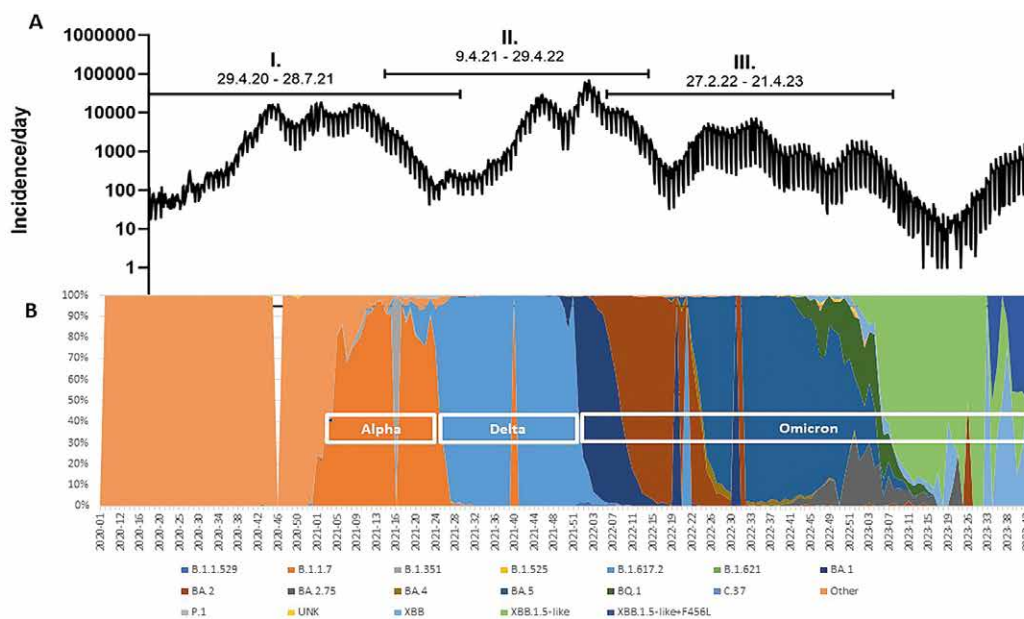


Figure 2. COVID-19 in the Czech Republic and study cohorts I–III
(A) Daily reported cases of SARS-CoV-2 infection between 29. 4. 2020 and 31. 10. 2023. Horizontal lines depict follow-up periods of study cohorts I–III.
(B) Time distribution of sequenced cases of variants circulating in the Czech Republic during the pandemic [year-week].

DISCUSSION

The quantification of the both arms of adaptive immunity to identify patients who were infected with SARS-CoV-2 within seven months after HSCT was used in this study. The assay to detect SARS-CoV-2-specific cellular immunity was based on the observation that the virus-specific T cells can persist for months after infection [13]. Although some assays (QuanT cell ELISA) available for the diagnosis of COVID-19 aim at the detection of T cells specific for the SARS-CoV-2 spike antigen, we decided to measure the T cell response against nucleoprotein. This allowed to detect past infection in vaccinated patients in cohort I. To improve the sensitivity of the determination of the immune status, anti-NCP antibodies were also assessed. Detection of NCP-IgG was not affected by anti-S-Mab from Evusheld in patients in cohort III.

Initial studies on COVID-19 infection in allo-HSCT recipients reported high case fatality rates ranging from 17% to 32% [1, 2, 14, 15]. At the beginning of the SARS-CoV-2 pandemic, the majority of patients had symptoms while only about 10% were asymptomatic [16]. The poor prognosis of allo-HSCT recipients infected in the first wave improved gradually with the availability of more effective medical care, antivirals, and vaccines along with the emergence of new variant viruses with less severe symptomatology. The SARS-CoV-2 Omicron variant causes milder disease than the earlier variants. As the epidemic progressed, it became clear that the severity of the disease was determined by the virulence of the viral variants as well as the demographic and clinical characteristics of the patients. It is evident that the rate of severe infections is inversely proportional to that of asymptomatic infections. In the initial phase of the epidemic, the rates of asymptomatic infections were 35.1% in general population including elderly asymp. inf. (19.7%) and children asymp. inf. (46.7%) [17]. Vaccination against SARS-CoV-2 is an important contributor to less severe symptoms and a higher proportion of asymptomatic infections. As many as 67.2% (57.3–78.8%) of those who completed a full vaccine series plus one or two booster doses had asymptomatic infection during the Omicron period [18].

Asymptomatic SARS-CoV-2 infection following HSCT was reported in 8.9% of adult recipients in early phase of epidemic [2]. In pediatric HSCT recipients, the proportion of asymptomatic infection was 42%, which was not different from the children general population [17].

Data on asymptomatic SARS-CoV-2 infection in HSCT recipients during the Omicron period have not yet been published. The unusually high representation of asymptomatic SARS-CoV-2 infections of around 70% in our study may be related on the one hand to the change in the virulence of the circulating virus compared to the earlier phase of the epidemic on the other hand to the high sensitivity of the detection method.

Using specific immunity testing, more patients infected during the study period could be identified, when compared with the methods for direct demonstration of the virus. At the time of transplantation, existing T cells are eliminated, but in the post-transplantation period, the donor NCP-specific T cells stimulated by viral antigens produced during infection expand. Thus, in this study, only infections occurring during the observation period were detected and the detection efficiency was very high. Unlike this method, the RNA or antigen testing employed by most studies summarized in meta-analyses [17, 19] cannot completely cover the entire observation period, which means that not all asymptomatic infections are detected because the positivity window in the PCR assay or antigen test is short.

It could be argued that the high proportion of recipients responding to the NCP antigen in this study may have resulted from the transfer of SARS-CoV-2-specific antiviral immune cells from HSCT donors who had a history of Covid-19, as described recently [20, 21]. Longitudinal observations [20] have shown that transferred virus-specific T cells expanded only in those recipients who were infected and survived post-transplant COVID-19 infection. However, this expansion has not been observed in patients who were not infected after HSCT. Using the linear regression model, we demonstrated the absence of an association between the level of NCP-specific T lymphocyte response in recipients and previous COVID-19 in graft donors (see Table 1), which may be explained by the fact that the transferred specific T cells, both donor-primed and naïve, cannot expand without antigen stimulation.

CONCLUSIONS

A high proportion of hematopoietic stem cell recipients who were asymptotically infected within up to seven months after transplantation from 2022 to 2023 despite being immunosuppressed and unvaccinated indicates an attenuation of the circulating virus. This result may signal less risk for transplanted patients from SARS-CoV-2 infection in the Omicron period even if they were not vaccinated. Vaccination of these patients against SARS-CoV-2 was shown to be associated with a low but significant risk of exacerbation of cured chronic GVHD and the risk of de novo GVHD [22, 23]. Asymptomatic patients are known to be a reservoir of infectious viruses in the environment, which could also be true for patients after HSCT.

The search for risk factors for symptomatic SARS-CoV-2 infection in HSCT recipients revealed that a low level of B-cell reconstitution was the only significantly associated risk factor. This result is in line with the studies showing that patients with iatrogenic B cell depletion or various inborn humoral defects have an increased risk of severe symptomatic COVID-19 and death [24, 25].

REFERENCES

- Randi BA, Higashino HR, Silva VPD, Xavier EM, Rocha V, Costa SF. COVID-19 in hematopoietic stem-cell transplant recipients: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics and outcomes. *Rev Med Virol*, 2023;33:e2483.
- Ljungman P, de la Camara R, Mikulska M, Tridello G, Aguado B, Zahrani MA et al. COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey. *Leukemia*, 2021;35:2885–2894.
- Menni C, Valdes AM, Polidori L, Antonelli M, Penamakuri S, Nogal A, et al. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *Lancet* 2022;399:1618–1624.
- Veneti L, Bøås H, Bråthen Kristoffersen A, Stålcrautz J, Bragstad K, Hungnes O, et al. Reduced risk of hospitalisation among reported COVID-19 cases infected with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant compared with the Delta variant, Norway, December 2021 to January 2022. *Euro Surveill*, 2022;27:2200077. doi: 10.2807/1560.
- Bordat J, Maury S, Leclerc M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the COVID-19 era. *Front Immunol*, 2023;14:1100468.
- Xu J, Chen J, Wen F, Liu K, Chen Y. Detection methods and dynamic characteristics of specific antibodies in patients with COVID-19: A review of the early literature. *Heliyon*, 2024;10:e24580.
- Nakagama Y, Komase Y, Kaku N, Nitahara Y, Tshibangu-Kabamba E, Tominaga T, et al. Detecting Waning Serological Response with Commercial Immunoassays: 18-Month Longitudinal Follow-up of Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antibodies. *Microbiol Spectr*, 2022;10:e0098622,22. Epub 2022 Jul 14.
- Müller L, Ostermann PN, Walker A, Wienemann T, Mertens A, Adams O, et al. Sensitivity of anti-SARS-CoV-2 serological assays in a high-prevalence setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021;40:1063–1071.
- Choy C, Chen J, Li J, Gallagher DT, Lu J, Wu D, et al. SARS-CoV-2 infection establishes a stable and age-independent CD8(+) T cell response against a dominant nucleocapsid epitope using restricted T cell receptors. *Nat Commun*, 2023;14:6725-z.
- Hvidt AK, Guo H, Andersen R, Lende SSF, Vibholm LK, Søgaard OS, et al. Long-term humoral and cellular immunity after primary SARS-CoV-2 infection: a 20-month longitudinal study. *BMC Immunol*, 2023;24:45-y.
- Macková J, Hainz P, Kryštofová J, Roubalová K, Štastná-Marková M, Vaníková Š, et al. Specific immune response to mRNA vaccines against COVID-19 in patients receiving allogeneic stem cell transplantation for myeloid malignancy was altered by immunosuppressive therapy. *Leuk Res*, 2023;130:107314.
- Komenda M, Jarkovský J, Klimeš D, Panoška P, Šanca O, Gregor J, et al. Sharing datasets of the COVID-19 epidemic in the Czech Republic. *PLoS One*, 2022;17:e0267397.
- Le Bert N, Chia WN, Wan WY, Teo AKJ, Chong SZ, Tan N, et al. Widely heterogeneous humoral and cellular immunity after mild SARS-CoV-2 infection in a homogeneous population of healthy young men. *Emerg Microbes Infect*, 2021;10:2141–2150.
- Sharma A, Bhatt NS, St Martin A, Abid MB, Bloomquist J, Chemaaly RF, et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol*, 2021;8:e185–193.
- Schaffrath J, Brummer C, Wolff D, Holtick U, Kröger N, Bornhäuser M, et al. High Mortality of COVID-19 Early after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Multicenter Analysis on Behalf of the German Cooperative Transplant Study Group. *Transplant Cell Ther*, 2022;28:337.e1,337.e10.
- Varma A, Kosuri S, Ustun C, Ibrahim U, Moreira J, Bishop MR, et al. COVID-19 infection in hematopoietic cell transplantation: age, time from transplant and steroids matter. *Leukemia*, 2020;34:2809–2812.
- Sah P, Fitzpatrick MC, Zimmer CF, Abdollahi E, Juden-Kelly L, Moghadas SM, et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021;118:e2109229118. doi: 10.1073/pnas.2109229118.
- Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Ayoub HH, AIMukdad S, Yassine HM, Al-Khatib HA, et al. Effect of mRNA Vaccine Boosters against SARS-CoV-2 Omicron Infection in Qatar. *N Engl J Med*, 2022;386:1804–1816.
- Yu W, Guo Y, Zhang S, Kong Y, Shen Z, Zhang J. Proportion of asymptomatic infection and nonsevere disease caused by SARS-CoV-2 Omicron variant: A systematic review and analysis. *J Med Virol*, 2022;94:5790–5801.
- La Rosa C, Chiappesi F, Park Y, Zhou Q, Yang D, Gendzekhadze K, et al. Functional SARS-CoV-2-specific T cells of donor origin in allogeneic stem cell transplant recipients of a T-cell-replete infusion: A prospective observational study. *Front Immunol*, 2023;14:1114131.
- Sherman AC, Cheng C, Swank Z, Zhou G, Li X, Issa NC, et al. Impact of Donor and Recipient SARS-CoV-2 Vaccination or Infection on Immunity after Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*, 2023;29:337.e1,337.e5.
- Ngo D, Chen J, Tinajero J, Aribi A, Arslan S, Marcucci G, et al. The impact of SARS-CoV2 vaccines on the incidence of graft versus host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a single-center retrospective study. *Stem Cell Res Ther*, 2023;14:93–95.
- Hütter-Krönke ML, Neagoie A, Blau IW, Wais V, Vuong L, Gantner A, et al. Risk factors and characteristics influencing humoral response to COVID-19 vaccination in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol*, 2023;14:1174289.
- Delavari S, Abolhassani H, Abolnezhadian F, Babaha F, Iranparast S, Ahanchian H et al. Impact of SARS-CoV-2 Pandemic on Patients with Primary Immunodeficiency. *J Clin Immunol*, 2021;41:345–355.
- Jones JM, Faruqi AJ, Sullivan JK, Calabrese C, Calabrese LH. COVID-19 Outcomes in Patients Undergoing B Cell Depletion Therapy and Those with Humoral Immunodeficiency States: A Scoping Review. *Pathog Immun*, 2021;6:76–103.

Acknowledgement

The authors acknowledge the European Regional Development Fund (ERDF) for project AIIHHP CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007428, OPRDE, the Agency for Medical Research of the Czech Republic (AZV ČR) for project NU22-E-138, and project MH CZ – DRO (IHBT – 00023736).

We acknowledge the source of the data on the Covid-19 epidemic in the Czech Republic, which is accessible through the Ministry of Health of the Czech Republic [Internet]. 2020. Covid-19 in the Czech Republic: Open datasets and datasets for download. <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/api/v2/covid-19> [12].

We gratefully acknowledge the European center for disease control (ECDC) as the original source of the data describing the distribution of variants of concern (VOC) by week and country accessible on web pages © ECDC [2005–2023].

Do redakce došlo dne 21. 5. 2024.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Šárka Němečková, DrSc.
 Ústav hematologie a krevní transfuze
 U Nemocnice 504/1
 120 00 Praha 2
 e-mail: sarka.nemeczkova@uhkt.cz

Výskyt *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* v hematofágních členovcích na Břeclavsku v roce 2022

Mravcová K.¹, Zdražilová S.^{1,2}, Vlčková I.³, Orliková H.^{3,4}, Malý M.³, Kynčl J.^{3,4}, Mendel J.¹, Hubálek Z.¹, Šikutová S.¹, Rudolf I.^{1,2}

¹Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Brno

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³Státní zdravotní ústav, Praha

⁴Ústav epidemiologie a biostatistiky, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

SOUHRN

Tularemie je zoonóza, jejíž původcem je *Francisella tularensis*, gramnegativní aerobní bakterie patřící do třídy *Gammaproteobacteria* a čeledi *Francisellaceae*. Navzdory skutečnosti, že *F. tularensis* může mít významný dopad na zdraví člověka, existuje o aktuálním výskytu tohoto patogenu v různých hematofágních členovcích pouze velmi málo údajů. Cílem studie bylo provést rozsáhlý molekulární screening různých potenciálních hematofágních vektorů: klíšťat (4348 jedinců druhů *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* a *Haemaphysalis concinna*), komárů (4100 jedinců druhu *Aedes vexans*) a muchniček (6900 jedinců *Simulium* spp.) na přítomnost *F. tularensis* na Břeclavsku v roce 2022. Pozitivní byly pouze 2 vzorky, které obsahovaly DNA specifickou pro *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Oba vzorky pocházely z klíštěte *D. reticulatus* a to jak po infestaci srnce, tak jednoho smíšeného vzorku nasbíraných klíšťat (n = 10). Oba pozitivní vzorky byly sekvenovány a byla potvrzena přítomnost *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Přítomnost *F. tularensis* v komárech a muchničkách nebyla prokázána.

KLÍČOVÁ SLOVA

Francisella – tularemie – *Ixodes ricinus* – *Dermacentor reticulatus* – *Haemaphysalis concinna* – *Aedes vexans* – *Simulium* spp. – zoonóza

ABSTRACT

Mravcová K., Zdražilová S., Vlčková I., Orliková H., Malý M., Kynčl J., Mendel J., Hubálek Z., Šikutová S., Rudolf I.: Occurrence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in haematophagous arthropods in the Breclav district in 2022

Tularemia is a zoonosis caused by *Francisella tularensis*, a gram-negative aerobic bacterium belonging to the class of *Gammaproteobacteria* and the family *Francisellaceae*. Despite its undeniable importance for human health, there is little data on the current distribution of *F. tularensis* in various hematophagous arthropods. The aim of this study was to perform a mass molecular screening of different possible hematophagous vectors: ticks (4348 ticks of the species *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, and *Haemaphysalis concinna*), mosquitoes (4100 specimens of *Aedes vexans*), and blackflies (6900 specimens of the *Simulium* spp.) for the presence of *F. tularensis* in the Breclav district in 2022. Only two specimens were positive for the specific DNA of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Both samples originated from *D. reticulatus*, one collected from infested roe deer and the other included in a pooled sample (n = 10). Both positive samples were sequenced, and the presence of *F. tularensis* subsp. *holarctica* was confirmed. In addition, the absence of *F. tularensis* in mosquitoes and black flies was documented.

KEYWORDS

Francisella – tularemia – *Ixodes ricinus* – *Dermacentor reticulatus* – *Haemaphysalis concinna* – *Aedes vexans* – *Simulium* spp. – zoonosis

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 147–152
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138066>

ÚVOD

Francisella tularensis je obligátně aerobní, gramnegativní, intracelulární, nesporulující bakterie, náležící do kmene *Pseudomonadota*, třídy *Gammaproteobacteria* a čeledi *Francisellaceae*, která způsobuje akutní onemocnění – tularemii neboli zaječí nemoc. Nákaza se vyskytuje sezonně s nejvyšším počtem případů v pozdních jarních měsících, během léta až do začátku podzi-

mu [1, 2]. Bakterie může infikovat širokou škálu hostitelů včetně bezobratlých, ptáků (stěhovaví pobřežní ptáci) a savců [3]. Za nejvýznamnější savčí hostitele jsou však považováni zástupci řádů zajícovci (*Lagomorpha*) a hlodavci (*Rodentia*) [4]. Jako vektorů hrají významnou roli v přenosu hematofágní členovci, a to převážně klíšťata. Role dalších zástupců hematofágních členovců (především komárů) při biologickém přenosu *F. tularensis* není dosud zcela zřejmá [4]. Mezi další způsoby přenosu

řadíme nákazu aerogenní cestou, alimentární přenos nebo nákazu přímým kontaktem [4]. Mezilidský přenos nebyl dosud zaznamenán [5]. Díky mnoha faktorům virulence, poměrně snadnému šíření a nedostupnosti vakcinace představuje tularemie potencionální bioteroristickou zbraň [6]. Jsou popsány čtyři poddruhy tohoto patogenu: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* a *F. tularensis* subsp. *novicida* [4]. Typy A a B jsou považovány za nejdůležitější z hlediska patogenity pro člověka (více virulentní typ A převládá v Severní Americe, mírnější typ B se objevuje především v Eurasii). Klinické příznaky tularemie souvisejí především se vstupní bránou patogenu, stupněm virulence a imunitním stavem pacienta. Na základě místa vstupu a klinických projevů rozlišujeme 4 formy onemocnění, a to ulceroglandulární/okuloglandulární, pulmonární, střevní/abdominální a nejméně častou septickou [7]. Každá z forem tularemie může být doprovázena komplikacemi, které mohou vést k sekundární sepsi, zápalu plic, popřípadě meningitidě.

Cílem práce bylo zmapovat s využitím molekulárních metod aktuální výskyt *F. tularensis* subsp. *holarctica* u hematofágních členovců (klíšťat, komárů a muchniček) na vybraných lokalitách Břeclavska. Vzhledem k nárůstu ulceroglandulární formy onemocnění po sání klíštětem je nezbytné získat recentní data o skutečné prevalenci *F. tularensis* v klíštěcích vektorech a současně objasnit možnou roli dalších zástupců hematofágních členovců jako jsou komáři a muchničky při vektorovém přenosu *F. tularensis* na našem území.

MATERIÁL A METODY

Sběr klíšťat, komárů a muchniček a lokality sběru Sběr klíšťat

Sběr klíšťat byl prováděn metodou vlnkování. Odchyt probíhal v létě a na podzim roku 2022 na lokalitách Ladná, Podivín (Janův Hrad), Lanžhot (obora Soutok), Valtice (Rendezvous, Zahradky, Pískovna) a obora Soutok (Pohansko, Štrosflek). Již při sběru byla klíšťata tříděna a separována dle druhu (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*), vývojového stadia (nymfa, dospělec) a pohlaví (samec, samice). Do zkumavky bylo ke členovcům umístěno stéblo trávy, aby nedocházelo k jejich vysychání. Vzorky byly uchovány v chladničce při 6 °C a před analýzou sestavovány do směsí, tzn. 1 vzorek odpovídal 10 kusům jedinců samic, samců či nymf. Klíšťata byla následně homogenizována a využita k izolaci DNA. Další vzorky tvořila nasátá klíšťata odebraná z divoké zvěře (srnec obecný, jelen evropský, daněk evropský a prase divoké). Na rozdíl od klíšťat sesbíraných metodou vlnkování nebyly tyto vzorky vyšetřovány ve směsích (jeden vzorek tedy odpovídal 1 jedinci). Tyto vzorky pocházely z lokalit Hlohovec, Mikulov, Poštorná, Strachotín, Tvrdonice a Valtice.

Sběr komárů a muchniček

Odchyt probíhal v létě 2022 pomocí pastí EVS („*encephalitis vector surveillance*“) od výrobce BioQuip Products, USA s oxidem uhličitým a světlem jako atraktantem. Muchničky byly odchyceny v oblastech Lednice (rybník Mlýnský), Břeclav (Kančí Obora, Obora Soutok) a Tvrdonice. Komáři byli odchyceni v lokalitách Kančí Obora a Obora Soutok (Hvězda). Komáři a muchničky byli zpracováni ve směsích po 100 jedincích. Vzhledem ke složité taxonomické determinaci muchniček byli jedinci zařazeni pouze v rámci rodu *Simulium* spp. čeledi *Simuliidae*. Odchycení komáři patřili do druhu *Aedes vexans*.

Homogenizace vzorků klíšťat, komárů a muchniček

Homogenizace vzorků probíhala v chlazených třecích miskách v přítomnosti sterilního písku, kde byly jednotlivé vzorky (nebo jejich směsi) homogenizovány v 500 µl chlazeného fosfátového pufru (PBS) a centrifugovány při 4 °C a 500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Byl odebrán supernatant, který byl dále zpracován při izolaci DNA.

Izolace genomické DNA

Automatická izolace DNA z hematofágních členovců probíhala pomocí automatického přístroje QIAcube a využitím QIAamp DNA Mini Kit, a to přesně dle instrukcí výrobce.

Real-time PCR

Pro detekci *F. tularensis* pomocí Real-Time PCR ve vzorcích DNA izolované z členovců byly využity primery zacílené na gen *tul4*, který kóduje 17-kDa lipoprotein vnější membrány. Primery, sonda i podmínky reakce byly převzaty z publikace Versage et al. (2003) [8]. Navržená PCR nedetekovala tzv. *Francisella*-like endosymbionty, je tedy vysoce specifická ale i citlivá (schopna detekovat 1 buňku *F. tularensis* ve vzorku) [9]. V počátečních fázích screeningu jsme používali také interní pozitivní kontrolu (tzv. IPC) pro ověření optimálního průběhu PCR reakce.

Konvenční PCR

Pro konfirmaci *Francisella tularensis* ve vzorcích DNA izolované z hematofágních členovců a pro sekvenaci byly využity primery cílené opět na konzervativní oblast genu *tul4* [10].

Sekvence pozitivních vzorků

Pozitivní vzorky, tedy produkty konvenční PCR, byly následně osekvenovány a bioinformaticky analyzovány dle studie uveřejněné dříve [11]. Purifikace PCR produktů byla realizována prostřednictvím soupravy DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). PCR produkty byly sekvenovány dle pokynů výrobce pomocí BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA). K odstranění nečistot byla použita sada ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research). Sekvenování probíhalo na ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro zajištění vysoké kvality čtení byly PCR amplikony sekvenovány obousměrně. Následně proběhla úprava sekvencí DNA a jejich porovnání pomocí modulu Seqman v rámci Lasergene v. 6.0 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA). Porovnání bylo následně zkontrolováno také ručně. Výsledné sekvence byly vyhledány v databázi ve formátu FASTA, použitým algoritmem byl BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

VÝSLEDKY

Celkem bylo na přítomnost *F. tularensis* vyšetřeno 4 348 jedinců tří druhů klíšťat (*I. ricinus*, *D. reticulatus*, *H. concinna*), 4 100 jedinců komárů druhu *Ae. vexans*

a 6 900 jedinců muchniček rodu *Simulium* spp. Údaje o lokalitách sběru, vyšetřených jedincích (druhu, stadiu, pohlaví) a prevalence *F. tularensis* jsou přehledně shrnuty (tab. 1 a 2). Z celkově vyšetřených 505 vzorků klíšťat, 69 vzorků muchniček a 41 vzorků komárů byly zjištěny 2 pozitivní vzorky. V případě positivity se jednalo o vzorek číslo 114 (směs samic *D. reticulatus*, lokalita Ladhá, metoda vlajkování) a vzorek číslo 404 (jedinec *D. reticulatus*, lokalita Poštorná, odběr ze srnce obecného). Pozitivita těchto dvou vzorků byla určena pomocí Real-Time PCR a následně ověřena i konvenční PCR a elektroforézou. Pro porovnání sekvenční homologie vzorku 114 s jinými sekvencemi dostupnými v GenBank databázi Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) pomocí nástroje BLASTn (nucleotide-nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) byla prokázána shoda s *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen B-8364 chromosome (*complete genome*) a mnoha dalšími kmeny *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Tabulka 1. Souhrnná tabulka vyšetření vzorků klíšťat na přítomnost *Francisella tularensis*

Table 1. Summary table for the examination of ticks for *Francisella tularensis*

Lokalita	Samice (D.r./I.r./H.c.)	Samci (D.r./I.r./H.c.)	Nymfy (D.r./I.r./H.c.)	Celkem dle druhů (D.r./I.r./H.c.)	Počet vyšetřených klíšťat/počet směsí/ prevalence (%)	Pozitivní vzorky
Klíšťata sbíraná metodou vlajkování (1 vzorek = 10 jedinců)						
Břeclav – Ladhá	26/16/0	17/11/1	0/40/0	43/67/1	1110/111/0,09	1
Janův Hrad – Podivín	1/9/0	1/9/1	0/3/0	2/21/1	240/24/0	0
Lanžhot	11/3/0	6/4/0	0/0/2	17/7/2	260/26/0	0
Rendezvous – Valtice	16/5/1	10/4/3	0/11/2	26/20/6	520/52/0	0
Sportoviště – Valtice	18/5/0	14/5/0	0/3/0	32/13/0	450/45/0	0
Štrosflek	25/1/0	23/1/0	0/0/0	48/2/0	500/50/0	0
Zahrádky – Valtice	38/12/0	22/12/1	0/32/2	60/56/3	1 190/119/0	0
Celkem	135/51/1	93/46/6	0/89/6	228/186/13	4 270/427/0,02	1
Klíšťata odebraná z divokých zvířat (1 vzorek = 1 jedinec)						
Hlohovec	0/7/2	0/0/0	0/0/0	0/7/2	9/---/0	0
Mikulov	0/0/6	0/0/1	0/0/1	0/0/8	8/---/0	0
Poštorná	1/4/0	0/0/0	0/0/0	1/4/0	5/---/20	1
Strachotín	0/5/0	0/1/0	0/0/0	0/6/0	6/---/0	0
Tvrdonice	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0/1/0	1/---/0	0
Valtice	0/42/5	0/0/2	0/0/0	0/42/7	49/---/0	0
Celkem	1/59/13	0/1/3	0/0/1	1/60/17	78/---/1,28	1

Vysvětlivky: D.r. – *Dermacentor reticulatus*; I.r. – *Ixodes ricinus*; H.c. – *Haemaphysalis concinna*.

Explanations: D.r. – *Dermacentor reticulatus*; I.r. – *Ixodes ricinus*; H.c. – *Haemaphysalis concinna*.

Tabulka 2. Souhrnná tabulka vyšetření vzorků komárů a muchniček na přítomnost *Francisella tularensis*
Table 2. Summary table for the examination of mosquitoes and blackflies for *Francisella tularensis*

Lokalita	Komáři (<i>Aedes vexans</i>)	Muchničky (<i>Simulium</i> spp.)	Počet vyšetřených jedinců/ počet směsí/prevalence (%)	Pozitivní vzorky
Směsi komárů a muchniček (1 vzorek = 100 jedinců)				
Apollo	0	3	300/3/0	0
Kančí Obora	26	8	3 400/34/0	0
Obora Soutok	0	42	4 200/42/0	0
Pohansko	0	1	100/1/0	0
Tvrdonice	0	14	1 400/14/0	0
Břeclav	0	1	100/1/0	0
Hvězda	15	0	1 500/15/0	0
Celkem	41	69	11 000/110/0	0

DISKUSE

Tato práce je nejrozsáhlejším molekulárním screeningem různých skupin hematofágních členovců na přítomnost *F. tularensis* (porovnáno s dostupnou literaturou). Výzkum probíhal v několika lokalitách v okrese Břeclav v Jihomoravském kraji. Lokality pro sběr klíšťat byly vytipovány na základě dostupných epidemiologických dat poskytnutých Státním zdravotním ústavem, Krajskou hygienickou stanicí Jihomoravského kraje se sídlem v Brně a místními veterináři a infektoLOGY. Minimální prevalence *F. tularensis* (tj. jedno klíště v dané směsi je pozitivní) u klíšťat odchycených metodou vlnkování byla 0,02 % (1/4 270), prevalence u klíšťat odebraných z divoké zvěře byla 1,28 % (1/78), zatímco u ostatních zástupců hematofágních členovců (komáři a muchničky) nebyla *F. tularensis* prokázána. Námi zjištěné relativně nízké hodnoty prevalence jsou nižší jak v rámci České republiky, tak i v porovnání s jinými evropskými zeměmi. V důsledku nastavení velmi citlivé Real-time PCR, která je schopna detegovat dokonce 1 buňku *F. tularensis* ve vzorku je zřejmé, že volba směsných vzorků neovlivnila konečnou prevalenci *F. tularensis* v daném souboru hematofágních členovců. S největší pravděpodobností došlo k vyšetřování vzorků v tzv. meziepidemickém období, kdy cirkulace patogenu v přírodním ohnisku nákazy je utlumena, což koresponduje i s incidencí u lidí v daném kalendářním roce (SZÚ). V roce 2022, kdy probíhal výzkum, byla incidence hlášených případů tularemie u lidí nízká a její hodnota 0,4 na 100 000 obyvatel pro ČR byla shodná s incidencí v Jihomoravském kraji. Ve třech letech 2019, 2020 a 2021, které předcházely studii, byla incidence v Jihomoravském kraji (2,9; 1,4 a 0,7 na 100 000 obyvatel), tedy vždy vyšší, než v roce výzkumu

mu a pokaždé převyšovala incidenci celorepublikovou (1,0; 0,7 a 0,5/100 000 obyvatel) v jednotlivých letech. V roce 2023 incidence onemocnění tularemii v Jihomoravském kraji opět stoupla na 0,7 a v celé ČR na 0,5 na 100 000 obyvatel [Zdroj: ISIN, Informační systém infekčních nemocí, Státní zdravotní ústav, Praha].

Jižní Morava, zejména oblast dolního toku řeky Dyje a Moravy při hranicích s Rakouskem a Slovenskem, je dlouhodobě (od roku 1936) známá jako oblast endemického výskytu tularemie [12, 13]. V bývalém Československu byla *F. tularensis* izolována v klíšťatech *I. ricinus* [14, 15, 16, 17], *I. trianguliceps* [18], *Haemaphysalis concinna* [19] a *D. reticulatus* [20], který je z dlouhodobého pohledu také nejvýznamnějším vektorem a současně rezervoárem agens [21]. Transstadiální přenos *F. tularensis* byl prokázán experimentálně u *I. ricinus* i *D. reticulatus* [15, 22, 23], a transovariální přenos byl popsán u *D. reticulatus* [13, 15]. Prevalence *F. tularensis* v klíšťatech *D. reticulatus* v Česku a na Slovensku se v minulých letech pohybovala v rozmezí jednotek procent (0–2,6 %) [20, 21, 24]. Podobné hodnoty prevalence byly zaznamenány i v okolních zemích jako jsou Bělorusko (0,9 %), Francie (1 %), Maďarsko (0 %), Portugalsko (8,9 %) a Španělsko (0,5 %) [25, 26, 27, 28, 29]. Vyšší prevalence byla naopak detekována při vyšetřování klíšťat *I. ricinus* v Srbsku (3,8 %) [30] a Německu (8,4 %) [31]. Obecně platí, že u prací, kde jsou uváděny vysoké hodnoty prevalence *F. tularensis*, je třeba vyloučit nespecifický záchyt tzv. 'Francisella-like' endosymbiontů [9].

V severských zemích se na základě dostupných dat zvažuje také přenos *F. tularensis* infikovanými komáři [3, 32, 33]. *F. tularensis* byla prokázána v roce 2019 v odchycených komárech *Aedes cinereus* při sezonní epidemii v centrálním Švédsku [34]. Navíc některé švédské

práce experimentálně potvrzují transstadiální přenos *F. tularensis* v komárech [33, 35, 36]. Finská studie z roku 2021 prokázala absenci *F. tularensis* v klíšťatech *I. ricinus*, na rozdíl od významné prevalence *F. tularensis* v komárech [37]. Naše studie z roku 1997, která probíhala v endemické oblasti výskytu tularemie na Břeclavsku, však nepotvrdila výskyt *F. tularensis* u komárů (bylo vyšetřeno celkem 9167 samic komárů *Aedes* spp.) [38]. Absenci *F. tularensis* v komárech potvrzuje i tato práce. Přenos *F. tularensis* komáry stejně jako muchničkami lze tedy v rámci střední Evropy považovat za spíše nepravděpodobný [39].

ZÁVĚR

Povědomí o tularemii je v běžné populaci i u praktických lékařů spíše nízké, příznaky onemocnění nejsou ve většině případů specifické, a proto mnohdy není onemocnění vůbec diagnostikováno nebo je zaměněno s jinou zoonózou. Navíc počet případů ulceroglandulární formy tularemie způsobené sáním klíšťat v poslední době narůstá i v důsledku změn environmentálních či socio-ekonomických. Je třeba definovat a lépe prozkoumat všechny možné zvířecí rezervoáry, přenašeče a vodní i suchozemská prostředí, ve kterých *F. tularensis* přežívá. Pro správné pochopení cirkulace *F. tularensis* v přírodním ohnisku nákazy je vhodné zvýšit aktivní dohled (tzv. surveillance), a souběžně vyšetřovat lidskou populaci (např. screening protilátek), volně žijící i domácí zvířata a hematofágní vektory (klíšťata) v souladu s aktuálně doporučovaným konceptem Jedno zdraví (One Health).

LITERATURA

- Neemann KA, Snowden JN. Tularemia. In D. Schlossberg (Ed.), *Clinical Infectious Disease* (2. vyd.). Cambridge University Press, 2015:1007–1009. ISBN: 978-1-107-03891.
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020; 70(11):5607–5612.
- Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: A review. *Epidemiol Infect*, 2015;143(10):2137–2160.
- Hubálek Z, Rudolf I. *Microbial Zoonoses and Saprozooses*. Springer: Dordrecht, 2011:51–81.
- Troha K, Božanič Urbančič N, Korva M, et al. Vector-Borne Tularemia: A Re-Emerging Cause of Cervical Lymphadenopathy. *Trop Med Infect Dis*, 2022;7(8):189.
- Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015;13(2):141–144.
- Evans ME, Gregory DWMD, Schaffner WMD, et al. A 30-Year Experience With 88 Cases. *Medicine*, 1985;64(4):251–269.
- Versage JL, Severin DDM, Chu MC, et al. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. *J Clin Microbiol*, 2003;41(12):5492–5499.
- Michelet L, Bonnet S, Madani N, et al. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: Evaluation of current molecular techniques. *Vet Microbiol*, 2013;163(3–4):399–403.
- Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, et al. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997;35(5):1045–1048.
- Vencílková K, Mendel J, Betášová L, et al. Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks Tick Borne Dis*, 2016;7:107–112.
- Drbohlav J. L'épidémie de tularemie en Tchécoslovaquie. *Les Trav. L'Inst. Hyg. Publ. L'Et. Tchecos*, 1937;8:79–104.
- Benda R, Heyberger K, Čapek J. Tularemia in the lower reaches of the Morava river (In Czech). *Voj zdrav listy*, 1955;24:419–425.
- Benda R, Heyberger K. Isolation of *Pasteurella tularensis* from engorged *Ixodes ricinus* ticks (in Czech). *Českosl Biol*, 1953;2:308–311.
- Heyberger K, Benda R, Čapek J. A complex investigation of a natural focus of tularemia in South Moravia during an interepizootic period (In Czech). *Přírodní Ohniská Nákaz* (ed. By D. Blaško-vič), SAV Bratislava, 1956:173–189.
- Hubálek Z, Juřicová Z, Peško J. Isolation of *Francisella tularensis* from *Ixodes ricinus* ticks in the protected Lands cape Area of Pálava. *Českosl Epidem*, 1987;36:223–230.
- Hubálek Z, Juřicová Z, Halouzka J. *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. *Folia Parasitol*, 1990;37:255–260.
- Guryčová D, Lysý J, Lichard M, et al. Study of a natural focus of tularemia in the Small Carpathian mountains. *Bratisl Lek Listy*, 1982;78:155–163.
- Kmety E, Guryčová D, Jareková J, et al. Versuch der Tilgung eines Naturherdes der Tularamie und der Leptospirose. *Zbl Bakt Hyg*, 1987;266:249–254.
- Hubálek Z, Tremel F, Halouzka J, et al. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularemia. *Med Vet Entomol*, 1996;10(3):241–246.
- Hubálek Z, Rudolf I. *Francisella tularensis* prevalence and load in *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Central Europe. *Med Vet Entomol*, 2017;31(2):234–239.
- Petrov VG, Olsufiev NG. Replication of *Bacterium tularensis* in *Dermacentor pictus* ticks in the course of their metamorphosis (in Russian). *Vopr Krai Obsch Eksp Parazitol Med Zool* (Moskva), 1953;8:149–156.
- Výrosteková V. *Importance of some ectoparasites in the natural locality of tularemia* (In Slovak). Ph.D. thesis, Comenius University, Bratislava, 1984:1–50.
- Guryčová D, Kocianová E, Výrosteková V, et al. Prevalence of Ticks Infected with *Francisella tularensis* in Natural Foci of Tularemia in Western Slovakia. *Eur J Epidemiol*, 1995;11(4):469–474.
- Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, et al. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. *PLoS One*, 2013;8(1):e54476.
- de Carvalho IL, Escudero R, García-Amil C, et al. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 2007;13(4):666–667.
- Egyed L, Élő P, Sréter-Lancz Z, et al. Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. *Ticks Tick Borne Dis*, 2012;3(2):90–94.
- Reis C, Cote M, Paul REL, et al. Questing Ticks in Suburban Forest Are Infected by at Least Six Tick-Borne Pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011;11(7):907–916.
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg*, 2009;81(1):67–74.
- Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp Appl Acarol*, 2008;45:171–183.
- Gehring H, Schacht E, Maylaender N, et al. Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis* holarctica in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013;4(1):93–100.
- Eliasson H, Sjöstedt A, Bäck E. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularemia. *Scand J Infect Dis*, 2005; 37(11–12):833–837.
- Thelaus J, Andersson A, Broman T. *Francisella tularensis* Subspecies holarctica Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists Through the Developmental Stages of Laboratory Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. *Microbial Ecol*, 2014; 67(1):96–107.

34. Dryselis R, Hjertqvist M, Makitalo S, et al. Large outbreak of tularemia, central Sweden, July to September 2019. *Eurosurveillance*, 2019;24:1–2.
 35. Bäckman S, Näslund J, Forsman M, et al. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci Rep*, 2015;5(1):7793.
 36. Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, et al. Transstadial Transmission of *Francisella tularensis* holarctica in Mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(5):794–799.
 37. Sormunen JJ, Pakanen VM, Elo R, et al. Absence of *Francisella tularensis* in Finnish *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, 2021;12(6):101809.
 38. Hubálek Z, Halouzka J. Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. *J Med Entomol*, 1997;34(6):660–663.
 39. Nieboer LFWJ, Ficher EAJ, Braks. Available evidence for mosquito-borne *Francisella tularensis* transmission is inconclusive. *Front Trop Dis*, 2023;4:1–11.
-

Poděkování

Práce byla finančně podpořena v rámci projektu Agentury pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví České republiky (reg. číslo projektu NU21-05-00143). Autoři by rádi poděkovali primáři infekčního oddělení nemocnice Břeclav MUDr. Danielu Fuchsovi za informace o klinických případech tularemie u lidí na Břeclavsku a MVDr. Markétě Reichelové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. za poskytnutí DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Do redakce došlo dne 24. 5. 2024.

Adresa pro korespondenci:
doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.
Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.
Klášteří 212
691 42 Valtice
e-mail: rudolf@ivb.cz

Epidemie septických onemocnění u pacientů operovaných na operačních sálech nemocnice primárního typu

Prattingerová J.^{1,2,3}, Poloprutská Š.⁵, Příkazský V.³, Smetana J.², Valenta V.⁴

¹Krajská nemocnice Liberec, a.s.

²Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta

³Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií

⁴Technická univerzita v Liberci, Fakulta přírodně-humanitní a pedagogická

⁵Krajská hygienická stanice Libereckého kraje

SOUHRN

Systematické šetření epidemie výskytu případů septických onemocnění devíti osob operovaných na operačních sálech nemocnice primárního typu v období od 26. do 28. 11. 2018 bylo zaměřeno na zjištění rozsahu události, vehikula a cesty přenosu nákazy. Komplexní šetření zahrnovalo metody epidemiologické, mikrobiologické, molekulárně biologické a environmentální. Retrospektivní kohortová studie byla uplatněna pro průkaz asociace jednotlivých expozičních faktorů a výsledků, případů septických onemocnění. Z 24 operovaných osob onemocnělo devět (AR 37,5 %). V biologickém materiálu dvou nemocných osob byl nalezen identický kmen *Acinetobacter calcoaceticus*. Kombinované šetření neodhalilo vehikulum ani cestu přenosu. Okamžitě uplatněná protiepidemická opatření zamezila výskytu dalších případů septických onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

sepsis – epidemie – kohortová studie

ABSTRACT

Prattingerová J., Poloprutská Š., Příkazský V., Smetana J., Valenta V.: An outbreak of septic conditions following surgery in the operating theatres of a primary hospital

A systematic investigation of an outbreak of postoperative sepsis in nine patients following surgery in the operating rooms of a primary-type hospital between November 26 and 28, 2018 was conducted to determine the extent of the outbreak, the vehicle, and the route of transmission. The comprehensive investigation included epidemiological, microbiological, molecular biological, and environmental methods. A retrospective cohort study was used to find associations between individual exposure factors and outcomes, the respective septic conditions. Nine of 24 surgery patients were infected (AR 37.5 %). An identical strain of *Acinetobacter calcoaceticus* was found in biological specimens of two infected patients. The combined investigation did not reveal the vector or route of transmission. Immediate infection prevention and control measures avoided new cases of postoperative sepsis.

KEYWORDS

sepsis – outbreak – cohort study

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 153–158
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138067>

ÚVOD

Ve středu dne 28. 11. 2018 ve 13 hodin informovala lékařka akutního interního příjmu nemocnice terciálního typu epidemiologa Krajské hygienické stanice Libereckého kraje (KHS) o hospitalizaci již druhého pacienta s klinickým a laboratorním obrazem sepse po operaci provedené na operačních sálech v nemocnici primárního typu (dále jen Nemocnice) jeden den

před prvními příznaky onemocnění. Téhož dne pracovníci protiepidemického odboru KHS v Nemocnici zahájili epidemiologické šetření a šetření zaměřené na dodržování základních legislativně a provozním řádem nastavených hygienických a protiepidemických opatření. Cílem šetření bylo určit rozsah epidemické události, identifikovat původce, vehikulum nákazy a cestu přenosu a zabránit vzniku dalších případů onemocnění.

METODY

Událost jsme šetřili systematickým víceetapovým přístupem, který zahrnoval potvrzení epidemického výskytu, definici případu, popisnou fázi včetně získání biologických a environmentálních vzorků pro průkaz původce, stanovení hypotéz o zdroji, vehikulu a cestě přenosu a analytickou fázi pro průkaz vztahu expozice a vzniku onemocnění [1].

Definice případu

Případ byl definován jako osoba operovaná v období 26.–28. 11. 2018 na operačních sálech Nemocnice, která vykazovala známky klinické sepse diagnostikované lékařem v souladu s definicí Komise EU: klinická seps u dospělých – pacient má nejméně jeden z těchto příznaků: klinické známky nebo příznaky bez jiné rozpoznané příčiny, horečka ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), hypotenze (systolický tlak $< 90\text{ mm/Hg}$), nebo oligurie ($< 20\text{ cm}^3$, ml/hod) a hemokultura nebyla provedena nebo v krvi nebyly zjištěny žádné organismy ani antigeny, a žádná zjevná infekce na jiném místě, a lékař zvolil léčbu sepse [2].

Metoda vyhledávání dalších případů

Případy onemocnění jsme vyhledávali ve spolupráci s ošetřujícími lékaři Nemocnice a studiem zdravotní dokumentace všech pacientů operovaných v Nemocnici ve dnech 26.–28. 11. 2018.

Epidemiologické šetření

Událost jsme popsali podle místa, času a osoby. Demografická data a všechna data o expozici a dalších faktorech s možným vztahem ke vzniku onemocnění sepsí jsme zaznamenávali do digitální formy (excelová tabulka) pro následné statistické zpracování.

Analytická studie

Provedli jsme retrospektivní kohortovou studii, pomocí které jsme hledali souvislost (asociaci) mezi jednotlivými expozicemi rizikovými faktorům (operační sály, přístroje, nástroje, léčiva podávaná před operací, v průběhu operace a na oddělení po operaci do doby prvních příznaků onemocnění, typ sterilizačního cyklu) a onemocněním. Expozice byla definována binárně jako „ano“ nebo „ne“. Studovanou populací byly osoby operované na operačních sálech Nemocnice ve dnech 26. až 28. 11. 2018. Pro vyjádření asociace mezi rizikovými faktory a onemocněním jsme počítali relativní riziko (RR), 95% konfidenční interval a p-hodnotu. K testování nulové hypotézy jsme použili Fisherův exaktní test pro kategorické proměnné a t-test pro kardinální proměnné. K mnohorozměrné analýze jsme použili logistickou regresi. P-hodnota $\leq 0,05$ byla považována za statisticky významnou. K analýze jsme použili software STATA StataCorp 4905 Lakeway Drive College Station, Texas 77845 USA, verze 13.

Laboratorní metody

Klinický materiál (hemokultury, vzorky plasmy ve zkumavkách s EDTA odebrané na biochemické vyšetření, které byly v laboratoři dostupné od všech pacientů, stěry a další materiál) byl v laboratořích zpracován metodou základního a rozšířeného kultivačního vyšetření v aerobních a anaerobních podmínkách a metodou druhové/rodové identifikace diagnostickými systémy MALDI-TOF. Byla provedena metabolicko-fyziologická profilace a genotypová subtypizace-makrorestrikční analýzou PFGE a byla použita molekulárně-genetická metoda amplifikace části genu pro 16S rRNA s následnou sekvenací DNA.

Provedli jsme stěry z prostředí operačních sálů, odběry sterilního materiálu k vyšetření sterility, odběry infuzních roztoků a nechali jsme vyšetřit obsah lahviček anestetika Propofol použitých na sálech ve dnech 26.–28. 11. 2018, které byly vyhledány v odpadu. Stěry byly zpracovány metodou základního kultivačního vyšetření. Vyšetření sterilního materiálu bylo provedeno zkouškou dle metodiky uvedené v AHEM 7/1992 [3] a Českého lékopisu v platném znění. Vyšetření infuzních roztoků bylo provedeno dle Českého lékopisu v platném znění.

Další vyšetřování

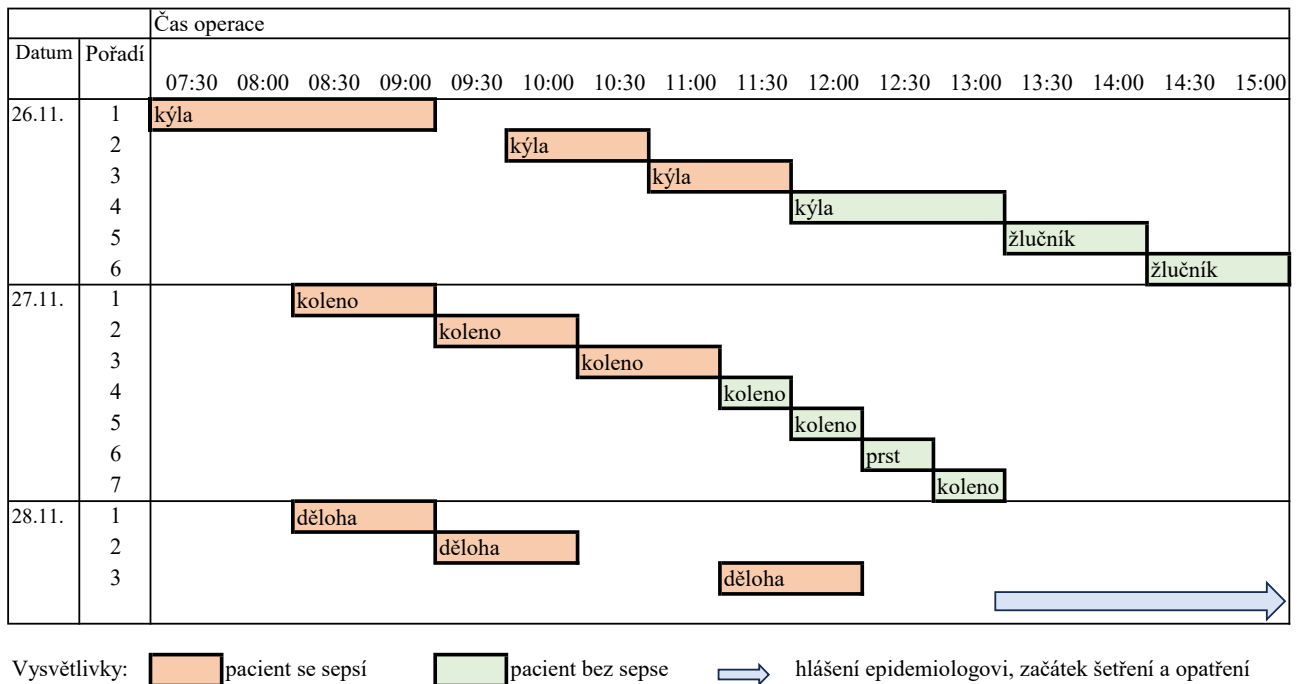
Provedli jsme šetření zaměřené na dodržování hygienických a protiepidemických zásad dle zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví v platném znění, ve spojení s vyhláškou č. 306/2012 Sb., o podmínkách vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče v platném znění. Dále jsme vedli pohovory se zdravotnickým personálem zaměřené na přípravu operačních sálů, přípravu pacientů na operaci, na manipulaci s nástroji, přístroji, léčivy pro každou jednotlivou operaci ve dnech 26.–28. 11. 2018 a péči o pacienty po operacích včetně podávaných léčiv.

VÝSLEDKY

Epidemiologické šetření

Ve dnech od 26. do 28. 11. 2018 bylo na operačních sálech Nemocnice operováno celkem 24 osob z toho 11 mužů. Medián věku operovaných osob byl 49,5 roku (rozpětí 15–75 let). Šestnáct osob bylo operováno ve velkém sále, 8 v malém sále. Sepsí onemocnělo 9 osob, z toho čtyři muži.

Onemocněly pouze osoby operované ve velkém sále. Medián věku nemocných osob byl 50 let (rozpětí 15–75 let). Attack rate činil 37,5 %. Všechny případy onemocnění byly hospitalizovány v nemocnici terciálního typu. Zdravotní stav pěti osob vyžadoval hospitalizaci na ARO, tři osob na JIP a jedna osoba byla hospitalizována na infekčním oddělení. Inkubační doba se pohybovala v řádu hodin (rozsah od 1,75 do 49 hodin) jak uvádí obrázek 1.



Obr. 1. Rozdělení osob operovaných v Nemocnici ve velkém operačním sále, podle data, času operace, pořadí v operačním programu a operované části těla, 26.–28. 11. 2018 (n = 16)

Figure 1. Distribution of persons operated on in the Hospital in the large operating room, according to date, time of operation, order in the operation program and operated body part, 26.–28. 11/2018 (n = 16)

Laboratorní výsledky

U všech 9 osob s příznaky sepse byl bakteriologický výsledek hemokultury negativní. Vzorky plasmy od všech osob, byly negativní s výjimkou osoby č. 2, u které byl detekován *Acinetobacter calcoaceticus*. V ostatním klinickém materiálu byl u osoby č. 2 identifikován *Acinetobacter calcoaceticus* ve stěru z dutiny břišní a u osoby č. 7 *Acinetobacter calcoaceticus* z vaginální tamponády. Molekulárně genetické analýzy potvrdily, že nad rozumnou pochybnost se jedná o tři izoláty téhož kmene *Acinetobacter calcoaceticus*.

Analytická studie

Analyzovali jsme vztah 49 různých rizikových faktorů s onemocněním. Rizikové faktory, kterým byly exponovány minimálně tři operované osoby, jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny případy onemocnění byly operovány ve velkém sále laparoskopickou metodou. Osoby operované v malém sále neonemocnely. Nebyla nalezena asociace mezi případy a pohlavím ($p = 0,92$) a nebyla nalezena asociace mezi případy a věkem ($p = 0,49$). V jednorozměrné analýze byl jen Hartmannův roztok statisticky významně asociován s případy ($p < 0,01$). Všechny osoby, které dostaly tento roztok, onemocněly. Ani jedna z osob, která Hartmannův roztok nedostala, neonemocněla. Žádný další rizikový faktor nebyl statisticky významně asociován s případy. Mnohorozměrná analýza nepřinesla žádný statisticky významný výsledek.

Šetření zaměřené na dodržování hygienických a protiepidemických opatření

Na operačních sálech byly zjištěny hygienické a protiepidemické závady a postupy v rozporu s platnou legislativou i provozním řádem zdravotnického zařízení. Porušením bylo používání sterilizačního cyklu při parametrech 134 °C/4 minuty, který je určen pouze pro nebalené kovové nástroje k okamžitému použití. Tento cyklus byl v Nemocnici používán pro operační síta s dutými nástroji a balená síta s chirurgickými nástroji bez dutin. Dále byly zjištěny závady v předsterilizační přípravě nástrojů, kdy zkouška krevní kontaminace pomocí proužků HemoPHAN u nástrojů po provedené předsterilizační přípravě a sterilizaci, vybalených ze sterilizačních obalů prokázala ve třech případech ze tří krevní kontaminaci. Všechny 10 chirurgických nástrojů různých typů vyšetřených na sterilitu bylo kulturačně negativních. U tří na operačních sálech odebraných infuzních roztoků (2krát fyziologický roztok, 1krát Ringerův roztok) mikrobiologické vyšetření neprokázalo kolonie tvořící bakteriální jednotky. V žádné ze tří 100ml prázdných lahvíček anestetika Propofol použitých na operačních sálech ve dnech 26.–28. 11. 2018 vytažených z odpadu, nebyla zjištěna bakteriální kontaminace. Bylo zjištěno, že na operačních sálech bylo běžnou praxí používat 100ml balení Propofolu pro více pacientů a dávky natahovat jednou stříkačkou do spotřebování obsahu lahvíčky, v rozporu se souhrnem údajů o přípravku (SPC).

Ve dnech 26. 11.–28. 11. 2018 byla dle sdělení personálu každý den otevřená nová lahvička. V žádném z 21 stěrů

z prostředí operačních sálů Nemocnice nebyl identifikován *Acinetobacter calcoaceticus*.

Tabulka 1. Vztah specifické expozice a výsledku (onemocnění sepsí) v jednorozměrné analýze v souboru pacientů operovaných na operačních sálech Nemocnice, 26.–28. 11. 2018 (n = 24)

Table 1. Relationship between specific exposure and outcome (sepsis disease) in a univariate analysis in a group of patients operated on in the operating theaters of the Hospital, 26.–28. 11/2018 (n = 24)

Expozice	Expozice ANO				Expozice NE				RR	CI 95 %	p-hodnota
	Onemocnění		celkem	AR %	Onemocnění		celkem	AR %			
	ano	ne							ano	ne	
Zavedení i. v. vstupu na oddělení	3	3	6	50,00	6	12	18	33,33	1,50	0,53–4,21	0,63
Antibiotická profylaxe (oddělení, sál)	3	3	6	50,00	6	12	18	33,33	1,50	0,53–4,21	0,63
Inhalační anestezie Sevorane	9	13	22	40,91	0	2	2	0,00	.	[.-.]	0,51
Nástroje sterilizované 134 °C 4 minuty	6	10	16	37,50	3	5	8	37,50	1,00	0,33–2,99	1,00
Nástroje sterilizované 134 °C 7 minut	6	5	11	54,55	3	10	13	23,08	2,36	0,76–7,31	0,21
Malé operační síto	0	5	5	0,00	9	10	19	47,37	0,00	[.-.]	0,12
Artroskopické operační síto	3	3	6	50,00	6	12	18	33,33	1,50	0,53–4,21	0,63
Žlučnickové síto	2	2	4	50,00	7	13	20	35,00	1,43	0,45–4,50	0,62
Endoskopické síto	6	4	10	60,00	3	11	14	21,43	2,80	0,91–8,61	0,09
Vaginální síto	2	2	4	50,00	7	13	20	35,00	1,43	0,45–4,50	0,62
Propofol i. v. na sále	9	13	22	40,91	0	2	2	0,00	.	[.-.]	0,51
Novalgin i. v. na sále	9	12	21	42,86	0	3	3	0,00	.	[.-.]	0,27
Sufenta i. v. na sále	9	13	22	40,91	0	2	2	0,00	.	[.-.]	0,51
Rocuronium i. v. na sále	6	7	13	46,15	3	8	11	27,27	1,69	0,55–5,24	0,42
Syntostigmin i. v. na sále	2	1	3	66,67	7	14	21	33,33	2,00	0,73–5,45	0,53
Atropin i. v. na sále	2	1	3	66,67	7	14	21	33,33	2,00	0,73–5,45	0,53
Plasmalyte i. v. na sále	5	9	14	35,71	4	6	10	40,00	0,89	0,32–2,51	1,00
Ringerův roztok i. v. na sále	4	6	10	40,00	5	9	14	35,71	1,12	0,40–3,15	1,00
Almiral i. v. na oddělení	2	3	5	40,00	7	11	18	38,89	1,03	0,30–3,48	1,00
Fyziologický roztok i. v. na oddělení	6	4	10	60,00	3	10	13	23,08	2,60	0,85–7,92	0,10
Hartmannův roztok i. v. na oddělení	6	0	6	100,00	3	14	17	17,65	5,67	2,03–15,82	< 0,01

DISKUSE

Infekce spojené se zdravotní péčí (HAI) jsou časté a obávané komplikace poskytování zdravotní péče. Přes množství existujících poznatků a znalostí o jejich prevenci se epidemie stále objevují. V této zprávě popisujeme a analyzujeme epidemii závažných sepsí po operacích provedených ve třech po sobě následujících dnech. Okamžité uzavření operačních sálů zamezilo vzniku dalších případů onemocnění.

Analýzou dostupných epidemiologických údajů a výsledků laboratorních vyšetření se nepodařilo jednoznačně prokázat původce, ani jakým způsobem došlo k přenosu nákazy. Na základě posouzení klinických příznaků onemocnění a rychlosti jejich rozvoje se domníváme, že k přenosu nákazy muselo dojít krevní cestou. U dvou pacientů byl v biologickém materiálu odebraném po vzniku potíží identifikován *Acinetobacter calcoaceticus*. U pacienta č. 2 v hemokultuře, která byla založena z plasmy ze zkumavky s EDTA odebrané původně na biochemické vyšetření při vzniku prvních potíží v Nemocnici a u stejného pacienta ze stěru odebraného v nemocnici terciálního typu při revizi dutiny břišní a dále u pacientky č. 7 z vaginální tamponády, byl shodně identifikován *Acinetobacter calcoaceticus*. U zbývajících 7 pacientů se nepodařilo etiologické agens detekovat. Limitací tohoto postupu je, že biologický materiál u pacienta č. 2 nebyl odebraný speciálně na hemokulturu. *Acinetobacter calcoaceticus* je primárně environmentální druh, který se běžně vyskytuje v půdě a vodních ekosystémech, zatímco u lidí se izoluje pouze ojediněle. V evropské bodové prevalenční studii organizované ECDC v letech 2011–2012 v 8 114 mikrobiologicky potvrzených HAI zaznamenali 4 případy způsobené *Acinetobacter calcoaceticus* (jen 0,05 %) [4]. Diskutovali jsme s odborníky okolnosti, proč se *Acinetobacter calcoaceticus* nemusel detekovat v lahvičkách použitých na operačních sálech ve dnech 26.–28. 11. 2018. Jednou z možností pro negativní výsledek bylo, že metoda použitá k detekci (později detekovaného organismu) mikroorganismů v lahvičkách Propofolu, použitých ve dnech 26.–28. 11. 2018 nebyla dostatečně citlivá [osobní sdělení]. Kultivace obsahu lahviček byla provedena pouze na agarové půdě bez selektivního pomnožení a dále byl obsah vyšetřen pomocí elektronové mikroskopie. Tato kultivace byla provedena v době, kdy suspektní etiologické agens *Acinetobacter calcoaceticus* ještě nebylo známo, takže nebyl důvod použít citlivější nebo cílené metody. Podle výpovědi zdravotnických pracovníků bylo balení Propofolu na operačních sálech používáno opakovaně pro více pacientů. To je v rozporu s SPC a doporučením SÚKL ze dne 20. 10. 2017, kde se uvádí: „Obsah jedné ampulky nebo lahvičky s Propofolem a jakékoli stříkačky obsahující látku propofol je určen k jednorázovému použití u jednoho pacienta. Jakýkoli zbytkový obsah musí být zlikvidován. Přípravky s látkou propofol jsou

lipidovou emulzí bez antimikrobiálního konzervantu a mohou podporovat rychlý růst mikroorganismů“ [5]. Příklady komplikací po podání kontaminovaného Propofolu jsou opakovaně popisovány v literatuře [6, 7]. Naše analytická studie neprokázala Propofol jako rizikový faktor, tedy vehikulum etiologického činitele. Vzhledem k tomu, že jsme neměli k dispozici podrobnější informace kdy, kdo a z jakého balení konkrétní léčivo dostal, není naše analýza dostatečně diskriminativní a současně nelze bezpečně tvrdit, že Propofol s onemocněním nesouvisel. Na druhou stranu nelze konstatovat, že jen proto, že s Propofolem nebylo manipulováno lege artis, byl Propofol vehikulelem nákazy. To, že Propofol nebyl vehikulelem nákazy lze usuzovat také z toho, že onemocněli tři po sobě jdoucí operační dny vždy první tři pacienti z operačního programu, přestože další pacienti ve stejný den dostali Propofol z téže lahvičky a neonemocněli. Nevíme, jakým způsobem by mohly způsob růstu, pohyblivost, schopnost sedimentace, schopnost shlukovat se daného mikroorganismu v Propofolu ovlivnit, zda pacient může dostat kontaminovaný roztok. V prázdných lahvičkách od Propofolu použitých v kritických dnech nebyla prokázána kontaminace. Limitací je otázka nedostatečné citlivosti postupu. První fáze, detekce neznámého agens měla negativní výsledek. Dodatečná cílená detekce *Acinetobacter calcoaceticus* z obsahu lahviček v laboratoři provedena nebyla s odůvodněním, že nahromadění možných časových a vnějších vlivů mohlo ovlivnit výsledek.

Analytická epidemiologická studie měla jediný statisticky významný výsledek indikující souvislost podání Hartmannova roztoku na oddělení 6 případům po operaci. Za statisticky významným výsledkem pro tento rizikový faktor se může skrývat expozice faktorům, které nebyly ve zdravotnické dokumentaci zaznamenány, např. typ použitého infuzního setu nebo jiný nepoznaný faktor. Limitací je, že informace o krocích procesu, kterého součástí bylo podání Hartmannova roztoku, chyběla, nebyla rutinně zaznamenávána.

Při šetření byly zjištěny závady v hygienickém a protiepidemickém režimu na operačních sálech týkající se sterilizace a péče o operační nástroje. Ačkoliv se jedná o závažná porušení hygienického režimu, velmi pravděpodobně neměla přímý příčinný vztah k septickým onemocněním, protože pravděpodobně operační rána nebyla vstupní bránou infekce. Tomu nasvědčují i výsledky analytické studie indikující, že žádná expozice operačním nástrojům či sterilizaci neměla statisticky významnou souvislost se vznikem onemocnění.

Limitací této analytické studie jsou záznamy ve zdravotní dokumentaci, které byly různě čitelné a nebyly standardizované. To zamezilo získat všechna dostupná data v jednotné kvalitě. Některé rizikové faktory obsahují časovou složku, o které však nebyly k dispozici záznamy v dokumentaci, proto byly všechny kódovány jen jako binární. Analýza faktorů, kterým

byly exponovány méně než 3 osoby, neposkytuje smysluplné výsledky, proto je neuvádíme.

ZÁVĚR

Neprokázali jsme vehikulum ani cestu přenosu a původce. *Acinetobacter calcoaceticus* byl zjištěn jen u dvou osob. Přínosem uplatněného postupu šetření epidemie zahrnující použití analytické epidemiologické metody je exaktní kvantitativní vyhodnocení vztahu expozice mnoha potencionálním faktorům vehikula a cesty přenosu a výsledku – onemocnění sepsí v prostředí poskytovatelů zdravotní péče. Přináší evidence-based podklady pro ochranu pacientů.

Analytická epidemiologická metoda je velmi zřídka v České republice používána při šetření epidemií a na-prosto výjimečně při šetření epidemií infekcí spojených se zdravotní péčí. Rozvíjející se elektronizace zdravotnické dokumentace přináší nové možnosti standardizace pořizování a využití dat a může významně ulehčit a zlepšit detekci infekcí spojených se zdravotní péčí v rámci jejich surveillance a vést k lepšímu nastavení a efektivitě postupů prevence HAI a provádění analytických studií v případě jejich epidemických výskytů.

LITERATURA

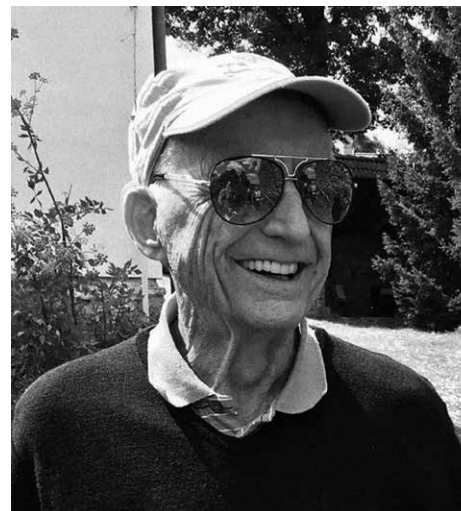
1. Gregg MB. Conducting a field investigation, *Field Epidemiology*. 3rd ed. New York: Oxford Academic; 2008. s. 81–96. ISBN: 9780195313802.
2. Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2018/945 ze dne 22. června 2018 o přenosných nemocích a souvisejících zvláštních zdravotních problémech, které musí být podchyceny epidemiologickým dozorem, a o příslušných definicích případů. 2018. Dostupné na [www: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945).
3. Vybrané mikrobiologické metodiky používané při prevenci a výskytu nemocničních nákaz. Mikrobiologický manuál pro NN: Příloha č.7/1992 k Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica. Praha: SZÚ, 1992.
4. ECDC. *Microorganisms isolated in HAIs (all HAI types) in acute care hospitals in EU/EEA, ECDC-PPS 2011-2012* [online]. [cit. 2023-10-11]. Dostupné na [www: https://www.ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/list](https://www.ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/list).
5. SÚKL. *Propofol – riziko nesprávného používání* [online]. 2017 [cit. 2023-10-11]. Dostupné na [www: https://www.sukl.cz/propofol-riziko-nespravneho-pouzivani](https://www.sukl.cz/propofol-riziko-nespravneho-pouzivani).
6. Zorrila-Vaca A, Arevalo JJ, Escandón-Vargas K, et al. Infectious Disease Risk Associated with Contaminated Propofol Anesthesia, 1989–2014. *Emerging infectious diseases*, 2016;22(6):981–992.
7. Muller AE, Huisman I, Roos PJ, et al. Outbreak of severe sepsis due to contaminated propofol: lessons to learn. *The Journal of hospital infection*, 2010;76(3):225–230.

Do redakce došlo dne 17. 11. 2023.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Jana Pratteringerová
Oddělení ústavní epidemiologie a hygieny
Krajská nemocnice Liberec, a. s.
Husova 1430/34
460 01 Liberec I – Staré Město
e-mail: jana.pratteringerova@gmail.com

Vzpomínka na MUDr. Karla Markvarta, CSc.

(*28. 12. 1933 Ústí nad Labem – †29. 5. 2024 Praha)



MUDr. Karel Markvart, CSc., v roce 1958 ukončil Lékařskou fakultu hygienickou Univerzity Karlovy, obor lékařství, hygiena a epidemiologie. Po působení na Okresní hygienické stanici v Chrudimi a posléze na Krajské hygienické stanici v Hradci Králové se vrátil do Prahy. Nastoupil do Ústavu epidemiologie a mikrobiologie, kde byl ředitelem prof. Karel Raška. Karel Raška se v roce 1963 stal ředitelem sekce infekčních nemocí Světové zdravotnické organizace (WHO) se sídlem v Ženevě, kde prosazoval program eradikace pravých neštovic. Profesor Raška povzbuzoval a motivoval mladé české lékaře k dalšímu vzdělávání a k výjezdům na zahraniční mise. MUDr. Markvart získal osvědčení – specialista v oboru hygiena a epidemiologie. Na první zahraniční misi jako expert WHO odjel v lednu roku 1968 do Bangladéše (do roku 1971 součást pakistánské federace – Východní Pákistán), kde pracoval s přestávkami do roku 1972. Široce založený program plošné vakcinace bylo třeba provádět ve spolupráci s orgány státní správy i místními terénními pracovníky. Program pro mnohamilionovou populaci postupně získával podporu, dr. Markvartovi se podařilo navázat kontakty s pracovníky bangladéšského Ministerstva zdravotnictví. V srpnu 1968 absolvoval školení WHO v americké Atlantě zaměřené zejména na používání rozdvojené jehly k očkování proti pravým neštovicím. Po návratu do Bangladéše pak dále školil místní personál. Tato technika umožňovala provádět očkování i nezdravotnickými pracovníky. Spolu s pracovníky ministerstva se podílel na vypracování programu pro Dháku a okolí, který byl posléze úspěšně dokončen. Na venkově byla situace složitější. Krom jiného bylo třeba překonat nedůvěru místních. Na vynalézavost dr. Markvarta vzpomíná jeden z jeho zahraničních kolegů: „Karel odváděl v Bangladéši úžasnou práci. On i jeho tým byli tak kreativní! Úspěch kampaně závisel na tom, zda se podaří místní lidi přesvědčit, že nechat se očkovat je bezpečné a zároveň účinné. Umíte si představit tu nedůvěru k západní medicíně.

Karel a jeho tým přijeli do vesnice, na korbě nákladáku kapela s tabla bubny a zpěváky. Tím přilákali dav. Lékaři a tlumočníci pak začali informovat místní o výhodách, které očkování proti neštovicím přináší. Byli schopni získat důvěru lidí a navzdory mnoha těžkostem dosahovali skvělých výsledků. S postupem času se strategie očkování pomalu měnila, oproti plošné vakcinaci se uplatňoval princip „surveillance“ – sledování. Bylo třeba zjistit ohnisko nákazy, izolovat nemocné, očkovat všechny kontakty, a poté sledovat ohnisko nákazy. V roce 1971 byla epidemie zvládnuta, nicméně vyhlášení samostatnosti Bangladéše mělo za následek pohyb miliónů uprchlíků do sousední Indie. Uprchlíci při návratu domů zavlekli nemoc zpět do země a program pokračoval. Na jaře 1972 se dr. Markvart vrátil do Prahy. Jako konzultant WHO se do Bangladéše ještě na krátký čas vrátil na podzim 1982 a na jaře 1983, naposledy pak v roce 1984.

Po návratu do Prahy v roce 1972 vedl dr. Markvart epidemiologický odbor Krajské hygienické stanice Středočeského kraje. Nicméně spolupráce s WHO pokračovala a v roce 1977 byl dr. Markvart jedním z lékařů, kteří v somálském přístavu Merca ošetřovali třiatdvacetiletého Ali Maow Maalina, což, jak se později ukázalo, byl poslední přirozený případ nákazy pravými neštovicemi, a tedy historický milník v eradikaci neštovic.

Na podzim roku 1988 odjel na svoji poslední dlouhodobější misi do Jižního Pacifiku. Jako konzultant WHO se podílel na programu zdravotní výchovy zaměřeném zejména na dětskou obrnu, dále na střevní nákazy i nákazy dýchacího traktu. Vedl kurzy očkování proti černému kašli, záškrtu i tetanu pro místní zdravotníky zejména na Fidži, ale v rámci programu pobýval též na Cookových ostrovech: „Při mojí poslední akci v terénu jsme se pohybovali ve společnosti s kmenovým uspořádáním. Bydleli jsme i na ostrově 1 km × 0,5 km. Veškerá evidence byla ... ručně psané záznamy.“ Na podzim 1990 se dr. Markvart opět vrátil do Prahy.

Od roku 1992 do roku 2009 pracoval ve Státním zdravotním ústavu jako vědecký pracovník, vedoucí útvaru vědy a výzkumu a zahraničních styků, dále jako sekretář kolegia vědecké rady SZÚ. Od roku 1993 do roku 2001 pracoval spolu s Ing. K. Bláhou, krátce s MUDr. Z. Šmerhovským, jako šéf redakce časopisu *Central European Journal of Public Health*. Od roku 2002 do 31. 12. 2021 pak tuto pozici zastával sám.

MUDr. Markvart přeložil řadu publikací WHO do češtiny. Byl spoluautorem článků v časopisech Československá epidemiologie, mikrobiologie, imunologie a Československá hygiena. Jako spoluautor, recenzent i překladatel se podílel na vydávání několikavazkového Manuálu prevence v lékařské praxi, který postupně

vycházel od roku 1994. Byl členem správní rady Nadace CINDI založené v roce 1997, která vznikla při českém programu CINDI s cílem pomáhat prevenci a podpoře zdraví hledáním finančních zdrojů a metod zdravotní výchovy.

Kolegové vzpomínají na skvělé pracovní vztahy, oceňují celoživotní práci dr. Markvarta i šíření dobrého jména české epidemiologie ve světě.

Mgr. Ivana Vališová
SZÚ

Po dohodě šéfredaktorů byl příspěvek otištěn i v časopise Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie.

MUDr. Bohuslava Truksová (*4. 7. 1934 – †30. 5. 2024)

Odešel jeden z vynikajících epidemiologů a vzácný člověk. Po absolvování gymnázia v Čáslavi nastoupila na lékařskou fakultu UK v Praze. Příznačné je, že její studium bylo komplikováno poliomyelitidou, kterou onemocněla při jedné z posledních epidemií v Československu.

Po absolutoriu nastoupila na Hygienickou stanici v Kolíně, kde úspěšně pracovala až do konce 90. let. Měla možnost řešit problematiku infekcí, které dnes již téměř neznáme. Podílela se v úzké spolupráci s veterináři na likvidaci mnoha zoonóz od slintavky, přes brucelózu až po eradikaci bovinní tuberkulózy v jednom z posledních izolátů na našem území. Své práci se vždy věnovala s plným nasazením, mnohdy až urputně, vždy s cílem dopátrat se zdroje nákazy. Spolu s kolegy popsala a podrobně zdokumentovala první zachycenou epidemii norovirů na našem území v roce 1976. Byla progresivní i ve svém zaměření na nozokomiální nákazy v době, kdy tato problematika ještě nebyla běž-

ně řešena. Pro její široký záběr svědčí i podíl na získání patentu na nástrahu pro mravence *Monomorium pharaonis*, kteří byli do té doby velmi rozšířeným druhem obtížného hmyzu, zejména na sídlištích.

Pro své pracovní výsledky byla vybrána k účasti na kurz WHO, což v té době byla jedinečná možnost.

Slávinka byla i dobrý psycholog, uměla nadchnout pro obor, uměla vést zaměstnance rukou sice pevnou, ale vlídnou. Přes své pracovní aktivity se dokázala vzorně postarat i o svou milovanou rodinu, na kterou byla po zásluze pyšná. V jejích stopách, byť jiném oboru jdou dcera i jedna z vnuček, které jsou lékařky.

Čest její památce.

MUDr. Zdeňka Jágrová

Po dohodě šéfredaktorů byl příspěvek otištěn i v časopise Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie.

MUDr. Josef Richter, CSc. (*8. 2. 1935–†13. 8. 2024)



Dne 13. srpna 2024 zemřel ve věku 89 let další z účastníků slavné éry československé imunologie 60. a 70. let minulého století MUDr. Josef Richter, CSc. Znal se s mnohými osobnostmi z generace „Pražské imunologické školy“, kteří svou práci a mezinárodními aktivitami v té době významně a nesmazatelně přesáhli hranice tehdejšího Československa a dodnes se na tuto dobu vzpomíná jako na „zlatou éru československé imunologie“. Šťastnou časovou koincidencí bylo i to, že v téže době se začal utvářet nový obor „klinická imunologie“ a osobní provázanost „vědecké“ a „klinické“ komunity byla pro nově se rodící obor doslova pozehnáním.

MUDr. Josef Richter, CSc., se narodil 8. 2. 1935. Promoval v roce 1960 na LFH UK Praha a od té doby pracoval v Krajské hygienické stanici v Ústí nad Labem, od roku 2003 ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ústí nad Labem. Po složení atestace z lékařské mikrobiologie I. stupně (1963) a II. stupně (1967) se jeho odborný zájem plně soustředil na budování samostatného imunologického pracoviště v Ústí nad Labem: samostatné imunologické oddělení v rámci mikrobiologického odboru KHS Ústí nad Labem (1973), později samostatný imunologický odbor (1984). Atestaci z „klinické imunologie“ složil v 70. letech před komisí jmenovanou ministerstvem zdravotnictví pro tehdy de facto ještě neexistující specializační klinický obor. Hodnost kandidáta lékařských věd získal v roce 1982. V období let 1985–1990 zastával funkci hlavního odborníka MZ pro obor Lékařská imunologie.

Jeho první oblastí zájmu byla mikrobiologie, především antiinfekční imunita (např. zoonózy, konkrétně *F. tularensis* nebo fluorescenční průkaz *M. tuberculosis*). Velmi brzy ale u něj zvítězil zájem o tehdy se rodící nový medicínský obor, budoucí Klinickou imunologii a alergologii. Ústeckou imunologii budoval dr. Richter velkoryse s nepřehlédnutelným badatelským zaujetím. Vedle kvalitní laboratorní diagnostiky se rozvíjela

úspěšná spolupráce s řadou klinických oborů. Pracoviště disponovalo i kvalitní laboratoří preparativní biochemie, kde probíhal od 70. let výzkum a příprava imunomodulátorů (např. Thymosin frakce 5 a humánní transfer faktor). Nelze nepřipomenout, že první perorální bakteriální vakcína byla připravena v rámci Československa právě v Ústí a perorální forma xenogenního (vepřového) transfer faktoru (dnes přípravek IMUNOR®) vznikla na ústecké imunologii také jako realizace myšlenky dr. Richtera.

Pepík, jak jsme mu všichni my mladší po krátkém čase působení na oddělení mohli říkat, byl člověk velmi přátelský, imponující odborným rozhledem a zcela jistě lze říci, že byl charismatická osobnost. Ano, byla to nepochybně i Pepíkova osobnost (vedle dobrého jména pracoviště), co postupně přivedlo do Ústí další mladé následovníky, kteří pomáhali budovat dobré jméno a kredit ústecké imunologie. Snad lze pro doložení tohoto tvrzení uvést, že do Ústí se přijížděly podívat osobnosti české/československé jak teoretické, tak klinické imunologie, aby se „podívali, jak se to dělá...“.

Ve výčtu oblastí, kde dr. Richter a ústecká imunologie zanechali viditelnou stopu, je nutno dále uvést sledování změn imunitní reaktivity organismu při monitorování dopadů životního a pracovního prostředí na zdravou populaci. I v této oblasti vznikla řada prioritních výsledků, které ale díky dobově specifickým podmínkám nebylo možné vždy publikovat. Dalo by se hovořit i o vzniku nového oboru „preventivní imunologie“ či „ekoimunologie“ a nebo, jak s mírnou ironií v hlase říkali naši přátelé, „průmyslová imunologie“.

Později v 90. letech se věnoval problematice vlivu nutriční na fyziologii imunitního systému a vlivu kouření na imunitu. V závěru odborné kariéry vedl ve Zdravotním ústavu spolupráci se Světovou zdravotnickou organizací jako jeden z koordinátorů programu „Regions for Health Network in Europe“. Dr. Richter za svůj život publikoval více než 200 publikací a podílel se na

6 monografiích a učebnicích a přednesl nesčetně odborných sdělení – byl vyhledávaným a velmi dobrým řečníkem.

O Pepíkových narůstajících zdravotních problémech v posledních několika letech jsme věděli. Vždy se ale podařilo problémy vyřešit. Proto jsme věřili i tentokrát, že pobyt na kardiologii Masarykovy nemocnice skončí nakonec dobře a Pepíka přivítáme na 32. Severočeské imunologické konferenci. Osud ale rozhodl jinak.

Osobnost dr. Richtera si připomeneme na několika následujících odborných setkáních a prosíme všechny, kteří ho znali a měli rádi, aby mu věnovali tichou vzpomínku. Pepík si to opravdu zaslouží.

RNDr. Vlastimil Král, CSc. a MUDr. Dalibor Jílek, CSc.

Po dohodě šéfredaktorů byl příspěvek otištěn i v časopise Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie.

MUDr. Blanka Horová (*5. 6. 1947 – †8. 7. 2024)



S hlubokým zármutkem oznamujeme, že nás dne 8. 7. 2024 opustila paní primářka MUDr. Blanka Horová.

Narodila se 5. 6. 1947 v Lobči. V roce 1973 promovala na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Jejím prvním pracovištěm byla Mikrobiologická laboratoř v Ústí na Labem. V roce 1975 přešla do Prahy na Mikrobiologické oddělení nemocnice Bulovka, kde pracovala doposud, od roku 1987 jako primářka. V letech 1984 až 1987 přechodně vedla laboratoř TBC v Kateřinské ulici v Praze.

Své nejen odborné, ale i organizační schopnosti osvědčila jako náměstek LPP pro laboratorní obory v nemocnici Bulovka. Po několikaletém úsilí dokázala laboratoře mikrobiologie, hematologie, biochemie a patologie sjednotit do jednoho celku. Pod jejím odborným dohledem byl zrekonstruován pavilon č. 8 v nemocnici Bulovka, a vytvořen tak „pavilon Centrálních laboratoř“, který 7 let řídila.

Paní primářka byla známa jako vynikající odborník, se skutečným zápalem pro obor lékařské mikrobiologie. Tento svůj nakažlivý entusiasmus dokázala přenést i na své okolí. Vždy jsme obdivovali její vytrvalost a maximální úsilí k nalezení odpovědi na otázky, které přináší laboratorní praxe ve vztahu ke konkrétní situaci, konkrétnímu pacientovi. Proto byla také vyhledávána kliniky, které uměla pozorně vyslechnout a následně jim fundovaně poradit. Zejména její zkušenosti s anti-

biotickou léčbou vycházely z dlouholeté konzultační praxe a hlubokých znalostí dané problematiky. Vždy prosazovala komplexní pohled na pacienta, tedy nejen ve vztahu k mikrobiologickým nálezům, ale i dalším laboratorním výsledkům a klinickému obrazu. Svou příkladnou profesionalitou, aktivní účastí na seminářích a kongresech se mimo jiné snažila zvýšit prestiž i popularitu oboru, ve kterém byla uznávanou autoritou. Nelze zapomenout ani na její inspirativní komentáře, které zaznívaly v diskusích a stávaly se často podnětem pro další zamyšlení.

Je ale třeba také dodat, že to nebyla jen mikrobiologie, kterou měla jako svého koníčka a poslání, ale byla to i její velká láska k umění, především hudbě.

Bude nám velmi chybět její smysl pro kolegiální, velká míra empatie a vstřícný, mnohdy až mateřský přístup k nám, jejím spolupracovníkům.

S paní primářkou Blankou Horovou odchází skutečná osobnost oboru mikrobiologie, osobnost mimořádně lidská.

MUDr. Elka Nyčová

a kolektiv Oddělení klinické mikrobiologie, FNB Praha

Po dohodě šéfredaktorů byl příspěvek otištěn i v časopise Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie.