

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Detekce meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* v  
materiálu mikrobiologické laboratoře Laboma České Budějovice**

Bakalářská práce

**6. 5. 2010**

**autor: Dominika Šůsová**

**Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář CSc.**

## **The Detection of Meticilin Resistant Strains of Staphylococcus Aureus in the Material Laboma Microbiology Laboratory in České Budějovice**

### **Abstract**

The subject of my thesis is the detection of meticilin resistant strains of staphylococcus aureus in the material of the Laboma Microbiology Laboratory in České Budějovice. This thesis is divided into a theoretical part and a practical part.

In the practical part, the methodology of the detection and the identification of the methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is specified in detail, as well as the exact procedures and the principles of the particular methods that were used. Further, there is the graphically and statistically processed data about the MRSA virus that was obtained in 2008 and 2009.

The aim of this thesis was to determine the incidence of MRSA in outpatients. The comparison of the incidence of MRSA in both sexes (that is a comparison of the individual months and comparison of the years 2008 and 2009). Furthermore, there was also the detection of resistance and sensitivity to the tested antibiotics and the identification of high-risk age groups.

The result was that MRSA occurs most in the age group of those who are between 76-90 years of age, as surveyed in both years. The greatest resistance has been observed in the use of oxacillin and the smallest amount of resistance has been observed in the use of Gentamicin. The largest number of positive isolates of MRSA were seen in February of 2008 and November of 2009.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Detekce meticilin resistantních kmenů *Staphylococcus aureus* v materiálu mikrobiologické laboratoře Laboma České Budějovice vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne .....

.....  
podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat MUDr. Radimu Kramářovi za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při vedení mé bakalářské práce. Dále pak laborantkám z Mikrobiologické laboratoře Laboma za jejich čas a ochotu.

## Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Současný stav.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1.1 Rod Staphylococcus .....</b>                                       | <b>8</b>  |
| 1.1.1 Metabolismus .....  | 8         |
| 1.1.2 Rezistence .....  | 9         |
| <b>1.2 Staphylococcus aureus .....</b>                                    | <b>9</b>  |
| 1.2.1 Mikroskopie .....   | 9         |
| 1.2.2 Antigenní stavba .....  | 9         |
| 1.2.3 Genetika .....  | 10        |
| 1.2.4 Kultivace .....   | 10        |
| 1.2.5 Odolnost.....   | 10        |
| 1.2.6 Faktory virulence.....  | 10        |
| 1.2.7 Patogenita .....  | 11        |
| 1.2.8 Patogeneze .....  | 12        |
| 1.2.9 Epidemiologie .....   | 12        |
| 1.2.10 Onemocnění způsobená S.aureem.....                                 | 13        |
| 1.2.11 Laboratorní diagnostika.....                                       | 15        |
| 1.2.12 Terapie .....  | 16        |
| <b>1.3 Antimikrobiální látky .....</b>                                    | <b>17</b> |
| 1.3.1 Dělení antimikrobiálních látek .....                                | 17        |
| 1.3.2 Antibakteriální antibiotika a chemoterapeutika.....                 | 17        |
| <b>1.4 Nosokomiální nákazy .....</b>                                      | <b>21</b> |
| 1.4.1 Dělení nosokomiálních nákaz podle původu vyvolávajícího agens...21  |           |
| 1.4.2 Dělení nosokomiálních nákaz podle epidemiologického hlediska.....21 |           |
| 1.4.3 Zdroje nosokomiálních nákaz.....22                                  |           |
| 1.4.4 Cesty přenosu původců nosokomiálních nákaz.....22                   |           |
| 1.4.5 Nosičství MRSA.....23   |           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2. Cíl práce a hypotézy</b> .....                  | <b>24</b> |
| <b>2.1 Cíl práce</b> .....                            | <b>24</b> |
| <b>2.2 Hypotézy</b> .....                             | <b>24</b> |
| <b>3. Metodika</b> .....                              | <b>25</b> |
| <b>3.1 Transport klinického materiálu</b> .....       | <b>25</b> |
| <b>3.2 Kultivační půdy</b> .....                      | <b>25</b> |
| <b>3.3 Mikroskopie</b> .....                          | <b>25</b> |
| <b>3.4 Vyhledávací testy</b> .....                    | <b>26</b> |
| <b>3.5 Kvalitativní latexová aglutinace</b> .....     | <b>27</b> |
| <b>3.6 Stanovení citlivosti diskovou difúzí</b> ..... | <b>28</b> |
| <b>3.6.1 Mueller Hingon agar (MHA)</b> .....          | <b>28</b> |
| <b>3.6.2 Disky</b> .....                              | <b>28</b> |
| <b>4. Vlastní výzkum</b> .....                        | <b>30</b> |
| <b>4.1. Charakteristika sledovaného souboru</b> ..... | <b>30</b> |
| <b>4.2. Grafické znázornění</b> .....                 | <b>30</b> |
| <b>5. Diskuze</b> .....                               | <b>39</b> |
| <b>6. Závěr</b> .....                                 | <b>41</b> |
| <b>7. Seznam použitých zdrojů</b> .....               | <b>43</b> |
| <b>8. Klíčová slova</b> .....                         | <b>45</b> |
| <b>9. Přílohy</b> .....                               | <b>46</b> |

## Úvod

Jedním z hlavních důvodů, proč jsem si vybrala toto téma, je neustále se zvyšující výskyt rezistentních kmenů *Staphylococca aurea*.

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je bakterie, která je častou příčinou infekcí získaných v nemocničních zařízeních (7). Tyto nákazy představují velký problém vzhledem k pooperačním komplikacím a prodloužené léčbě (5).

Přibližně 25% až 30% populace je kolonizováno *S.aureem* a z toho 0,2% až 7% MRSA. Navíc se ukázalo, že může kolonizovat členy rodiny, co sdílejí jednu domácnost (tzn.přežívá v ručnicích a domácích potřebách)( 8).

Pro zdravé jedince nepředstavuje *S.aureus* žádnou hrozbu,ovšem pro pacienty zdravotnických zařízení, kteří jsou oslabeni z důvodu jiného onemocnění nebo operativního výkonu, představuje značnou zátěž, prodloužení pooperačního léčení a zároveň i zvýšení nákladů na léčbu(13).

Cílem mé práce je zjistit frekvenci výskytu MRSA u ambulantních pacientů. Porovnat frekvenci výskytu MRSA u obou pohlaví, porovnat výskyt za jednotlivé měsíce a porovnat výskyt za roky 2008 a 2009. Dále zjištění rezistence a citlivosti na testovaná antibiotika a vytipování rizikových věkových skupin.

## 1. Současný stav

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) se objevil v roce 1960 a během dalších 40 let byl problém omezen převážně na zdravotní péči. V 1990 se objevily první americké zprávy o tak-zvané komunitě-spojené MRSA (CA-MRSA). CA-MRSA infekce byly definovány jako infekce MRSA vyskytující se u pacientů, kteří neměli žádné zjištěné rizikové faktory např. zdravé děti a mladí dospělí. CA-MRSA je spojena s novým genetickým profilem a fenotypem, je pozoruhodně fit a může šířit v komunitách, je jedovatý. CA-MRSA infekce zahrnují především kůži a měkké tkáně, ale byly popsány i nekrotizující pneumonie a nekrotizující fasciitidu . V současné době nahrazuje CA-MRSA v nemocnici-získané MRSA kmeny (HA-MRSA), které mohou mít až katastrofální důsledky (1). Frekvence obou komunitě-získaných a nemocnice-získaných stafylokokových infekcí neustále rostou, s malou změnou v celkové úmrtnosti (3). CA-MRSA se rychle šíří a je vysoce virulentní (1). Výskyt meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) se zvýšil po celém světě (16) a je příčinou sepse u pacientů s cirhózou a pacientů po transplantaci jater (16).

### 1.1 Rod *Staphylococcus*

Do rodu *Staphylococcus* zatím řadíme kolem 50ti druhů a poddruhů. Vzhledem k významnosti v humánní medicíně mají největší význam *Staphylococcus aureus* (kataláza-pozitivní druh) a *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus saprophyticus* (kataláza-negativní druh) (2).

Stafylokoky jsou nepohyblivé, grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní mikroorganismy (4) o průměr 1um (13). Uspořádané jednotlivě, v párech, v tetrádách a v nepravidelných shlucích ve tvaru hrozu (13).

#### 1.1.1 Metabolismus

Stafylokoky mají fermentační (anaerobní) i respirační (aerobní) typ metabolismu. S výjimkou *S.saccharolytica*, produkují katalázu (2,13).



### **1.1.2 Rezistence**

Stafylokoky jsou značně rezistentní k nepříznivým vlivům. Odolávají zahřátí na 55°C až 30 minut, vyšším koncentracím NaCl a vysychání (např. v zaschlém hnisu). Tato schopnost zřejmě umožňuje přechodně i rezistentně osídlení kůže. Jejich tolerance k 10% NaCl se využívá pro selektivní izolaci stafylokoků ze silně kontaminovaného materiálu (potravin, výkaly, sliznice a povrch těla zvířat). Pomnožuje se i na půdách, které obsahují až 40% žluči (2,13).

## **1.2. Staphylococcus aureus**

Přibližně u třetin lidí žije ve vztahu podobném komensalismu a nevyvolává žádné potíže. Stačí však sebemenší porucha přirozené odolnosti a projeví se jako patogen. Vyvolává od banálních kožních infekcí až po vážné záněty vnitřních orgánů až smrtelně probíhající sepse. Kromě hnisavých (pyogenních) infekcí dovede *S.aureus* vyvolat i otravy z potravin (2,13).

### **1.2.1 Mikroskopie**

Mikroskopicky neodlišíme *S.aureus* od ostatních stafylokoků. V preparátech u něj častěji vidíme gramlabilní koky (2).

### **1.2.2 Antigenní stavba**

Buněčná stěna stafylokoků obsahuje peptidoglykan, kyselinu teichoovou a protein A. Peptidoglykan (murein) má podobné účinky jako endotoxin. Jeho působením dochází k uvolnění cytokinů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček. Hlavním antigenem je však skupinově specifický polysacharid A, který se skládá z podjednotek kyseliny teichoové. Kyselina teichoová se váže na sliznicích a ránách na fibronektin.

Hlavní bílkovinná součást buněčné stěny a společný antigen většiny kmenů je protein A. Je schopen nespecificky reagovat s Fc-fragmentem imunoglobulinů, tím chrání stafylokoka před opsonizací protilátkami (2,13).

### **1.2.3 Genetika**

Pro *Staphylococca aurea* je typický přenos genů mezi kmeny transdukcí. Na plasmidech jsou umístěny geny pro rezistenci na antibiotika (13).

### **1.2.4 Kultivace**

Stafylokoky rostou dobře na běžně používaných půdách, a to v širokém rozmezí teplot (7-46°C) i pH(4,2-9,3). Pro jejich dobrou izolaci se nejlépe hodí krevní agar s 5% ovčích erytrocytů a obyčejný nebo thioglykolátový bujón. Selektivní půdy (např. krevní agar s 10% NaCl) se používají pro záchyt z kontaminovaných vzorků. Na neselektivních půdách jsou kolonie *S.aureus* za 24 hod velké 1-3 mm. Kolonie jsou neprůhledné s hladkým povrchem a rovnými okraji, krémové konzistence a pigmentované. Pigment je nejčastěji krémový, smetanový, žlutozlatý až naoranžovělý. Kolem kolonie bývá různý stupeň beta-hemolýzy (13).

### **1.2.5 Odolnost**

Stafylokoky jsou poměrně rezistentní k zevnímu prostředí. Odolají vyschnutí (hlavně v hnisu), zahřátí na teploty kolem 60°C. Z dezinfekčních přípravků jsou odolné vůči fenolům a sloučeninám rtuti.

V selektivních půdách odolávají přítomnosti lithia, glycinu a telluričitanu. Jsou citlivější na nenasycené mastné kyseliny a bazická barviva (2,13).

### **1.2.6 Faktory virulence**

Dělíme je na povrchové a extracelulární. Z povrchových faktorů je to především peptidoglykan, protein A a pouzdro, dále vázaná koaguláza (clumping factor), který váže fibrinogen a mění ho na fibrin, což způsobuje shlukování stafylokoků.

Extracelulární faktory lze dělit na enzymy a toxiny. Mezi enzymy patří koagulasa, katalasa, hyaluronidasa, lipasy, nukleasy, fibrinolysin a penicilinas. K toxinům patří cytolyziny (hemolyziny), enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliativní toxiny.

*Kagulasa* (zvaná volná) reaguje s plasmatickým faktorem za vzniku stafylothrombinu (katalyzuje změnu fibrinogenu na fibrin). Tvorba fibrinu je příčinou, proč stafylokokové infekce probíhají většinou ohraničeně (např. absces).

*Hyaluronidasa* štěpí kyselinu hyaluronovou a usnadňuje šíření stafylokoků do tkání. *Nukleasy* mají schopnost napadat jádra leukocytů. *Fibrinolyzin* (stafylokinasa) rozpouští fibrinové sraženiny. *Penicilinasa* (beta-laktamasa) rozkládá čtyřčlenný beta-laktamový kruh a inaktivuje beta-laktamová antibiotika.

*Cytolyziny* poškozují povrchovou membránu buněk. Mezi ně patří čtyři hemolyziny a leukocidin. *Alfa-hemolyzin* (alfa-toxin) vytváří většina kmenů *S.aurea*. Na krevním agaru z ovčích erytrocytů vyvolává téměř úplnou beta-hemolýzu.

*Pantonův-Valentinův leukocidin* je složen ze dvou složek. Tvoří v membráně neutrofilů a makrofágů póry, což způsobuje lýzu buňky. Má ochrannou funkci před účinkem leukocytů a uplatňuje se při vážných infekcích kůže.

Stafylokokové *enterotoxiny* (A-E,G-R) jsou prokazatelné přibližně u poloviny kmenů. Jsou vysoce termostabilní, odolají půl hodině varu a účinkům trávicích enzymů. Způsobují průjem a zvracení. Nejčastěji se vyskytuje enterotoxin A. Enterotoxin B nalezneme u nemocničních kmenů a je původcem pseudomembranósní enterokolitidy po léčbě antibiotiky. Některé kmeny produkující enterotoxiny mohou způsobit syndrom toxického šoku.

*Toxin syndromu toxického šoku 1* (TSST-1) je superantigen. Již v malém množství zvýší permeabilitu endothelií. Je zodpovědný za příznaky a multiorgánové selhání při syndromu toxického šoku.

*Exfoliatiny* (epidermolytické toxiny) jsou doposud známé čtyři, nejčastěji se projevují ET-A a ET-B. Mají proteolytický účinek a rozpouštějí polysacharidovou matrix v epidermis, to má za následek tzv. stafylokokový syndrom opařené kůže (SSSS). Pokud se jedná o mírnější formu, projevuje se puchýři (2,13).

### **1.2.7 Patogenita**

Patogenita je schopnost mikrobiálního druhu vyvolat onemocnění (lekařský slovník). Přibližně třetina lidí jsou nosiči bez zjevných příznaků. *S.aureus* nejčastěji

nalezneme v nozdřách, v axilách, na vulvě a na hrázi. Nejčastějšími stafylokokovými infekcemi jsou hnisavá (purulentní, suppurativní) onemocnění kůže a jejích adnex, tedy pyodermie. Zlatý stafylokok je nejčastějším původcem hnisání ran, ať se jedná o běžná povrchová zranění, popáleniny, nebo operační rány. V čisté ráně není schopen vyvolat infekci, ke vzniku infekce je třeba, aby v ráně zůstalo cizí těleso, tříska, špína, stehy. Infikovaná rána bývá pro stafylokoky častou vstupní branou, odkud se dostávají do oblastí mízních uzlin, které se zanítí. Z nich do krevního oběhu. Dochází k bakteriémii, která může vést až k sepsi. Původní infekční ložisko u stafylokokových sepsí často nebývá prokázáno, většinou se totiž jedná o neškodnou ranku na kůži. Krví se *S. aureus* může zanést do vnitřních orgánů, kde může dojít ke vzniku abscesů (2,13).

### **1.2.8 Patogeneze**

Onemocnění, která vyvolává *S. aureus* jsou hnisavá, popřípadě celkové toxické případy nebo otravy z potravin. Ke vzniku stafylokokových infekcí přispívá poranění (operační rány, popáleniny), cizí tělesa (implantované pomůcky, stehy), virové infekce, diabetes mellitus, malignity a imunodeficience. Nejčastěji se vyskytují jen benigní kožní infekce, ale mohou způsobit až sepsi.

Charakteristické pro stafylokoky je tvorba ohraničených zánětlivých ložisek (abscesů). Absces je dutina plná hnisu, která vzniká zánětem. Hnis je tvořen rozpadenými leukocyty a bakteriemi. Hnis stafylokoků je smetanově žlutý a nepáchne. Okolní tkáň abscesu je zanícená (tzn. calor, dolor, tumor a functio laesa). Vzácně se stafylokoková infekce šíří ve formě flegmóny (neohraničený zánět) (13).

Zhnisaná rána se hojí *per secundam* („napodruhé“) (11). Infikovanou ránou se stafylokok dostane do místních uzlin, kde se zanítí (lymphadenitis) a odtud do krevního oběhu.

Přítomnost bakterií v krvi se nazývá bakteriémie a může vést až k sepsi (11).

### **1.2.9 Epidemiologie**

*S. aureus* kolonizuje člověka od jeho narození, nejvíce na kůži rukou, perineu, kšticí, sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Při rutinních vyšetřeniích lze stafylokoka

prokázat v horních cestách dýchacích u 20 až 50% osob. Asi třetina patří k trvalým nosičům a zbývající dvě třetiny k nosičům občasným. Pokud bychom využili speciální odběrové techniky, selektivních půd a opakovaných odběrů z různých částí těla, stoupla by záchytnost až k 100%.

Nosičství stafylokoků zdravý organismus nepoškozuje, ale naopak působí jako imunitní stimulus, který vede k poměrně dobré odolnosti vůči infekci. K onemocnění dojde pouze po oslabení organismu jedince a při porušení integrity kůže a sliznic.

Zdrojem infekce je člověk, zdravý nosič nebo nemocný s otevřenou zánětlivou lézí. Přenos se děje vzdušnou cestou, přímým stykem i nepřímo. Možná je také endogenní infekce vlastním kmenem. Zvířata jsou zdrojem jen vyjímečně.

Zvláštní nebezpečí představují infekce získané v nemocnicích. Vyvolávají je endemické kmeny s širokou multirezistencí k antibiotikům. Mohou způsobovat až lokální epidemie např. na novorozeneckém oddělení nebo jednotkách intenzivní péče. Zdrojem těchto nozokomiálních infekcí je personál, prostředí (oděv, lůžkoviny, prach) a rovněž jím mohou být dlouhodobě hospitalizovaní pacienti (13).

#### **1.2.10 Onemocnění způsobená *S.aureum***

*Pyodermie* je nejčastější stafylokokové onemocnění kůže. Z pyodermií je nejčastější impetigo, folikulitida a furunkl. *Impetigo* se typicky vyskytuje u malých dětí. Jsou to puchýře uložené jen povrchově plné žlutého hnisu, pokrývající se žlutou krustou (13).

*Folliculitis* je hnisavá infekce vlasového míšku. Projevuje se jako červené papulopustula v okolí ochlupení.

*Furunculus* je kožní absces, který vzniká rozšířením foliklu (13). Zvláště nebezpečné jsou furunkly v oblasti nosu a horního rtu (2). Infekce se může šířit oftalmickými venózními cestami do intrakraniálních splavů. To vede ke vzniku tromboflebitidy splavů, která může vést až k hnisavé meningitidě (2).

*Carbunculus* je hnisavé ložisko, které vzniká splnutím více furunklů (bednář). Častá lokalizace je na zadní části krku, dále ramena, stehna či boky. Postihuje zejména starší muže, diabetiky či oslabené osoby (11).

*Panaricium* je zánět měkkých tkání prstů. Stafylokoky napadají nehtová lůžka a pronikají drobnými oděrkami kůže. Hnisavý a nekrotizující zánět kůže může napadat i šlachy, klouby a kosti a bez včasné léčby může pokračovat až na předloktí.

*Puerperální mastitida* je infekce postihující mléčnou žlázu kojící ženy v prvních týdnech laktace (lékařský slovník). Stafylokoky pronikají ragádami prsních bradavek a způsobují ložiskový nebo difúzní zánětlivé změny. Zánět je způsoben většinou nozokomiálními kmeny, které kolonizují po porodu kůži a sliznice novorozence, který pak přenáší infekci při kojení na matku (2,13).

*Osteomyelitidu* vyvolává z 90% *S.aureus*. Vzniká buď jako ranná infekce nebo jako sekundární rozsev hematogenní cestou. Nejčastěji napadá metafysy dlouhých kostí. Objevuje se prudká bolestivost v místě infekce, vysoká teplota a otok měkkých tkání. Nekrotickým rozpadem měkkých tkání, může vzniknout píštěl, kterou vytéká hnis.

*Pneumonie* způsobená stafylokoky je převážně sekundární pneumonie. Postihuje předem poškozené dýchací cesty např.virovou infekcí, mukoviscidózou, aspirací zvratků nebo dlouhodobou intubací (2,13).

Stafylokokové primární *pneumonie* jsou méně časté, postihují jedince s oslabenou imunitou nebo vrozenou imunodeficiencí, nejmenší kojence a staré lidi. Onemocnění mívá často náhlý začátek s vysokou teplotou provázenou třesavkou, silnou schváceností, poruchami vědomí, tachypnoí, cyanózou, tachykardií, hypotenzí a vznikem abscesů v postižené plicní tkáni. Rychle se rozvíjí septický syndrom a šok (2).

Velice nebezpečná je stafylokoková *endokarditida*, při níž narůstá na srdečním svalu tzv.vegetace (skládá se ze stafylokoků a mezibuněčné hmoty). Je to zvláštní typ biofilmu, z něhož se uvolňují stafylokoky jako septické vmetky (emboly) se roznášejí po těle a vyvolávají metastatické abscesy v kůži, v ledvinách, plicích a mozku (13).

*Pseudomembranózní enterokolitida* vzniká po potlačení přirozené mikroflóry střev při léčbě širokospektrými antibiotiky,vůči kterým je kmen *S.aureus* rezistentní. Jedná se o endogenní infekci. Masivně pomnožené stafylokoky produkují enzymy a toxické látky poškozující střevní sliznici. Těžké katarální změny jsou kryté žlutošedými pablánami. Po jejich odloučení se objevují četné eroze a nekrotické vředy mezi zbytky překrvené sliznice. Příznaky onemocnění se objevují 3 až 9 dnů po zahájení

antibioterapie. Prvním symptomem zpravidla bývá průjem. Stolice bývá kašovitá, přirozené barvy, později bývá vodnatá s příměsí hlenu. V nejtěžších případech najdeme ve stolici i krev, popřípadě odloučené části střevní sliznice (pablány). Jako životohrožující komplikace se může vyvinout paralytický ileus s mohutným rozpětím střeva (toxické megakolon) a následnou jeho perforací (2).

### **1.2.11 Laboratorní diagnostika**

K vyšetření se posílá serózní nebo hnisavý exsudát, výtěr z nosu, faryngu nebo tonzil, sputum, moč, stolice, likvor a krev.

*S.aureus* se vyšetřuje mikroskopicky jako barvený preparát podle Grama (2). Mikroskopický obraz stafylokokového hnisu je typický, obsahuje grampozitivní koky ve shlucích a četné leukocyty.

K izolaci stafylokoků se nejlépe hodí krevní agar a obyčejný nebo thioglykolátový bujón. Pro záchyt kontaminovaných vzorků se používají selektivní půdy, např. krevní agar s 10% NaCl. Všechny selektivní půdy potlačují nejen gramnegativní flóru, ale do jisté míry i stafylokoky, proto ji odečítáme až po 48-72 hodinách (13).

Na neselektivních půdách jsou kolonie *S.aureus* velké 1 až 3 mm za 24 hodin. Kolonie jsou typicky neprůhledné s hladkým povrchem a rovnými okraji, krémové konzistence, vždy pigmentované. Pigment kolonií *S.aureus* jsou někdy téměř bílé, většinou je však smetanový, krémový, zlatožlutý až naoranžovělý.

*S.aureus* se dále určuje na základě koagulázového testu. Při screeningu podezřelých kolonií se používá průkaz vázané koagulázy (tzv. clumping-faktor). Z kolonie se připraví hustá suspenze na sklíčku v kapce destilované vody a přidá se kapka králičí nebo prasečí plazmy. Dojdeli do deseti sekund k aglutinaci, považuje se test za pozitivní na stafylokoka. V případě negativního výsledku je nutné provést koagulázový test zkumavkovou metodou.

V současnosti se většinou používají diagnostika, která kromě clumping-faktoru detekují i přítomnost proteinu A a kapsulárních polysacharidů. Většinou jsou založeny na latexové aglutinaci, bývají citlivější a specifitější než běžný sklíčkový či zkumavkový

test a vzhledem k jejich takřka okamžitému výsledku a jednoduchosti nahradily starší biochemické testy na průkaz *S.aureus* (13).

### **1.2.12 Terapie**

Povrchové hnisavé infekce se hojí spontánně nebo po uvolnění hnisu jednoduchým chirurgickým zákrokem. Hluboká ložiska a generalizované infekce vyžadují vždy chirurgické ošetření a antibioterapii (2). 90% kmenů *S.aurea* je v dnešní době na penicilin rezistentní, protože mají schopnost tvořit penicilinázu, tzn. beta-laktamázu, která specificky štěpí molekuly penicilinu (13). Tento problém řeší semisyntetické penicilináza rezistentní peniciliny (oxacilin, methicilin, kloxacilin, flukloxacilin). V klinickém materiálu se však mohou vyskytovat i kmeny rezistentní k penicilináza-rezistentním penicilínům (MRSA, z angl. *Methicillin-resistant S.aureus*). Jejich frekvence mezi kmeny *S.aurea* je 5-15% (2). Ve světě tvoří až polovinu nemocničních kmenů *S.aureus*. Podstatou rezistence na oxacilin či methicilin je nejčastěji přítomnost genu *mecA*, jenž kóduje pozměněný druh penicilin vázajícího proteinu PBP2a (transpeptidasy účastnící se výstavby buněčné stěny). Peniciliny inhibují jejich účinek a v důsledku toho se mikroby rozpadají. Modifikovaná PBP2 si zachovává svou schopnost, ale s peniciliny se neváže (13).

MRSA kmeny jsou od počátku rezistentní na všechny beta-laktamová antibiotika, včetně jejich kombinací s inhibitory beta-laktamas (cefalosporiny). Gen *mecA* se nemusí exprimovat, proto standardní diskový test citlivosti nemusí rezistenci na oxacilin odhalit. Tento druh reakce se vyskytuje zejména u tzv. heterorezistentních kmenů, které někdy obsahují extrémně nízký počet rezistentních buněk. K úplnému průkazu rezistence je potom nutné prokázat přítomnost genu *mecA* pomocí PCR nebo přítomnost jeho produktu (PBP2a) latexovou aglutinací (13).

MRSA je obvykle rezistentní na další řady antibiotik, především makrolidy, aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikol, fluorochinolony, rifampicin. Na vankomycin vykazují tyto kmeny rezistenci jen částečnou. Tyto kmeny se nazývají VISA (z angl. *Vancomycin-intermediate-resistant S.aureus*). Podstata této rezistence není dosud známa, je prokázáno pouze to, že produkují silnou vrstvu peptidoglykanu. V roce 2002 se



objevili kmeny vysoce rezistentní k vankomycinu, tzv.VRSA (z angl. *Vancomycin-resistant S.aureus*). Jejich úplná rezistence ke glykopeptidům souvisí s přítomností genu *vanA* získaného pravděpodobně od enterokoků (13).

### **1.3 Antimikrobiální látky**

#### **1.3.1 Dělení antimikrobiálních látek**

Antimikrobiální látky dělíme na antibakteriální, antivirotické, antimykotické antiparazitární. Třídění uvnitř těchto skupin je podle chemické struktury, které odpovídá řada společných vlastností, např. mechanismus působení, rezistence...

Antibakteriální látky se dělí na beta-laktamy (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy), tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, amfenikoly, polypeptidy a glykopeptidy, ansamyciny, sulfonamidy a pyrimidiny, nitroimidazoly a nitrofurany, chinony a ostatní chemoterapeutika (15).

#### **1.3.2 Antibakteriální antibiotika a chemoterapeutika**

##### **Beta-laktamy**

Beta-laktamová antibiotika obsahují tzv.beta-laktamový kruh. Beta-laktamový kruh se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu kyslíku. V bakteriální buňce se beta-laktamy vážou na enzymy (transpeptidasy, karboxypeptidasy atd.) účastnící se tvorby peptidoglykanu. Tyto enzymy katalyzují tvorbu peptidových a glycinových můstků. Můžeme je též označit PBP (z angl. Penicillin-binding proteins,protein vázající penicilin). Vazba beta-laktamu na PBP zastaví tvorbu peptidoglykanu v bakterii a zároveň aktivuje uvolňování autolytických enzymů, čím dojde k poškození bakteriální stěny. Výsledkem je rozpad bakteriální buňky (15).

Nejčastější příčinou rezistence na beta-laktamy je schopnost bakterií tvořit beta-laktamasy. Tyto enzymy rozpustí beta-laktamový kruh, čím antibiotiku ztratí svou antimikrobiální schopnost (15).

Rezistence na beta-laktamy vzniká trojím způsobem. Gramnegativní bakterie (hlavně pseudomonády) získají schopnost blokovat průnik beta-laktamů přes póry zevní

membrány. U pneumokoků vznikají pozměněné PBP, které si zachovají svou enzymatickou schopnost a nereagují s penicilinem. Stafylokoky získaly rezistenci díky přijetí genu *mecA*, který má schopnost kódovat změněný enzym PBP 2a, který má nízkou afinitu k beta-laktamům, a proto účinkuje i v jejich přítomnosti. Tento gen je přítomen ve všech buňkách rezistentní populace, ale přepisuje se jen v některých. Tato tzv. heterogenní rezistence se obtížně prokazuje v laboratoři (15).

Toxicita beta-laktamů je zanedbatelná, ale vedlejší účinky jsou časté. Jedná se hlavně o alergické reakce vzhledu kopřivky. Může dokonce docházet až k anafylaktickému šoku (15).

Beta laktamy se dále dělí na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy (15).

#### *Tetracykliny*

Jejich název pochází od čtyř šestičlenných kondenzovaných cyklů. Jednotlivé tetracykliny se od sebe liší hlavně svými farmakologickými vlastnostmi (15).

Podkladem účinkem je inhibice proteosyntézy. Takto by tetracykliny mohly působit i v buňkách eukaryotních. Jejich selektivní toxicita je dána tím, že buňky bakterií je přijímají mnohem snadněji než buňky lidské. Výsledný účinek tetracyklínů je bakteriostatický. Mají velmi široké spektrum účinku. Působí i na mykoplazmata, chlamydie, rickettsie, spirochety, aktinomycety a některé prvoky (toxoplazmata, plasmodia) (15).

Řada běžných bakterií je však dnes již na tetracykliny rezistentní. Tato rezistence je zkřížená mezi jednotlivými tetracykliny. Jejím podkladem je změnění propustnosti zevní membrány, ochrana ribosomů zvláštními proteiny, nejčastěji však aktivní vyčerpávání antibiotika z buňky. Za častý výskyt rezistence je z části odpovědné jejich časté užívání v medicíně a z části jejich využívání jako stimulatorů růstu jatečných zvířat (15).

Vedlejší účinky tetracyklínů jsou časté a projevují se hlavně v gastrointestinálním traktu. Nausea je dána přímým účinkem na sliznici, zatímco průjem spíše poruchou normální mikroflóry přemnožením rezistentních stafylokoků. Protože tetracykliny

nepříznivě ovlivňují tvorbu kostí a působí žluté zbarvení zubů, jsou kontraindikovány u těhotných a dětí do 8let (15).

### *Aminoglykosidy*

Základem molekuly těchto antibiotik je aminocyklitolový kruh k němuž jsou glykosidickou vazbou připojeny další dva aminocukry (15).

Aminoglykosidy působí na ribosomech v samém začátku bakteriální proteosyntézy, a tak brání vzniku iniciačních komplexů, od nichž se rozvíjí syntéza bílkovin. Výsledný účinek je baktericidní (15).

Aminoglykosidy byly původně izolovány z vláknitých grampozitivních půdních bakterií označovaných jako aktinomycety. Jejich antibakteriální spektrum zasahuje především aerobní gramnegativní bakterie, ale působí i na stafylokoky (15).

Aminoglykosidy se prakticky vůbec nevstřebávají ze střeva, musejí se proto podávat parenterálně. Z těla se vylučují jen močí, proto při těžkých poruchách ledvin se jejich množství musí redukovat (15).

Mezi nežádoucí účinky patří hlavně nefrotoxicita, ototoxicita vedoucí až k hluchotě a neurotoxicita (15).

Přirozená rezistence je dána zhoršeným průnikem aminoglykosidů do buňky. Získaná rezistence spočívá ve tvorbě enzymů, které inaktivují jejich účinek.

Z aminoglykosidů se nejčastěji používá gentamicin, který má výrazný ototoxický účinek. Gentamicin působí na většinu gramnegativních tyčinek a na různé druhy stafylokoků včetně některých kmenů rezistentních na oxacilin (15).

### *Linkosamidy*

Linkosamidy (Neloren aj.) získaly svůj název od produkčního kmene *Streptomyces lincolmensis*. Jsou odvozeny od aminokyseliny prolinu. Váže se na ribosomy, inhibuje peptidyltransferasu a brání tak vzniku peptidické vazby a prodlužování molekuly proteinu. Působí bakteriostaticky (15).

Linkomycin zastavuje množení grampozitivních bakterií včetně penicilin-rezistentních stafylokoků (15).

Toxicita linkomycinu je velmi nízká. Podává se perorálně i parenterálně. K nežádoucím účinkům patří reakce v místě aplikace, průjem, zvýšení jaterních testů a

především závažná pseudomembranózní kolitida vyvolaná toxinem *Clostridium difficile*, které se ve střevě přemnoží, protože je rezistentní na linkosamidy. Tato komplikace se dostavuje i po léčbě jinými antibiotiky, např. cefalosporiny nebo ampiciliem (15).

Linkomycin dobře proniká do polymorfonukleárů a makrofágů a především do kostní tkáně, a proto je velmi cenný pro léčbu stafylokokové osteomyelitidy (15).

#### *Glykopeptidová antibiotika*

Chemicky jsou to heptapeptidy s navázanou cukernou složkou. Zasahují do syntézy bakteriální stěny. Glykopeptidy působí baktericidně (15).

Klasickým glykopeptidem je vancomycin (Edicin, Vancocin aj.). Jeho spektrum je omezeno jen na některé grampozitivní mikroorganismy a na spirochety. Důležité je, že vancomycin působí i na jinak rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*. Nedávno byla objevená rezistence na vankomycin i u stafyloků (15).

Toxicita je značná. Vankomycin postihuje ucho, ledviny a CNS (15).

#### *Sulfonamidy a pyrimidiny*

Na základě svého účinku je řadíme mezi antimetabolity. Mají podobnou stavbu jako kyselina p-aminobenzoová (PABA).

Spektrum sulfonamidů zasahuje z grampozitivních mikrobů streptokoky, stafylokoky, klostridia. Jejich účinek je bakteriostatický.

Nežádoucí účinky sulfonamidů jsou časté, ale jen vyjíměč jsou závažné. Rezistence vzniká snadno, přenáší se plasmidy.

Samotné sulfonamidy se dnes již nepodávají, ale jejich kombinace s trimethoprimem se používá hojně. Trimethoprim se běžně podává v kombinaci se sulfonamidem sulfamethoxazolem jako co-trimoxazol (Biseptol, Primotren aj.). Výhodou této kombinace je malá pravděpodobnost vzniku rezistence a také jejich synergický účinek. Zatímco každá z obou složek je pouze bakteriostatická, dohromady působí baktericidně. Co-trimoxazol se může podávat jak perorálně, tak i intravenósní infusí.

Z nežádoucích účinků se mohou vyskytnout problémy gastrointestinální (nausea a zvracení), kožní (alergické reakce, fototoxicita, Stevensův-Johnsův syndrom) a poruchy krvetvorby (15).

#### **1.4 Nosokomiální nákazy**

Mezi nosokomiální nákazy můžeme zařadit infekce, které pacient získá při hospitalizaci ve zdravotnickém zařízení v časovém rozmezí 48-72 hodin od přijetí. Na vzniku nosokomiálních nákaz se rovněž podílí oslabení pacientovy imunity nemocí a léčebné zásahy. Ke klinickým projevům nosokomiální infekce může dojít již během hospitalizace infikované osoby. Ve většině případů se však klinické příznaky nemoci projeví až po propuštění pacienta do domácího léčení nebo po přeložení do jiného zdravotnického zařízení (12,14).

##### **1.4.1. Dělení nosokomiálních nákaz podle původu vyvolávajícího agens**

*Exogenní nemocniční nákazy:* příčina infekce byla na a do organismu zanesena zvenčí (ruce personálu, převaz rány, kontaminované přístroje či nástroje při invazivním vyšetření atd.) Zdrojem exogenních nemocničních infekcí, je zpravidla zdravotnický personál. Často jsou ze strany personálu podceňovány relativně banální onemocnění (rhinitidy, lehká průjmová onemocnění apod.) a hlavně základní hygienické zásady (špatná či vůbec žádná hygiena rukou mezi jednotlivými pacienty) (14).

*Endogenní nemocniční nákazy:* jedná se o infekce způsobené některou ze složek přirozené mikroflóry pacienta, zanesenou z místa přirozeného výskytu na jiné místo organismu (operační rána, tkáň aj.) zpravidla v průběhu operačního výkonu nebo v průběhu invazivního diagnostického či terapeutického zákroku (14).

##### **1.4.2. Dělení nosokomiálních nákaz podle epidemiologického hlediska**

*Nespecifické nákazy,* které probíhají v nemocnicích, ale mohou se šířit i v dalších kolektivech určité lokality (základní školy, denní stacionáře apod.). Příkladem můžeme uvést alimentární infekce. Nespecifické infekce bývají ukazatelem hygienicko-epidemiologické úrovně určitého zdravotnického zařízení (10,14).

*Specifické nákazy* vznikají následkem diagnostického nebo terapeutického výkonu u hospitalizovaných osob. Nejčastější přenos bývá inokulace nebo implantace agens přímo do tkáně, rány, močového ústrojí atd. Méně obvyklé bývá šíření infekce kapénkami

nebo alimentární cestou. Výskyt ovlivňuje kvalita asepse, sterilizace a dezinfekce, protiepidemický režim, ošetrovatelské standardy (10,14).

#### **1.4.3. Zdroje nosokomiálních nákaz**

##### *Pacient*

Může být zdrojem specifické i nespecifické, exogenní i endogenní nosokomiální infekce. Příčinou může být chybná diagnóza (záměna onemocnění) infekční nemoc v inkubační době, nosičství patogenních mikroorganismů. Pacient bývá obvykle kolonizován nemocničním rezistentním kmenem MRSA. Jedná se tedy o endogenní infekci. Příkladem může být přenos MRSA z dutiny nosní do operační rány. Obzvláště nebezpečné je zanesení MRSA u pacientů s operacemi skeletu (10).

##### *Zdravotnický personál*

Přenos z personálu na pacienta se děje přímou i nepřímou cestou. Největší roli hraje zdravotník v přenosu nemocničních mikroorganismů. Účastní se tak procesu šíření nákazy, a to hlavně prostřednictvím znečištěných, nedostatečně, nebo nesprávně umytých rukou (10).

##### *Návštěvník*

Předpisy pro četnost a dobu návštěv u pacientů se v posledních letech značně uvolnily, a tím se zvyšuje možnost zavlečení infekčního onemocnění do nemocničních zařízení (10).

#### **1.4.4. Cesty přenosu původců nosokomiálních nákaz**

*Přímý přenos* vyžaduje současnou přítomnost zdroje infekce a vnímavého jedince. Uskutečňuje se kontaktem (dotek, polibek, pohlavní styk). Příkladem tohoto přenosu je již zmiňovaný kontakt zprostředkovaný rukama zdravotnického personálu (14).

*Nepřímý přenos* se většinou děje kontaminovanými diagnostickými a léčebnými pomůckami, nástroji nebo obvazovým materiálem. Další možností jsou kontaminované předměty denní potřeby, infikované biologické roztoky a léky (krev, plazma, infúzní roztoky, masti, atd.), kontaminovaný vzduch (ventilátory, inhalační přístroje), potraviny (sušené mléko, koření) a biologické vektory (členovci) (9,14).

#### ***1.4.5. Nosičství MRSA***

Příčinou šíření stafylokoků ve zdravotnických zařízeních bývají asymptomaticí (bezpříznakoví) nosiči. Nejzávažnější nosičství je nosní nosičství, které bývá v asi 20% trvalé a v 50% intermitentní.

Mezi další formy nosičství patří kožní (např. patologické kožní léze), perineální, střevní a nosičství ve vlasové části hlavy. V některých případech můžeme stafylokoky zachytit při kultivaci vzorků moči. Což může být způsobeno kontaminací z třísel při nesprávném odběru. V určitém období se téměř u všech dětí a dospělých vyskytuje nosní nosičství, asi ve 40% (6).

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1 Cíl práce**

Zjistit frekvenci výskytu MRSA u ambulantních pacientů. Porovnání frekvence výskytu MRSA u obou pohlaví, porovnání výskytu za jednotlivé měsíce a porovnání výskytu za roky 2008 a 2009. Dále zjištění rezistence a citlivosti na testovaná antibiotika a vytipování rizikových věkových skupin.

### **2.2 Hypotézy:**

H01: Odečtení citlivosti stafylokoka k oxacilinu na základě inhibiční zóny nevyovídá přesně o rezistenci k meticilinu

HA1: Odečtení citlivosti stafylokoka k oxacilinu na základě inhibiční zóny vypovídá přesně o rezistenci k meticilinu

H02 : Záchyt zvýšeného výskytu methicilin-rezistentních izolátů v roce 2009 než v roce 2008

HA2: Záchyt sníženého výskytu methicilin-rezistentních izolátů v roce 2009 než v roce 2008



## **3. Metodika**

### **3.1 *Transport klinického materiálu***

Klinický materiál přicházející do mikrobiologické laboratoře Laboma v Českých Budějovicích, musí být odebrán na výtěrovce. Při odběru materiálu na výtěrovku je vhodné použít transportní půdu (př. Amiesovo transportní medium, které obsahuje anorganické soli, thioglikolát sodný, 1% agaru a aktivní uhlí, či Stuartova transportní půda bez aktivního uhlí).

Je důležité, aby vzorek byl do laboratoře dopraven co možná nejrychleji (do 2 hodin po odběru, případně do 24 hodin při dodržení zásad pro uchování jednotlivých druhů materiálu).

### **3.2 *Kultivační půdy***

Podle druhu klinického materiálu zvolíme kultivační půdy, na které materiál naočkujeme. Většinu materiálů očkujeme do pomnožovací půdy (thioglykolátový bujon). Kultivaci provádíme ve vhodném kultivačním prostředí při teplotě 37°C 24 hodin. Pevné kultivační půdy obvykle kultivujeme 24 – 48 hodin.

### **3.3 *Mikroskopie***

Mikroskopické preparáty barvíme dle Grama. Gramovo barvení je postaveno na rozdílnosti ve stavbě stěny gramnegativních a grampozitivních bakterií. Při barvení vzniká v bakteriální buňce komplex krystalové violeti s jódem. Tento komplex se u gramnegativních bakterií vyplavuje acetonem či alkoholem.

Postup Gramova barvení: Při barvení mikroskopického preparátu dle Grama preparát nejdříve fixujeme (zahřátím nebo alkoholem) a pak barvíme krystalovou violetí. Všechny bakterie se obarví tmavomodře až modrofialově. Dále přidáme Lugolův roztok (obsahuje jód). V obarvených buňkách vzniká komplex barviva s jódem, který se u gramnegativních bakterií vyplaví. Dále přelijeme preparát acetonem, čímž dojde k odbarvení gramnegativní bakterií. Poté použijeme ředěný karbolfuchsin pro dobarvení

gramnegativních bakterií. Jako výsledek vidíme tmavomodré grampozitivní bakterie a červené gramnegativní bakterie.

### 3.4 Vyhledávací testy

Pro kultivaci *Staphylococcus aureus* se používá krevní agar. Krevní agar je nejčastěji užívaná půda v bakteriální diagnostice. Pro výrobu krevního agaru se používá defibrinovaná ovčí či beranní krev. Pokud na krevním agaru po kultivaci vyroste *Staphylococcus* rozlišujeme, zda se jedná o *Staphylococcus aureus*, nebo o *Staphylococcus* plasmakoaguláza -negativní.

Můžeme si vybírat z velkého množství komerčně vyráběných přípravků.

Postup latexové aglutinace na průkaz kapsulárních antigenů: Na destičku kápneme kapku negativní kontroly a kapku latexového testu. Ke každé kapce přidáme kličkou vyšetřovaný kmen. Vše promícháme. Pokud dojde k aglutinaci, jedná se o *Staphylococcus aureus*, pokud ne, pak se jedná o *Staphylococcus* plasma koaguláza-negativní. V případě, že dojde i v negativní kontrole k aglutinaci, pak se jedná o spontánní aglutinaci a test nelze hodnotit.

U klinického materiálu, kde není *Staphylococcus aureus* jako běžná flóra, stanovujeme citlivost k antibiotikům a současně provádějme vyhledávací testy na MRSA. Podle závažnosti materiálu se stanovuje minimální inhibiční koncentrace daného antibiotika (MIC). Jedná se o nejnižší koncentraci určitého antibiotika, která je ještě schopna zastavit růst testovaného kmene bakterie.

Při stanovení MIC se vyšetřovaný kmen nasadíme do 2 ml bujónku a necháme kultivovat při teplotě 37°C 2 hodiny. Bujon naředíme 20 ml fyziologického roztoku na sílu zákalu 0,5 – 1 stupeň McFarlanda (ředění asi 1:10). Dále pomocí automatické krokovací pipety naočkujeme mikrotitrační destičku s vybranými druhy antibiotik o příslušných koncentracích. Kultivujeme se při teplotě 37°C 24 hodin v běžné atmosféře.

V případě vzorku cíleně vyšetřovaného na průkaz MRSA, provádějme vyhledávací testy i u materiálu, kde je *Staphylococcus aureus* jako běžná flóra. Mezi vyhledávací testy patří test citlivosti k cefoxitinu a MRSA-select (= půda viz dále). Citlivost k cefoxitinu stanovujeme difúzní diskovou metodou. K vyšetření se použijeme

bílý (bez krvinek) Müller-Hintonův agar. Připravíme suspenzi vyšetřovaného kmene o síle 0,5 stupně McFarlanda, půdu přelijeme suspenzí bakterií, položíme disk cefoxitinu a 24 hodin kultivujeme. Pokud inhibiční zóna kolem disku cefoxitinu je 22mm a více, jedná se o citlivý kmen *Staphylococcus aureus*. Pokud je inhibiční zóna v rozmezí 6-21mm, jedná se o kmen MRSA.

MRSA-select = agarové medium pro izolaci a přímou identifikaci MRSA.

Selektivita tohoto media je založena na přítomnosti vysoké koncentrace soli a směsi antibiotik a fungicidů, která inhibuje většinu mikrobů s výjimkou stafylokoků rezistentních na methicilin. Identifikace je založena na průkazu specifické aktivity *Staphylococcus aureus*. Štěpení přítomného chromogenního substrátu, vede k intenzivnímu růžovému zbarvení kolonií MRSA. Inokulace rozdělujeme na přímou a nepřímou.

- Přímá: Inokulujeme roztěrem přímo z vyšetřovaného vzorku.
- Nepřímá: Vzorek (tampon) se umístí do 1ml bujónu (nebo 1 ml sterilního fyziologického roztoku). Inokuluje se roztěrem 50 $\mu$  této suspenze. Inkubace se provádí 18 – 24 hodin při 37°C. Poté odečítáme.

### 3.5 **Kvalitativní latexová aglutinace**

Pokud se jedná o akutní vyšetření vzorku, nebo máme určité nejasnosti v předchozím vyšetření, provádíme kvalitativní latexovou aglutinaci. Je založena na detekci penicilin vázajícího proteinu PBP2a přítomného na buněčné membráně methicilin rezistentních kmenů *S. aureus*. Principem je reakce latexových částic senzibilizovaných monoklonálními protilátkami s extraktem PBP2a z buněčné membrány MRSA po povaření bakteriální suspenze v alkalickém prostředí.

Postup:

- Reagencie vytemperujeme na pokojovou teplotu
- Do zkumavky přidáme 4 kapky extrakčního činidla
- Plastovou kličkou (1 $\mu$ ) přidáme kulturu testovaného kmene a to dostatečné množství (25 – 30 malých kolonií o průměru 0,5mm), nebo 4 – 5 velkých kolonií (průměr 2,5mm)
- Suspenze necháme důkladně homogenizovat a na 3 minuty umístíme do vodní lázně

o teplotě 95 – 100 °C

- Zkumavku vyjmeme a necháme zchladnout na pokojovou teplotu
- Přidáme 1 kapku extrakčního činidla a centrifugujeme 5 minut při 3000otáčkách
- Supernatant ihned po stočení použijeme do reakce, na testovací kartu napipetujeme 2 kapky (50 $\mu$ /kapka)
  1. kapka + kapka Sensitized Latex, promícháme plastovou tyčinkou
  2. kapka + kapka Control Latex, promícháme plastovou tyčinkou
- Krouživým pohybem promícháváme suspenzi a sledujeme vznik aglutinátu v průběhu 3 minut

Hodnocení: Dojde-li k aglutinaci v kapce se senzibilizovanými latexovými částicemi a negativní kontrola zůstává bez aglutinace, jedná se o kmen MRSA.

### **3.6 Stanovení citlivosti diskovou difúzí**

Disková difusní metoda se používá ke stanovení citlivosti rychle rostoucích nenáročných bakterií k antibiotikům.

#### **3.6.1 Mueller Hingon agar (MHA)**

Tato půda vyhovuje pro stanovení citlivosti většinu kmenů. Růst některých bakterií lze podpořit přidáním 5% defibrinované ovčí krve.

#### **3.6.2 Disky**

Výběr testovaného antibiotika závisí na druhu bakterie a účelu, pro který výsledek testu citlivosti použijeme. Pro epidemiologické účely používáme stabilní sestavy disků. Cílem je získat, co nejširší informace o vyšetřovaném kmeni.

Sestavy obsahují nejvíce šest disků. Na Stafylokoky je to nejčastěji oxacilin, cefazolin, tetracyklin, erythromycin, cotrimoxazol a klindamycin. V případě, že se jedná o výtěr z nosu je to neomycin nebo bacitracin.

Disky uchováváme v závislosti na druhu antibiotika při +4°C nebo při -15°C. Dvě hodiny před použitím potřebný počet disků přemístíme do pokojové teploty k odstranění kondenzační vody.

Disky klademe na povrch ploten nejpozději 15 minut po inokulaci. Pomocí injekční jehly nebo pinzety na plotnu o průměru 90mm umístíme nejvýše šest disků do kruhu. Disky k plotně jemně přitiskneme, aby celá plocha disku byla v kontaktu s povrchem půdy. Po kontaktu s povrchem půdy nemůžeme již disk přemístit, protože antibiotiku okamžitě difunduje do agarové půdy.

Nejpozději do 15 minut po kladení disků umístíme plotny do termostatu s víčkem dolů a inkubujeme při 37°C přes noc. Kmeny, které mohou být heterorezistentní (např. stafylokoky) musíme inkubovat celých 24 hodin.

Po inkubaci posuvným měřítkem změříme průměry inhibičních zón (včetně disků). Interpretace průměru inhibice zón je v tab.1. Hodnocení lze zrychlit a usnadnit použitím šablony s vyznačenými limity pro citlivé kmeny.

## 4. Vlastní výzkum

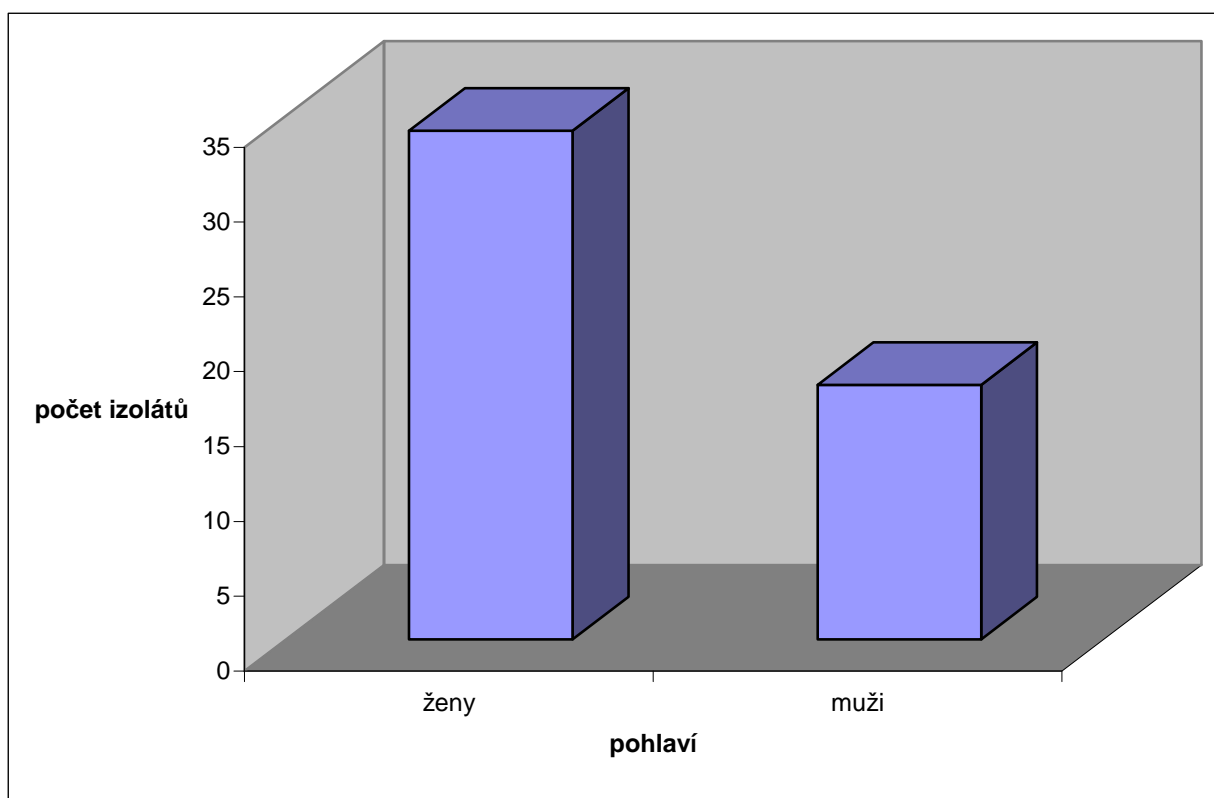
### 4.1. Charakteristika sledovaného souboru

Pro výzkumný soubor bylo použito za rok 2009 51 vzorků od ambulantních pacientů kolonizovaných MRSA z mikrobiologické laboratoře Laboma České Budějovice. Za rok 2008 bylo použito 46 vzorků od ambulantních pacientů z mikrobiologické laboratoře Laboma České Budějovice. Sledované znaky výzkumného souboru jsou pohlaví, věk, období záchytu, citlivost či rezistence k danému testovanému antibiotiku. Věkové skupiny jsou rozděleny v rozmezí patnácti let. Období záchytu je rozděleno po měsících. Typ grafu, který byl použit, je sloupcový a výsečový.

### 4.2. Grafické znázornění

Tab.2 Počet pozitivních izolátů na MRSA u jednotlivých pohlaví za rok 2009

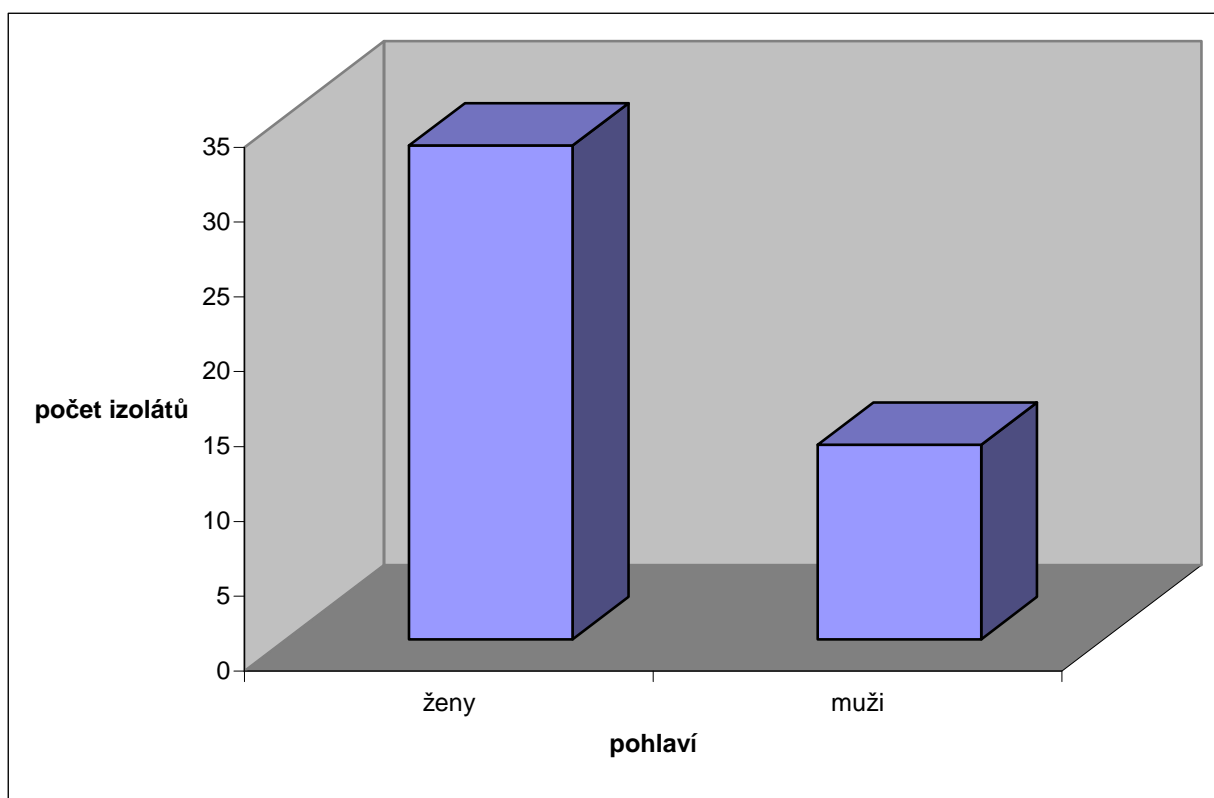
| Pohlaví       | ženy | muži |
|---------------|------|------|
| počet izolátů | 34   | 17   |



Obr.1 Počet pozitivních izolátů na MRSA u jednotlivých pohlaví za rok 2009

Tab.3 Počet pozitivních izolátů na MRSA u jednotlivých pohlaví za rok 2008

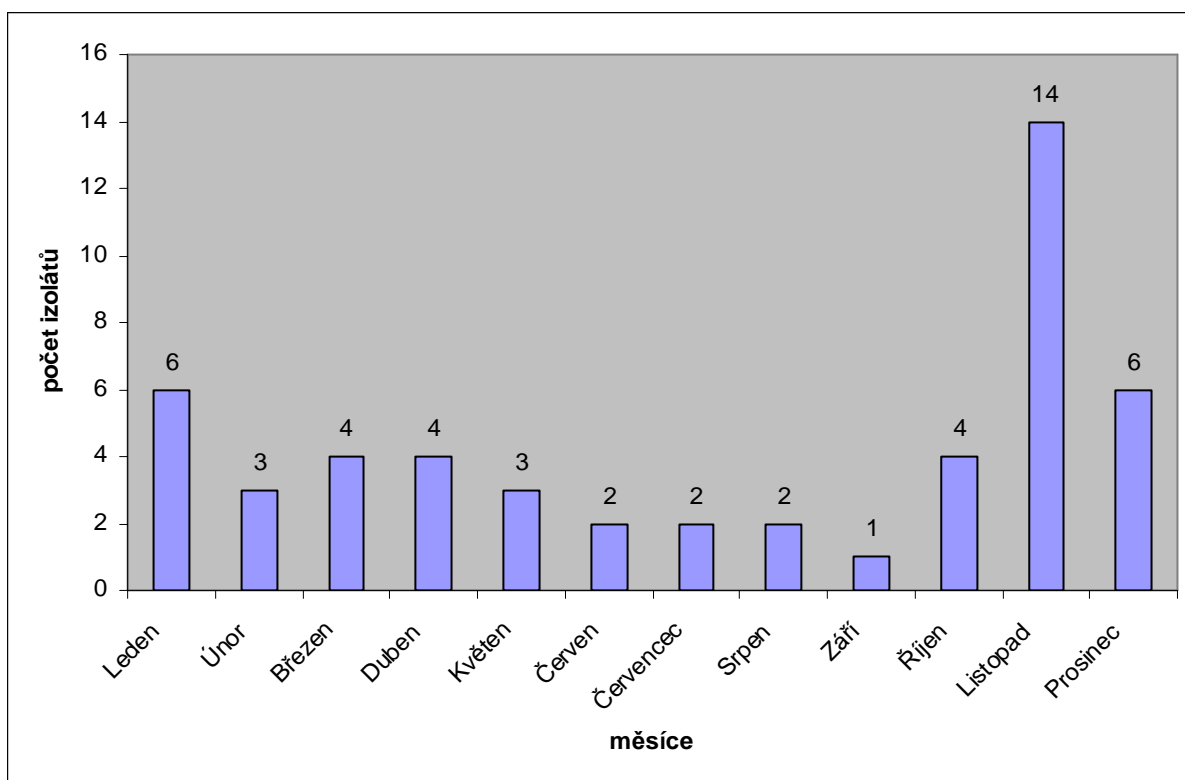
| Pohlaví       | ženy | Muži |
|---------------|------|------|
| počet izolátů | 33   | 13   |



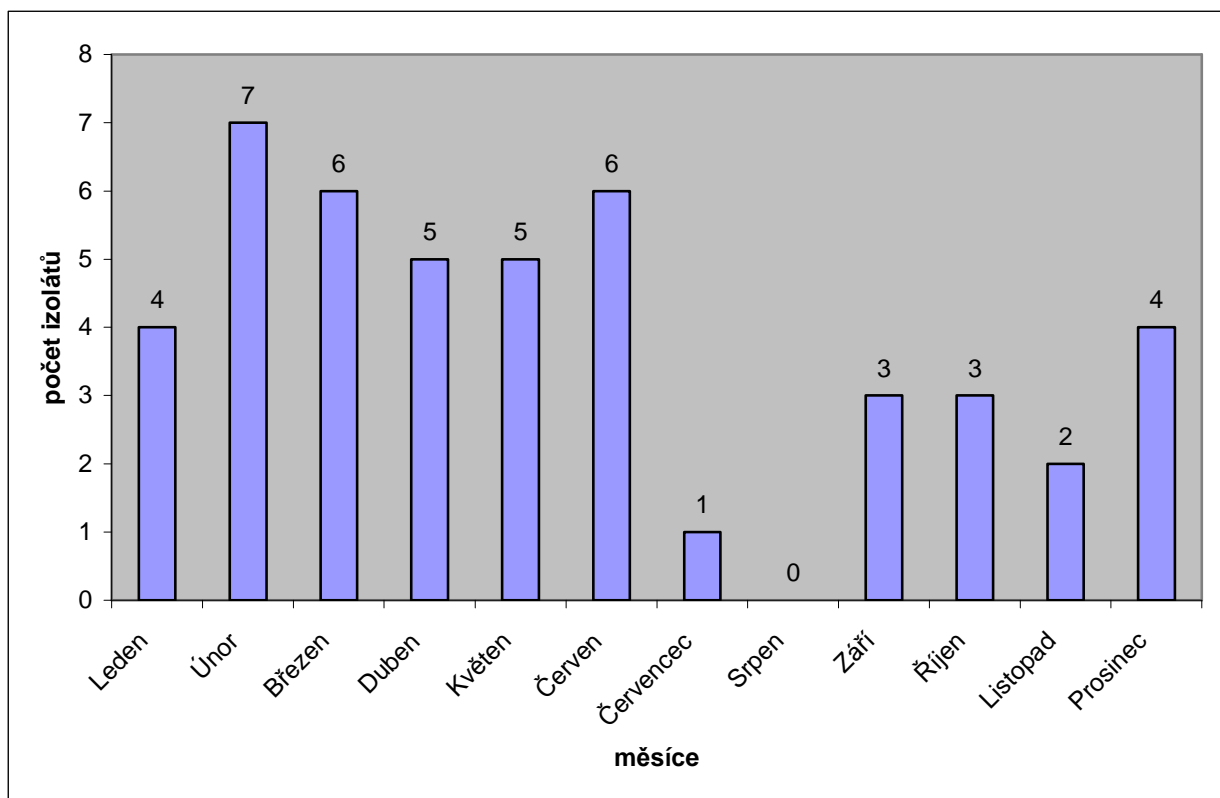
Obr.2 Počet pozitivních izolátů na MRSA u jednotlivých pohlaví za rok 2008

Na obrázku č.1 a č.2 je znázorněn záchyt MRSA dle pohlaví. Více pozitivních vzorků na MRSA bylo jednoznačně u žen.



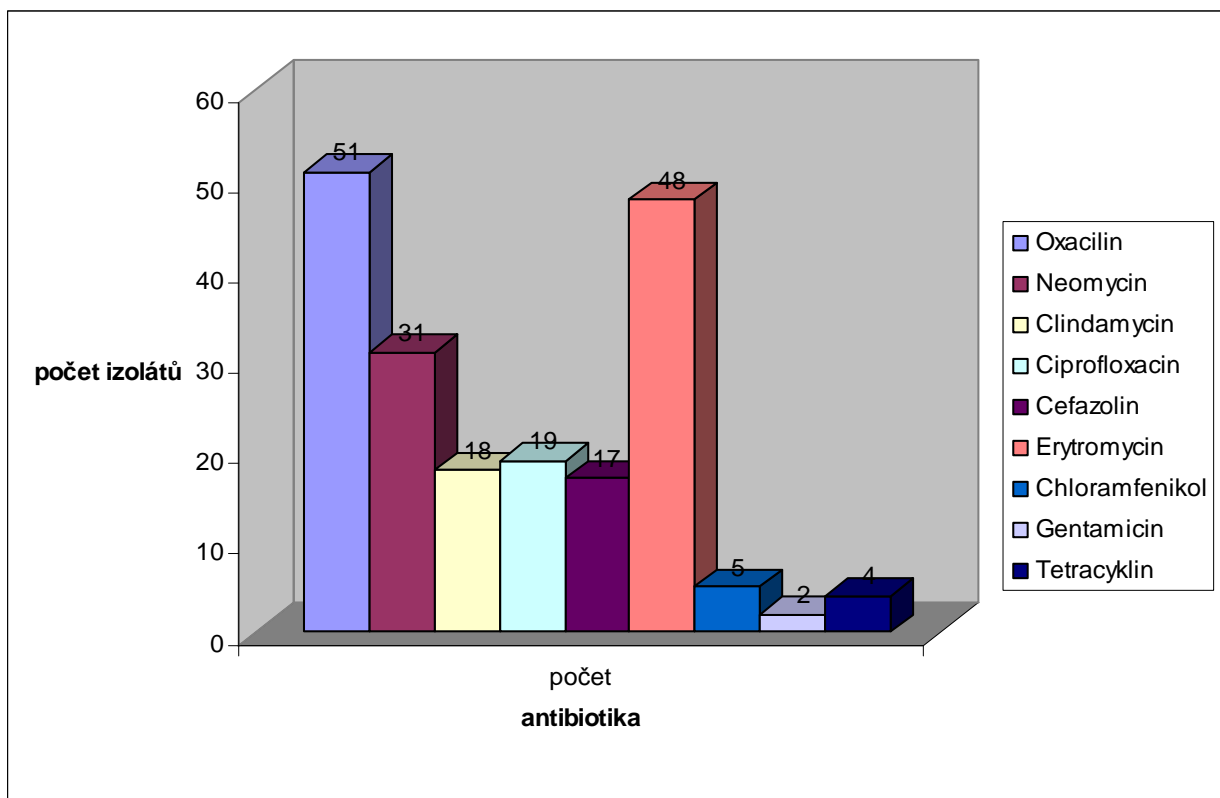


Obr.3 Počet izolátů pozitivních na MRSA za jednotlivé měsíce roku 2009

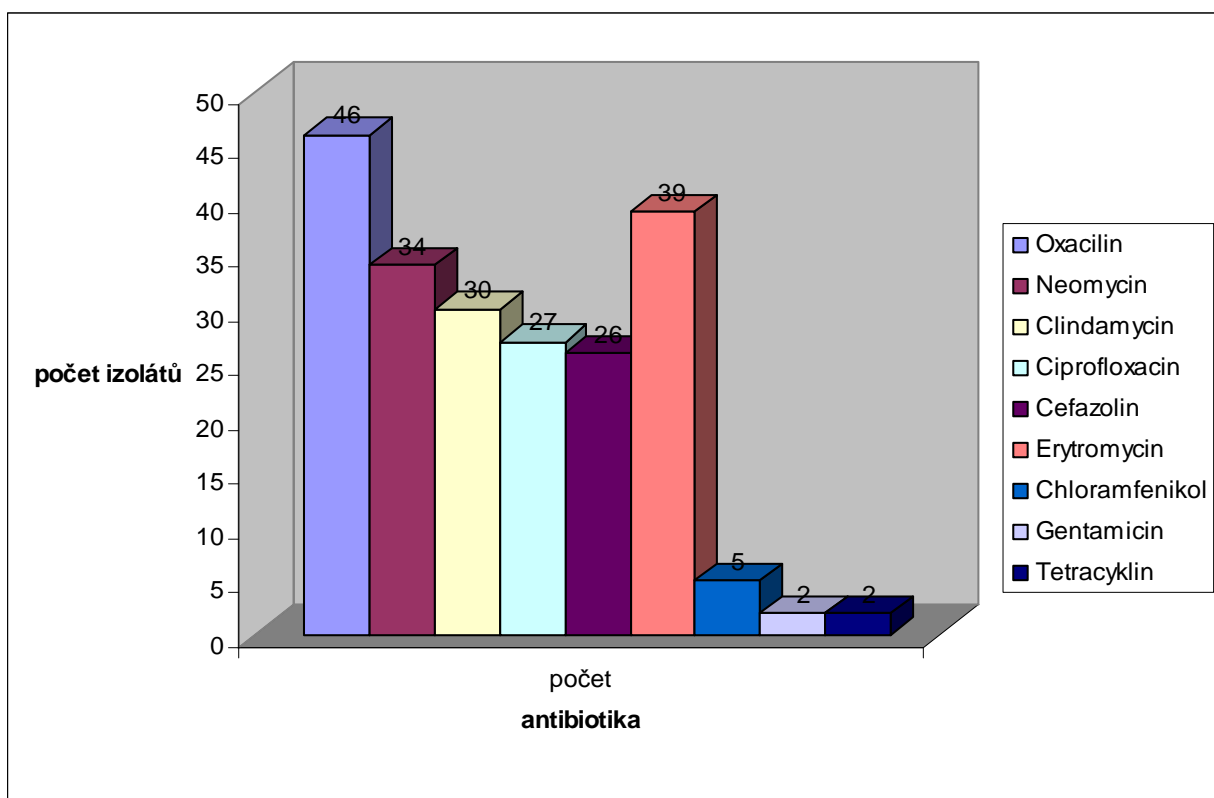


Obr.4 Počet izolátů pozitivních na MRSA za jednotlivé měsíce roku 2008

Na obrázcích č. 3 a č.4 je zobrazen celkový záchyt izolátů MRSA v roce 2009 a 2008. Časové období je rozloženo do jednotlivých měsíců. Počet pozitivních vzorků se lišil za oba roky i za jednotlivé měsíce. V roce 2009 bylo nejvíce pozitivních vzorků v listopadu (14 vzorků) a v roce 2008 to bylo v únoru (7 vzorků).

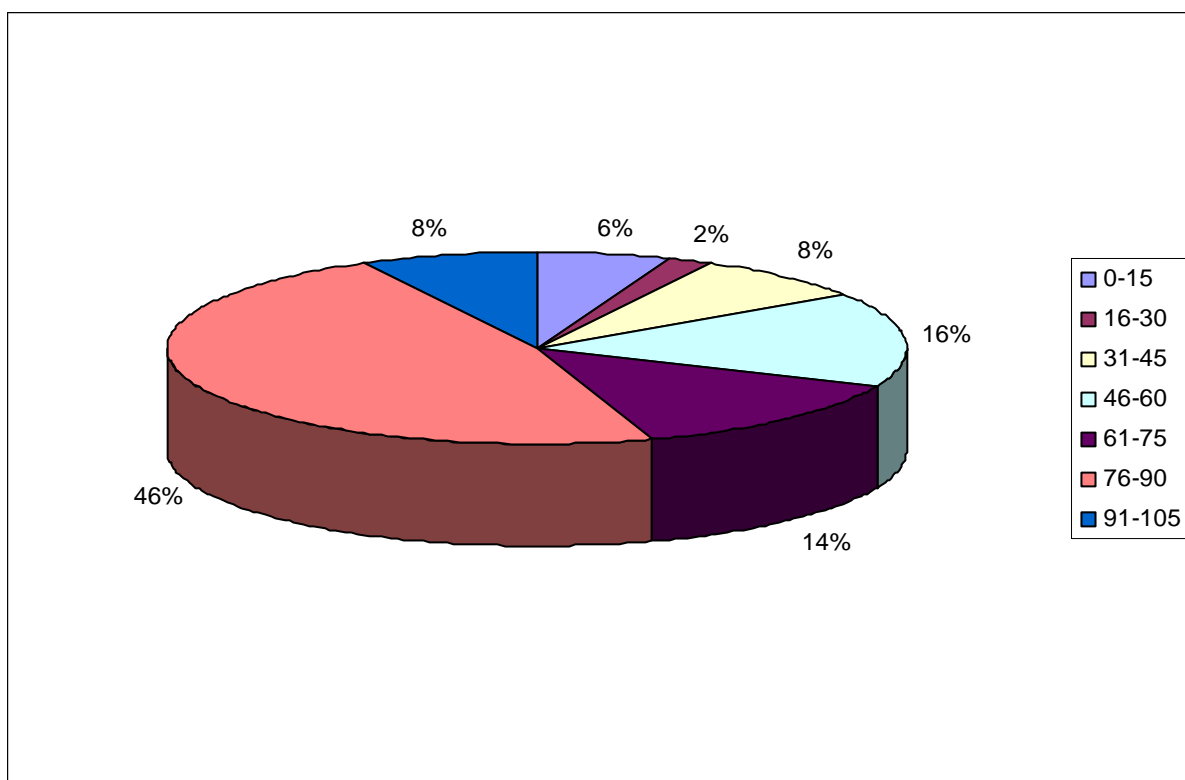


Obr.5 Rezistence MRSA k antibiotikům za rok 2009



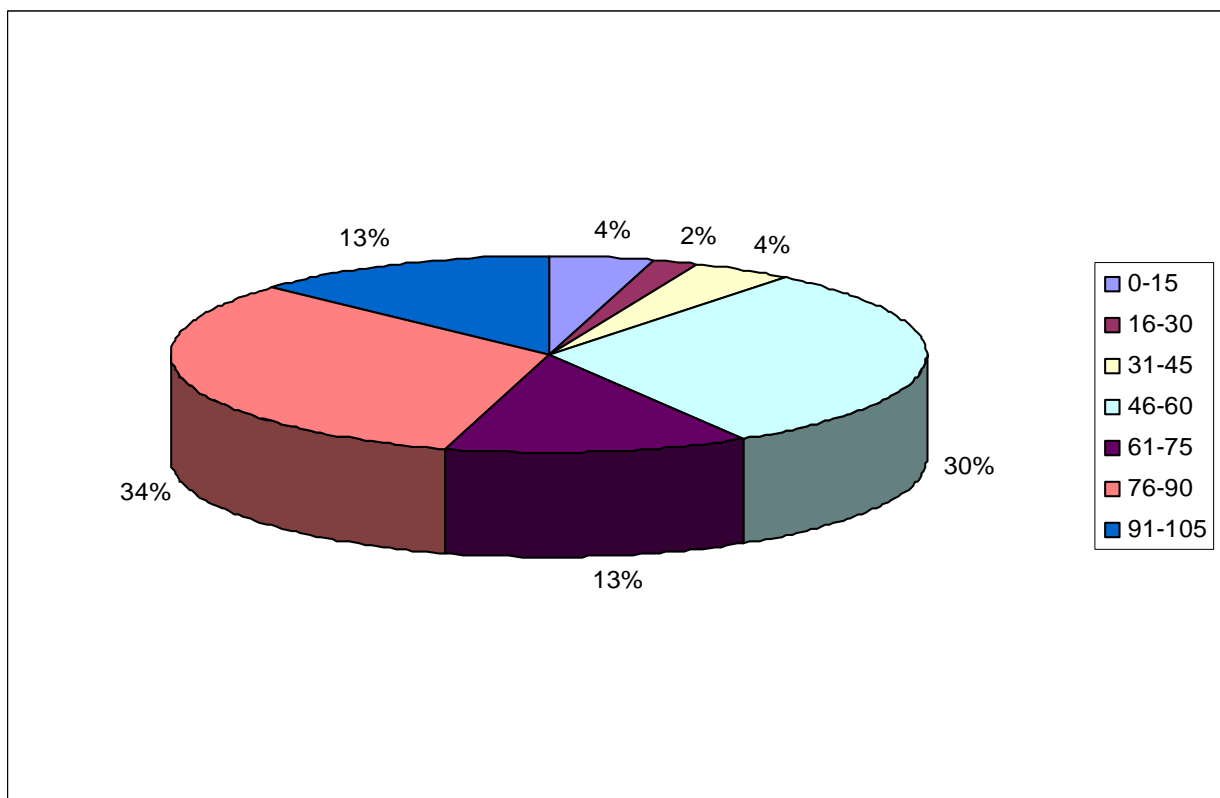
Obr.6 Rezistence MRSA k antibiotikům za rok 2008

Na obrázku č.5 a č.6 je zobrazena rezistence MRSA k antibiotikům za rok 2009 a 2008. Tato sada ATB se volí podle účinnosti na G+bakterie, v tomto případě na stafylokoky. V obou grafech je znázorněn počet izolátů MRSA za jednotlivé roky 2009 a 2008.



Obr.7 Záchyt MRSA dle věkových skupin v roce 2009

Nejvíce pozitivních vzorků na MRSA v roce 2009 se vyskytovalo ve věkové kategorii 76-90 let (46 %, 24 vzorků), naopak nejméně jich bylo ve věkové kategorii 16-30 let (2%, 1 vzorek).



Obr.8 Záchyt MRSA dle věkových skupin v roce 2008

Nejvíce pozitivních vzorků na MRSA v roce 2008 se vyskytovalo ve věkové kategorii 76-90 let (34 %, 15 vzorků), ale ve věkové kategorii 46-60 let bylo jen o 1 vzorek méně (30%,14 vzorků), nejméně jich bylo ve věkové kategorii 16-30 let (2%, 1 vzorek).

## 5. Diskuze

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je bakterie, která je častou příčinou infekcí získaných v nemocničních zařízeních (7). Tyto nákazy představují velký problém vzhledem k pooperačním komplikacím a prodloužené léčbě (5). Přibližně 25% až 30% populace je kolonizováno *S.aureum* a z toho 0,2% až 7% MRSA. Navíc se ukázalo, že může kolonizovat členy rodiny, co sdílejí jednu domácnost (tzn.přežívá v ručnicích a domácích potřebách) (8).

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit frekvenci výskytu MRSA u ambulantních pacientů, porovnání frekvence výskytu MRSA u obou pohlaví, porovnání výskytu za jednotlivé měsíce a porovnání výskytu za roky 2008 a 2009. Dále zjištění rezistence a citlivosti na testovaná antibiotika a vytipování rizikových věkových skupin. K tomu, abych tohoto cíle dosáhla, jsem graficky a statisticky zpracovala data získaná z roku 2009 a 2008. Soubor dat obsahuje 51 pozitivních izolátů na MRSA v roce 2009 a 46 pozitivních izolátův roce 2008.

V případě záchytu MRSA dle pohlaví je u mužů záchyt v roce 2009 a 2008 téměř stejný (viz obr. č. 1 a 2). Procentuálně vyjádřeno 28,26% z počtu 46 pozitivních izolátů v roce 2008 a 33,33% z počtu 51 pozitivních izolátů v roce 2009. U žen je záchyt také téměř stejný v roce 2008 i v roce 2009. V procentech 71,74% z 46 pozitivních izolátů v roce 2008 a 66,66% z počtu 51 pozitivních izolátů v roce 2009 (viz obr. č. 1 a 2).

Záchyt dle jednotlivých měsíců neukázal jednoznačnou závislost výskytu MRSA naročným obdobím (viz obr. č.3 a 4). V roce 2009 byl nejvyšší výskyt v listopadu (14 pozitivních vzorků), oproti tomu v roce 2008 byl nejvyšší výskyt v únoru (7 vzorků). Stejně tak rezistence k jednotlivým antibiotikům zůstává stejná, objevují se pouze ojedinělé odchylky (viz obr. č. 5 a 6).

Zaměříme-li se na záchyt MRSA u jednotlivých věkových skupin v roce 2009 a 2008 (viz obr. č. 7 a 8), tak objevíme shodné znaky. Nejpatrnější shodou je vysoký záchyt MRSA u věkové skupiny 76-90 let (46% z počtu 51 pozitivních izolátů za rok

2009 a 34% z počtu 46 pozitivních izolátů v roce 2008). Výrazný je také záchyt u skupiny 46-60 let v roce 2008, a to 30%.



## 6. Závěr

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je bakterie, která je častou příčinou infekcí získaných v nemocničních zařízeních (7). Tyto nákazy představují velký problém vzhledem k pooperačním komplikacím a prodloužené léčbě (5).

Je jedním z 50 stafyloků a jeho charakteristikou, vyhledávacími metodami a záchytem v roce 2009 a 2008 jsem se v této práci zabývala.

V práci jsem vyslovila dvě hypotézy. Hypotéza č.1: Odečtení citlivosti stafylokoka k oxacilinu na základě inhibiční zóny nevypovídá/vypovídá přesně o rezistenci k meticilinu. Máme sice určité rozmezí, v kterém by se inhibiční zóna měla vyskytovat, ale záleží na lékaři, jak sám to posoudí. Musíme ovšem uznat, že ve většině případů zóna odpovídala. Proto hypotéza č.1 byla potvrzena, zóna ve většině případů odpovídá.

Hypotéza č.2: Záchyt zvýšeného/sníženého výskytu methicilin-rezistentních izolátů v roce 2009 než v roce 2008. Záchyt pozitivních izolátů na MRSA se zvláště nezvýšil u žen to bylo o 1 pozitivní izolát a mužů o 4 pozitivní izoláty oproti roku 2008. Hypotéza č.2 tedy přesto byla potvrzena, výskyt se zvýšil.

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit frekvenci výskytu MRSA u ambulantních pacientů, porovnání frekvence výskytu MRSA u obou pohlaví, porovnání výskytu za jednotlivé měsíce a porovnání výskytu za roky 2008 a 2009. Dále zjištění rezistence a citlivosti na testovaná antibiotika a vytipování rizikových věkových skupin.

Záchyt MRSA u jednotlivců se zvyšuje s rostoucím věkem, což je spojeno s častějšími a většími zdravotními problémy a oslabením starších jedinců. Vytipovanou rizikovou skupinou je věková skupina od 76 do 90 let, jak v roce 2009, tak i v roce 2008 (v roce 2008 je to navíc i skupina 46-60 let).

Častější výskyt u žen než u mužů je také způsoben tím, že ženy se dožívají vyššího věku než muži a vyšší věk je rizikovým faktorem pro MRSA.

V případě záchytu dle ročního období, nebyla nalezena souvislost v záchytu MRSA a jednotlivými měsíci v roce.

Rezistence a citlivost na antibiotika se nijak výrazně nezměnila za roky 2009 a 2008, až na pár odchylek.

Cíle, které jsem si stanovila, jsem splnila a zároveň jsem si prohloubila znalosti v oblasti problematiky MRSA.

Má práce by mohla být použita jako pomocník pro zlepšení situace v záchytu MRSA, jelikož jsou zde vytipovány rizikové věkové skupiny a proto je možné účelně se soustředit na preventivní opatření. Dále by mohla být použita jako studijní materiál pro studenty Zdravotně sociální fakulty.

## 7. Seznam použitých zdrojů:

1. Bassetti M, Nicco E, Mikulska M.(2009): Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice. *Int J Antimicrob Agents* 1:15-19

2. BEDNÁŘ M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., et al.: Lékařská mikrobiologie. 1.vyd. Praha: Marvil,1996. s.194-202,

3. Franklin D. Lowy, M.D.(1998): Staphylococcus aureus Infections. *Medical progress* 8:520-532

4. Genç Y, Ozkanca R, Bekdemir Y.(2008): Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 7:17

5. Kluytmans J.A., Mouton J.W., Maat A.P., Manders M.A., Michel M.F., Wagenvoort J.H.(1994): Surveillance of postoperative infections in thoracic Surgery. *J Hosp Infect* 27:139-147

6. MAĎAR R., PODSTATOVÁ R., ŘEHOŘOVÁ J.: Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi. Praha: Grada, 2006. 184 s. ISBN 80-247-1673-9

7. McConeghy K.W., Mikolich D.J., LaPlante K.L.(2009): Agents for the decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Pharmacotherapy* 29:263-80

8. Oller, AR., Mitchell, A.(2009): Staphylococcus aureus recovery from cotton towels. *J Infect Dev Ctries* 3:224-228

9.PODSTATOVÁ H.: Mikrobiologie epidemiologie hygiena. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001. 285 s. ISBN 80-86297-07-1

10.Spoločnosť prevencie nozokomiálnych nákaz. Nozokomiální nákazy. Zvolen: 2008, roč. 7, ISSN 1336-3859

11.Velký lékařský slovník (online) Platný <<http://lekarske.slovníky.cz>>

12.Velký lékařský slovník (online) Platný  
<http://lekarske.slovníky.cz/pojem/nozokomialni-nakaza>

13.VOTAVA M., et al.: Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. s.99-105,ISBN 80-902896-6-5

14.VOTAVA M., ONDROVČÍK P.: Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. 1.vyd. Brno: MU, 1998. 90 s. ISBN 80-210-1805-4

15.VOTAVA M.: Lékařská mikrobiologie obecná. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5

16.Woeste G, Zapletal C, Wullstein C, Golling M, Bechstein WO.(2005): Influence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrier status in liver transplant recipients. Transplant Proc 37:1710-2

## **8. Klíčová slova**

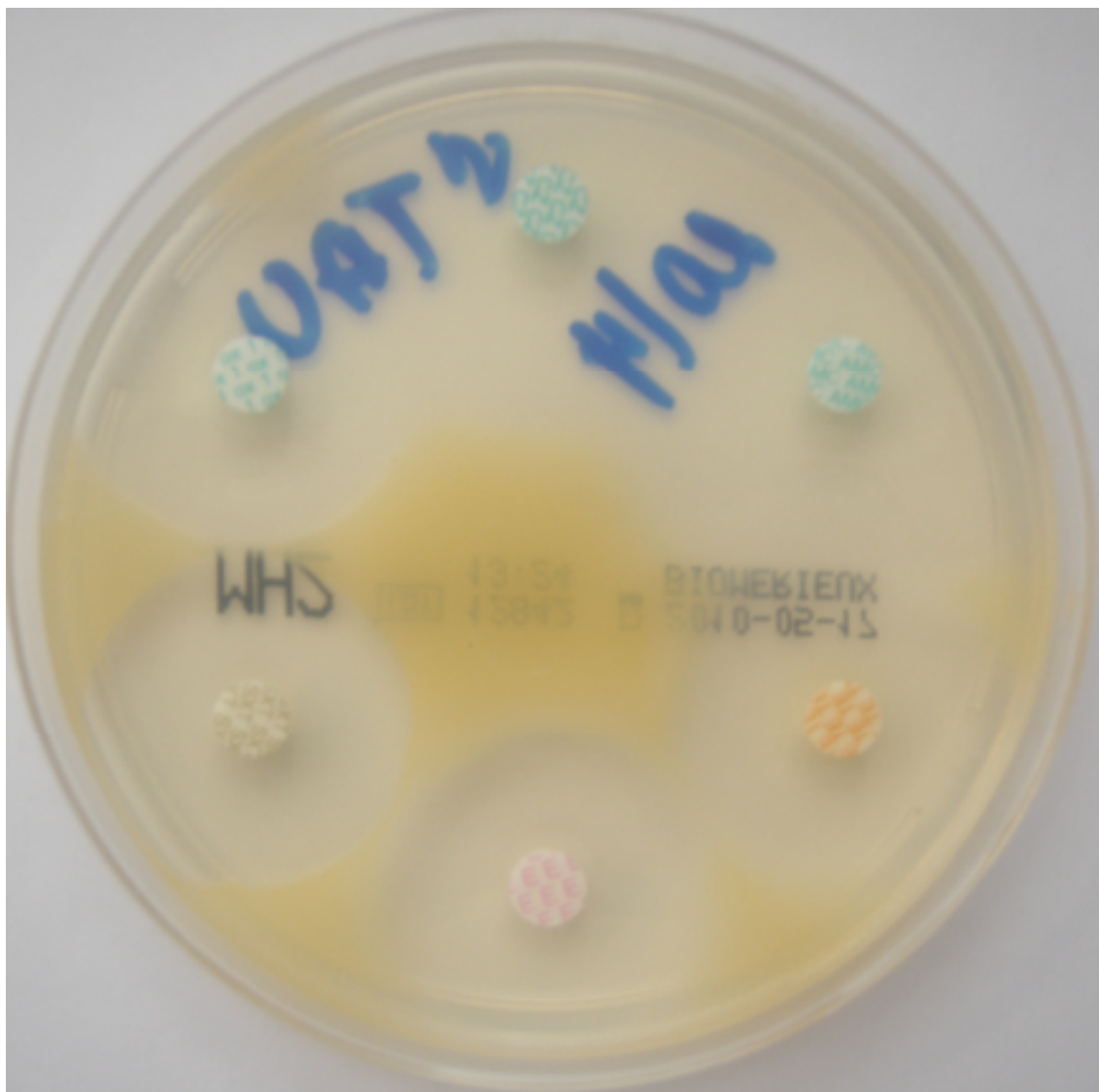
Antimikrobiální látky

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

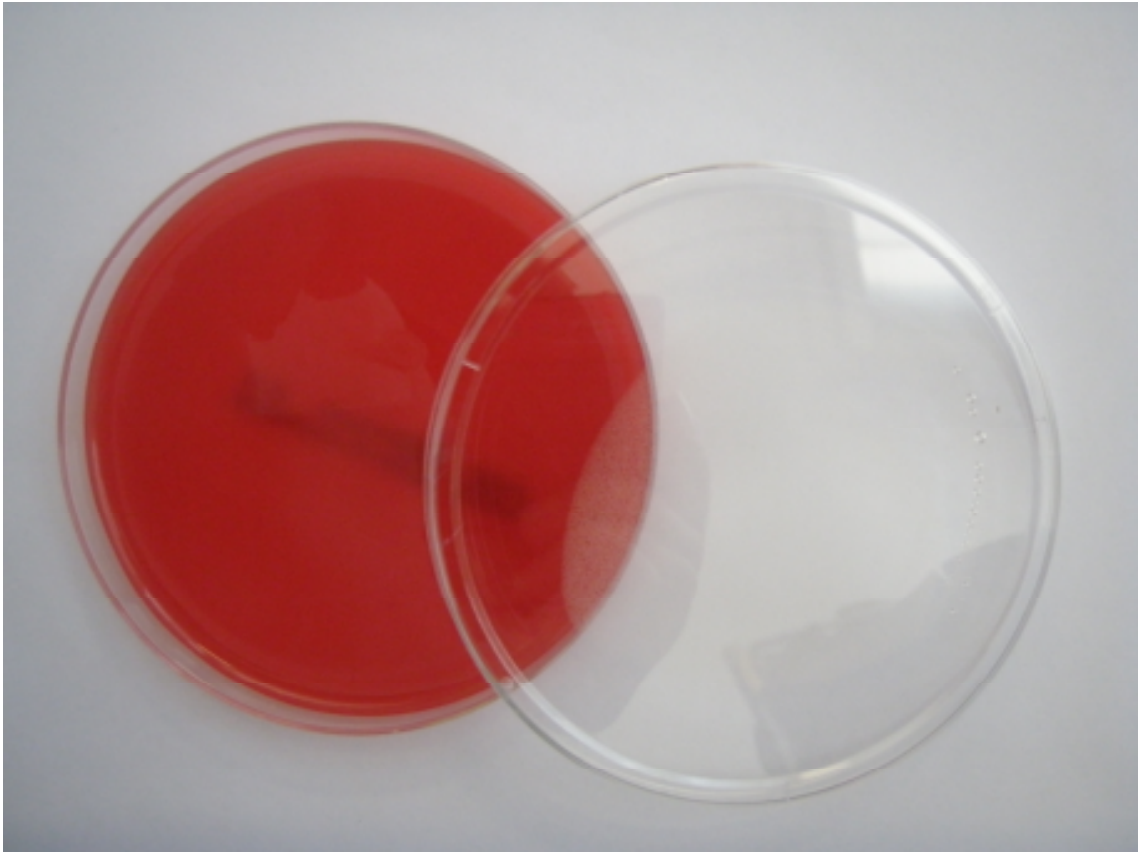
*Staphylococcus aureus*

Nozokomiální nákazy

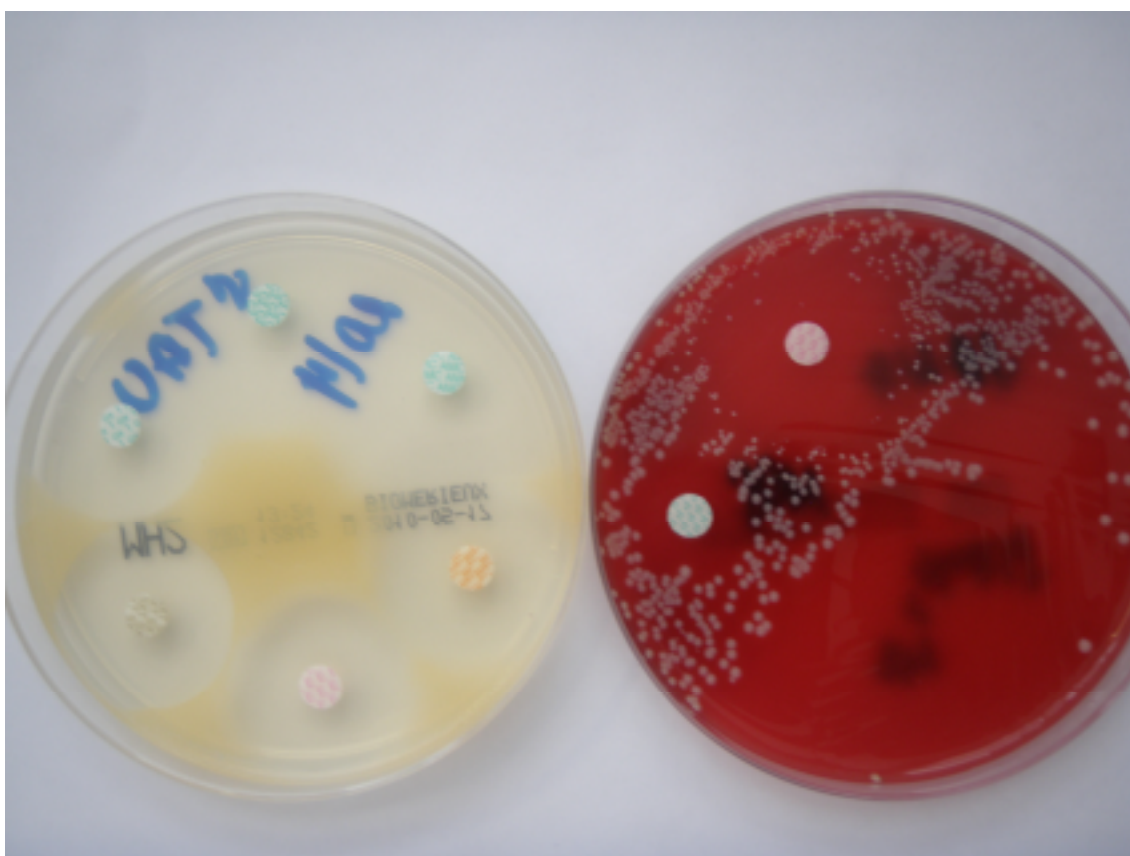
## 9. Přílohy



Obr.9 Kultivační půda s disky na průkaz citlivosti na antibiotika



Obr.10 Krevní agar



Obr.11 Kultivační půdy s disky na citlivost na antibiotika



Tabulka 1. Interpretace průměrů inhibičních zón.

| Disk                        | Obsah disku | Druh   | Průměr inh. citlivý                    | zóny (mm) rezistentní                |
|-----------------------------|-------------|--|--|--------------------------------------|
| Amikacin (1)                | 30 ug       |  | ≥17                                    | ≤14                                  |
| Ampicilin                   | 10 ug       | enterokoky<br>gramnegativní tyčky<br>hemofilý (2)<br>listerie<br>streptokoky               | ≥17<br>≥17<br>≥25<br>≥20<br>≥30        | ≤16<br>≤13<br>≤21<br>≤19<br>≤21      |
| Amoxicilin/klavulanová kys. | 20/10 ug    | gramnegativní tyčky<br>stafylokoky, hemofilý   | ≥18<br>≥20                             | ≤13<br>≤19                           |
| Ampicilin/sulbaktam         | 10/10 ug    | hemofilý<br>ostatní bakterie   | ≥20<br>≥15                             | ≤19<br>≤11                           |
| Azlocilin                   | 75 ug       | pseudomonády   | ≥18 (3)                                |                                      |
| Aztreonam                   | 30 ug       |  | ≥22                                    | ≤15                                  |
| Cefalotin                   | 30 ug       |  | ≥18                                    | ≤14                                  |
| Cefoperazon                 | 75 ug       |  | ≥21                                    | ≤15                                  |
| Cefotaxim                   | 30 ug       | gramnegativní tyčky<br>hemofilý  | ≥23<br>≥26                             | ≤15<br>N                             |
| Cefoxitin                   | 30 ug       |  | ≥22                                    | ≤15                                  |
| Ceftazidim                  | 30 ug       |  | ≥21                                    | ≤15                                  |
| Ceftriaxon                  | 30 ug       | gramnegativní tyčky<br>hemofilý  | ≥21<br>≥26                             | ≤15<br>N                             |
| Cefuroxim                   | 30 ug       | gramnegativní tyčky<br>hemofilý  | ≥23<br>≥24                             | ≤14<br>≤20                           |
| Ciprofloxacin               | 5 ug        |  | ≥21                                    | ≤15                                  |
| Erytromycin                 | 15 ug       |  | ≥23                                    | ≤13                                  |
| Gentamicin (1)              | 10 ug       |  | ≥15                                    | ≤12                                  |
| Chloramfenikol              | 30 ug       | hemofilý<br>ostatní bakterie   | ≥29<br>≥18                             | ≤25<br>≤12                           |
| Imipenem                    | 10 ug       |  | ≥22                                    | ≤17                                  |
| Kanamycin (1)               | 30 ug       |  | ≥18                                    | ≤13                                  |
| Klindamycin (4)             | 2 ug        |  | ≥21                                    | ≤14                                  |
| Kolistin                    | 10 ug       |  | ≥10                                    | ≤9                                   |
| Ko-Trimoxazol (5)           | 25 ug       |  | ≥16                                    | ≤10                                  |
| Kyselina oxolinová          | 30 ug       |  | ≥19                                    | ≤13                                  |
| Netilmicin (1)              | 30 ug       |  | ≥15                                    | ≤12                                  |
| Nitrofurantoin              | 100 ug      |  | ≥17                                    | ≤14                                  |
| Ofloxacin                   | 5 ug        |  | ≥16                                    | ≤12                                  |
| Oxacilin (6)                | 1 ug        | stafylokoky<br>pneumokoky (7)  | ≥13<br>≥20                             | ≤10<br>≤19                           |
| Penicilin                   | 10 J        | enterokoky<br>gonokoky (2)<br>listerie<br>pneumokoky (8)<br>stafylokoky (2)<br>streptokoky | ≥15<br>≥47<br>≥20<br>≥35<br>≥29<br>≥28 | ≤14<br>≤26<br>≤19<br>N<br>≤28<br>≤19 |
| Rifampicin                  | 5 ug        |  | ≥20                                    | ≤16                                  |
| Spektinomycin               | 100 ug      | gonokoky   | ≥18                                    | ≤14                                  |
| Sulfisoxazol                | 300 ug      |  | ≥17                                    | ≤12                                  |
| Tetracyklin                 | 30 ug       | gonokoky<br>hemofilý<br>ostatní bakterie   | ≥38<br>≥29<br>≥19                      | ≤30<br>≤25<br>≤14                    |
| Teikoplanin                 | 30 ug       |  | ≥14                                    | ≤10                                  |
| Tikarcilin                  | 75 ug       | gramnegativní tyčky<br>pseudomonády  | ≥20<br>≥15 (3)                         | ≤14<br>≤14                           |
| Tobramycin (1)              | 10 ug       |  | ≥15                                    | ≤12                                  |
| Vankomycin                  | 30 ug       | enterokoky<br>ostatní gram+ koky   | ≥17<br>≥12                             | ≤14<br>≤9                            |

Stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou