

Jiho česká univerzita v českých Budějovicích
Zdravotní sociální fakulta

Současné možnosti laboratorní diagnostiky stafylokokových infekcí

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Chrtová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Magda Balejová

Datum odevzdání práce: 14.8.2013

Abstrakt

Laboratorní diagnostika stafylokokových infekcí je založena na primárním případu, tj. na mikroskopii a kultivaci, případně na přítomnosti bakteriální DNA. Cílem této práce je posouzení možnosti laboratorní diagnostiky infekcí způsobených koagulázou u negativními stafylokoky a porovnání jednotlivých metod používaných k identifikaci v rutinní laboratorní praxi.

Úvodní část práce je věnována popsání rodu *Staphylococcus*, jeho odlišení od rodu *Micrococcus* a *Peptococcus*. Následně pak rozdělení rodu *Staphylococcus* na základě schopnosti enzymaticky koagulovat plazmu do dvou hlavních skupin (stafylokok koagulázou pozitivních a koagulázou negativních). U těchto dvou hlavních skupin je popsána jejich morfologie, kultivace, antigenní struktura, faktory virulence, patogenese a laboratorní diagnostika.

V metodické části je zmíněna preanalytická a analytická fáze vyšetření. Preanalytická část je zaměřena na obecné zásady odběru a transportu materiálu na mikrobiologické vyšetření a samotný odběr materiálu.

Metodická část byla prováděna v Laboratorii lékařské mikrobiologie na Pracovišti bakteriologie v Nemocnici České Budějovice a.s. V této části práce je popsáno rozlišení stafylokoků na základě koagulázového testu latexovou aglutinací (PROLEXTM STAPH LATEX KIT) a následně druhová identifikace 52 kmenů stafylokoků koagulázou negativních, izolovaných z centrálních žilních katétrů, hemokultur a jiných klinicky závažných materiálů. Druhová identifikace všech 52 kmenů stafylokoků koagulázou negativních byla provedena biochemickou identifikací testem STAPHYtest 16 a paralelně hmotnostní spektrometrií s technologií MALDI-TOF systémem VITEK MS¹. Tyto metodami byly kmeny identifikovány s úspěšností 96,2 % u metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a s úspěšností 67,3 % u biochemické identifikace STAPHYtest 16. Nejčastěji byl identifikován druh *Staphylococcus epidermidis* (64 %), následně *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis* (10 %), *Staphylococcus capitis* (6 %), *Staphylococcus warneri* (6 %), *Staphylococcus lungdunensis* (4 %), *Staphylococcus haemolyticus* (4 %), *Staphylococcus hominis* (4 %),

Staphylococcus caprae (2 %). V porovnání obou metod je hmotnostní spektrometrie spolehlivější, rychlejší a jednodušší metodou vhodnou do rutinní laboratorní praxe.

Klí ová slova: biochemická identifikace, centrální filní katétr, hemokultury, MALDI TOF MS, stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Abstract

Laboratory diagnostics of Staphylococcal infections is based on direct evidence, like microscopy and cultivation, eventually on molecular genetics methods. The objective of this thesis is the presentation of nowadays possibilities in laboratory diagnostics of coagulase σ negative staphylococcal infections and comparison of two methods of identification used in the routine laboratory practice.

First part of the thesis presents the genus *Staphylococcus* and the difference between it and the genera *Micrococcus* and *Peptococcus*. The following part of this thesis shows the distribution of genus *Staphylococcus* in two main groups (*Staphylococcus* coagulase σ positive and coagulase σ negative), based on the ability to coagulate plasma. The description of these two main groups contains their morphological and cultivation features, antigen structure, virulence factors, pathogenesis and laboratory diagnostics.

In the methodical part the pre-analytic and analytic phase is mentioned. The focus of the pre-analytic part the general principles of collection and transport for microbiological analysis and the collection of material itself.

The methodical part was performed in the eské Bud jovice Hospital σ Laboratory of Medical Microbiology σ Department of Bacteriology. This part of the thesis presents the differentiation of staphylococci by latex agglutination (PROLEXTM STAPH LATEX KIT) and then specific identification of 52 strains of coagulase-negative staphylococci isolated from central venous catheters, hemocultures and other clinical important materials is following. The specific identification of all the 52 strains of coagulase-negative staphylococci was performed by biochemical identification by STAPHYtest 16 (ErbaLachema) and parallel by mass spectrometry MALDI-TOF (system VITEK MSTM). The correct identification reached 96,2 % by the method of mass spectrometry MALDI-TOF and 67,3 % by biochemical identification STAPHYtest 16. The most frequent species isolated was *Staphylococcus epidermidis* (64 %), then *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis* (10 %), *Staphylococcus capitis* (6 %), *Staphylococcus warneri* (6 %), *Staphylococcus lugdunensis* (4 %), *Staphylococcus haemolyticus* (4 %), *Staphylococcus hominis* (4 %), *Staphylococcus caprae* (2 %).

The comparison of both named methods shows the mass spectrometry more reliable, faster and simpler method, and more suitable for routine laboratory work.

Keywords: biochemical identification, central venous catheter, hemocultures, MALDI TOF MS, *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Prohlášení

Prohláuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohláuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to i v nezkrácené podobě i v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou i elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky kolektivu a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14.8.2013

.....

Lucie Chrtová

Poděkování

Děkuji vedoucímu MUDr. Magd. Balejové za odborné vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji spolupracovníkům v Laboratorii lékařské mikrobiologie na Pracovišti bakteriologie v Nemocnici české Budějovice a.s. za vstřícnost. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

Seznam použitých zkratk

1. Teoretický úvod	10
1.1. Rod <i>Staphylococcus</i>	10
1.1.1 Koaguláza-pozitivní stafylokoky	12
1.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.1.1.1.1 Morfologie	13
1.1.1.1.2 Antigenní struktura.....	13
1.1.1.1.3 Faktory virulence.....	14
1.1.1.1.3.1 Povrchové faktory.....	15
1.1.1.1.3.2 Extracelulární faktory	15
1.1.1.1.4 Patogeneze	17
1.1.1.1.5 Patogenita.....	17
1.1.2 Koaguláza-negativní stafylokoky.....	19
1.1.2.1 Mikroskopie	20
1.1.2.2 Kultivace p d a morfologie kolonií.....	21
1.1.2.3 Druhov \acute{a} identifikace	21
1.1.2.4 Patogeneze	21
1.2 Obecn \acute{e} zásady odb ru a transportu materiálu na mikrobiologick \acute{e} vy- et ení ..23	
1.2.2 Laboratorní diagnostika.....	24
1.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	24
2. Cíl práce.....	26
3. Metodika.....	27
3.1 Mikroskopie	27
3.2 Kultivace.....	28
3.2.1 Kultivace hemokultur	28
3.2.2 Kultivace centrálních filních katétr	29
3.2.3 Kultivace tekutého materiálu a výt r /st r	29
3.3 Identifikace	30
3.3.1 Kataláza	30
3.3.2 Rozli- \acute{e} ní stafylokok koaguláza - pozitivních a stafylokok koaguláza - negativních.....	31
3.3.2.1 Druhov \acute{a} identifikace stafylokok koaguláza - negativních	31
3.3.2.1.1 Biochemická identifikace.....	31
3.3.2.1.2 Identifikace hmotnostní spektrometrií ó technologie MALDI- TOF.	37
4. Výsledky	42
4.1 Identifikace kmen STKN biochemicky (STAPHYtest 16)	42
4.2 Identifikace kmen STKN systémem VITEK MS TM	43
4.3 Porovnání identifikace kmen STKN biochemicky (STAPHYtest 16) metodou MALDI TOF MS systémem VITEK MS TM	43
4.4 Zastoupení jednotlivých kmen STKN dle výsledk identifikace metodou MALDI-TOF MS systémem VITEK MS TM	45
5. Diskuse	47
6. Záv r.....	50
7. Seznam použit \acute{e} literatury	51

Seznam poufitych zkratek

CfK	Centrální filní katétr
KNS	Koaguláza negativní stafylokoky
PBAK	Pracovišt bakteriologie
MRSA	methicilin rezistentní <i>S. aureus</i>
STCA	<i>Staphylococcus capitis</i>
STCP	<i>Staphylococcus caprae</i>
STEP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
STHA	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
STHH	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>
STHO	<i>Staphylococcus hominis</i>
STKN	Stafylokoky koaguláza negativní
STLU	<i>Staphylococcus lungdunensis</i>
STWA	<i>Staphylococcus warneri</i>
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku 1

1. Teoretický úvod

1.1. Rod *Staphylococcus*

Zástupci rodu *Staphylococcus* jsou morfologicky grampozitivní koky o průměru 0,5-1,5 μm, vyskytující se jednotlivě, v párech i v nepravidelných shlucích a tvořící spóry. Poprvé byly popsány nezávisle na sobě Louisem Pasteurem a Sirem Alexanderem Ogstonem v roce 1880. Název stafylokok je odvozený z řeckého *staphylé* (hrozen) a *cocos* (zrna nebo bobule), a vyjadřuje právě typické morfologické uspořádání stafylokoků. Zaveden byl skotským chirurgem a amatérským mikrobiologem Sirem Alexanderem Ogstonem, který prokázal, že jsou původci hnisavých onemocnění člověka.

Stafylokoky se morfologicky podobají koky z rodu *Micrococcus* a *Peptococcus*, které se však odlišují na úrovni DNA, což vylučuje jejich taxonomickou příbuznost (Beneš 2002, Greenwood et al. 1999, Murray et al. 2003).

Dalším rozlišujícím znakem mikrokoků od stafylokoků je jejich metabolismus. Mikrokoky jsou striktně aerobní, koky z rodu *Peptococcus* jsou striktně anaerobní. Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní a dobře se kultivují v aerobních i anaerobních podmínkách. Jsou poměrně odolné vůči vlivům zevního prostředí. Snesou i vyschnutí a vykazují odolnost i k vysoké koncentraci soli (Beneš 2002, Greenwood et al. 1999, Murray et al. 2003).

Stafylokoky jsou poměrně kultivovatelné mikroorganismy, které dobře rostou i na běžných kultivačních podmínkách. K jejich izolaci je vhodný krevní agar s 5 % beraní krví, trypton sojový agar TSA nebo BHI agar s přidáním mozkomíškové infuze. K zachytu stafylokoků z kontaminovaných vzorků je vhodné užit selektivní půdu, například krevní agar s 10 % NaCl (Murray et al. 2003, Votava et al. 2003).

Zatímco bakterie rodu *Micrococcus* a *Peptococcus* se považují za neškodné komenzály, stafylokoky mohou být původci i závažných i méně významných infekcí lidí a zvířat. V současné době je popsáno 54 druhů stafylokoků (viz tab. 1). Spadají do dvou hlavních skupin na základě schopnosti enzymaticky pomocí koagulázy koagulovat plazmu. Nejvýznamnějším zástupcem koaguláza pozitivních stafylokoků

je *Staphylococcus aureus* (Murray et al. 2003, Petrá– 2010), který patří mezi hlavní patogeny rodu *Staphylococcus*. Stafylokoky ale také bří kolonizují kří lidí a zvířat. Asi 30 % zdravých lidí jsou nositeli *Staphylococcus aureus* a jeřt vyří je výskyt stafylokoků koaguláza-negativních. Stafylokoky koaguláza-negativní jsou v souřasnosti považované za významné podmíněné patogenní bakterie, které mohou vyvolávat infekce spojené s implantací cizorodých materiálů ortopedických i cévních protéz, cévních katétrů a jiných implantátů (*Staphylococcus epidermidis*) a infekce močových cest (*Staphylococcus saprophyticus*). Stafylokoky koaguláza-negativní se dříve do úrovně druhu v běžné praxi neidentifikovaly, ale dnes, vzhledem k jejich narůstajícímu významu jako možných oportunních patogenů, se jejich identifikace do druhu, u klinicky významných izolátů provádí. Jejich identifikaci usnadňují moderní, rychlé metody, které jsou v současné době k dispozici (Bene– 2002, Greenwood et al. 1999, Murray et al. 2003).

Tabulka 1: Seznam druhů a poddruhů rodu *Staphylococcus* (Murray et al. 2003, Petrá– 2010)

ROD	DRUH	PODDRUH	ROK objevení
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> *	subsp. <i>aureus</i>	1884
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>		1916
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	subsp. <i>saprophyticus</i>	1951
<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i>	subsp. <i>capitis</i>	1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i>	subsp. <i>cohnii</i>	1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>		1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>	subsp. <i>hominis</i>	1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>simulans</i>		1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>		1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosum</i>		1975
<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i> *		1976
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	subsp. <i>sciuri</i>	1976
<i>Staphylococcus</i>	<i>hyicus</i> *		1978
<i>Staphylococcus</i>	<i>carneus</i>	subsp. <i>carneus</i>	1982
<i>Staphylococcus</i>	<i>auricularis</i>		1983
<i>Staphylococcus</i>	<i>caprae</i>		1983
<i>Staphylococcus</i>	<i>gallinarum</i>		1983
<i>Staphylococcus</i>	<i>lentus</i>		1983
<i>Staphylococcus</i>	<i>sacharolyticus</i>		1984
<i>Staphylococcus</i>	<i>arlettae</i>		1985

ROD	DRUH	PODDRUH	ROK objevení
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	subsp. <i>equorum</i>	1985
<i>Staphylococcus</i>	<i>kloosii</i>		1985
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> *	subsp. <i>anaerobicus</i>	1985
<i>Staphylococcus</i>	<i>chromogenes</i>		1987
<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdunensis</i>		1988
<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi</i> *	subsp. <i>schleiferi</i>	1988
<i>Staphylococcus</i>	<i>delphini</i> *		1988
<i>Staphylococcus</i>	<i>felis</i>		1989
<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi</i> *	subsp. <i>coagulans</i>	1990
<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i>	subsp. <i>ureolyticus</i>	1991
<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i>	subsp. <i>urealyticus</i>	1991
<i>Staphylococcus</i>	<i>muscae</i>		1992
<i>Staphylococcus</i>	<i>piscifermentans</i>		1992
<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>		1993
<i>Staphylococcus</i>	<i>vitulus</i>		1994
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	subsp. <i>bovis</i>	1996
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	subsp. <i>carnaticus</i>	1997
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	subsp. <i>rodentium</i>	1997
<i>Staphylococcus</i>	<i>lutrae</i> *		1997
<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>	subsp. <i>succinus</i>	1998
<i>Staphylococcus</i>	<i>condimenti</i>		1998
<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus</i>	subsp. <i>utilis</i>	1998
<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>	subsp. <i>novobiosepticus</i>	1998
<i>Staphylococcus</i>	<i>fleurettii</i>		2000
<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>	subsp. <i>casei</i>	2003
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	subsp. <i>linens</i>	2003
<i>Staphylococcus</i>	<i>nepalensis</i>		2003
<i>Staphylococcus</i>	<i>pseudintermedius</i> *		2005
<i>Staphylococcus</i>	<i>simiae</i>		2005
<i>Staphylococcus</i>	<i>pettenkoferi</i>		2007
<i>Staphylococcus</i>	<i>microti</i>		2010
<i>Staphylococcus</i>	<i>rostri</i>		2010
<i>Staphylococcus</i>	<i>devriesei</i>		2010
<i>Staphylococcus</i>	<i>massiliensis</i>		2010

* stafylokoky koaguláza ó pozitivní

1.1.1 Koaguláza-pozitivní stafylokoky

Mezi stafylokoky koaguláza-pozitivní pat í mimo jiné *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus pseudintermedius*. V humánním klinickém materiálu se vyskytují též vřdy kmeny *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (dal-ím známým poddruhem je *S.*

aureus subsp. *anaerobius*, který je původcem infekcí u ovcí). *Staphylococcus pseudintermedius* je izolován velice vzácně. Vyskytuje se obvykle u psů a dalších druhů zvířat a byl popsán prof. Hájkem z Olomouce v roce 1976. Izolován bývá právě v souvislosti s pokousáním psem (Bednář et al. 1996, Hájek 1976, Lee 1994, Petráš et al. 1998). Z hlediska patogenity má tedy pro člověka nejvýš význam *Staphylococcus aureus* způsobující mastitidu onemocnění člověka - od běžných infekcí lokálního charakteru v komunitě, po celková onemocnění spojená i se závažnými klinickými příznaky, včetně mortality u hospitalizovaných pacientů (Peleg et al. 2002).

1.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se řadí mezi biochemicky neaktivnější bakteriální druhy. Produkuje řadu komplexních látek buněčné stěny, exoenzymů a toxinů, z nichž mnohé se uplatňují jako faktory virulence. Je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic a spolu se streptokoky patří mezi nejčastější původce pyogenních infekcí nebo intoxikací člověka i zvířat (Bednář et al. 1996).

1.1.1.1.1 Morfologie

Staphylococcus aureus je grampozitivní kokus o průměru cca 1 μm. Koky jsou uspořádány typicky do shluků, v patologickém materiálu se mohou vyskytovat v párech nebo i ojedinelé. Nesporulují, jsou nepohyblivé a obvykle netvoří pouzdro (Greenwood et al. 1999).

1.1.1.1.2 Antigenní struktura.

Buněčná stěna stafylokoků obsahuje peptidoglykan, kyselinu teichoovou a protein A. Peptidoglykan účinkuje podobně jako endotoxin, podněcuje uvolňování cytokinů a makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček. Hlavní antigenní determinantou všech kmenů *Staphylococcus aureus* je skupinově specifický polysacharid A. Uplatňuje se v adhezi na sliznice. Protein A je hlavní bílkovinnou součástí buněčné stěny a společným skupinovým antigenem většiny kmenů. Jeho důležitou schopností je nespecificky reagovat s Fc-fragmentem imunoglobulinů, a tím chránit stafylokoka před opsonizací protilátkami, schopnost přilnout proti účinku

komplementu a fagocyt . Kapsulární antigeny lze prokázat u n kterých mukoidních kmen . Existují v 11 antigenních typech, v t-ina klinicky významných izolát náleží k typu 5 nebo typu 8, které brání fagocytóze (Greenwood et al. 1999, Votava et al. 2003).

1.1.1.1.3 Faktory virulence

Faktory virulence (viz tabulka . 2) lze rozd lit na povrchové a extracelulární.

Tabulka . 2: Faktory virulence *Staphylococcus aureus* (Greenwood et al. 1999)

Faktory virulence	Ú inek
1) Polymery bun né st ny	
peptidoglykan	inhibitor zán tlivé reakce
kyselina teichoová	adsorpce fágu; zásoba vázaných dvojmocných kationt
povrchové bílkoviny:	
protein A	reakce s Fc-oblastí Ig G
shlukovací faktor	vazba na fibrinogen
protein vázající se na fibronektin	vazba na fibrinogen
protein vázající se na kolagen	vazba na kolagen
2) Exoproteiny	
-lyzin -lyzin -lyzin -lyzin leukocidin Panton-Valentine	zm na permeability bun né membrány; cytotoxický ú inek na fagocyty a tká ové bu ky
epidermolytický toxin	zpuchý ení k fle
toxin syndromu toxického -oku	systémový ú inek
enterotoxiny	zvracení a pr jem
volná koaguláza	zm na fibrinogenu na fibrin
hyaluronidáza	-t pení kyseliny hyaluronové ve vazivu
stafylokináza	degradace fibrinu
lipáza	-t pení lipid
fosfolipáza	-t pení fosfolipid
deoxyribonukleáza	-t pení DNA
proteázy	-t pení bílkovin

1.1.1.1.3.1 Povrchové faktory

Mezi *povrchové* faktory patří jifl zmi ovaný peptidoglykan, protein A a pouzdro. Dal-ím povrchovým antigenem je vázaná koaguláza neboli clumping factor, která váfle fibrinogen, m ní ho na fibrin, a tím vyvolává shlukování stafylokok . Dal-í povrchové proteiny se váflou nap . na elastin, kolagen nebo fibronektin a umofl ují stafylokok m adherovat na tkán hostitele (Bene–2002, Votava et al. 2003).

1.1.1.1.3.2 Extracelulární faktory

Extracelulární faktory d líme na enzymy a toxiny. Mezi enzymy patří koagulasa, katalasa, hyaluronidasa, lipasy, nukleasy, fibrinolyzin a penicilinas. Ke stafylokokovým toxin m patří cytolyziny (hemolyziny), enterotoxiny, toxin syndromu toxického –oku a exfoliativní toxiny (Bene–2002, Votava et al. 2003).

Takzvaná volná koagulasa na rozdíl od clumping-faktoru reaguje s plasmatickým faktorem za vzniku stafylothrombinu, který katalyzuje zm nu fibrinogenu na fibrin. *Hyaluronidasa* –t pí kyselinu hyaluronovou v mezibun ném tmelu a usnad uje –í ení stafylokok ve tkáních. *Lipasy* pomáhají stafylokok m invadovat mazové flázy a podkožní tká . *Nukleasy* jsou schopné napadat jádra leukocyt . *Fibrinolyzin* fibrinové srafleniny rozpou-ťí. *Penicilinas* rozkládá ty lenný beta-laktamový kruh a inaktivuje tak beta-laktamová antibiotika (Bene– 2002, Votava et al. 2003). Stafylokokové *cytolysiny* po-kožují povrchovou membránu bun k. Alfa-hemolyzin rovn fl nazývaný alfa-toxin tvo í v t-ina kmen *Staphylococcus aureus*. Alfa-hemolyzin vyvolává na krevním agaru z ov ích erytrocyt tém úplnou beta-hemolýzu a dokonale rozpou-ťí králi í krvinky (Bene–2002, Votava et al. 2003). *Beta-hemolyzin* je sfingomyelinasa C. Pravd podobn zodpovídá i za po-kození tkání a tvorbu absces . Na krevním agaru (in vitro) má velice zajímavé ú inky. P estofle nejvíce p sobí na ov í erythrocyty, nerozpou-ťí je, ale –t pí sfingomyelin jejich membrány na ceramid a fosforylcholin. Celistvost erythrocyt z stává zachována, ale zm ní se jejich stabilita a barva. K hemolýze erythrocyt dochází afl sekundárn , nap íklad ú inkem chladu, CAMP-faktoru, equi-faktoru nebo stafylokokového delta-hemolyzinu. Antagonisticky p sobí

beta-hemolyzin v i alfa-hemolyzinu, to znamená, že beta-hemolyzin potlačuje hemolýzu vyvolanou alfa-hemolyzinem (Bene–2002, Votava et al. 2003).

Gama-hemolyzin je hemolyzin na krevním agaru neprokazatelný, protože je agarem inhibován. U stafylokokové osteomyelitidy mívají nemocní vyšší hladiny neutralizačních protilátek proti tomuto toxinu (Bene–2002, Votava et al. 2003).

Nejvýraznější na lidské erythrocyty působí *delta-hemolyzin*. Skoro všechny kmeny *Staphylococcus aureus* produkují delta-hemolyzin a i jiné druhy stafylokok tvoří stejnou nebo podobnou látku. Ve svém úniku je inhibován lipoproteiny krevního séra, a proto se mnoho kmenů stafylokoků nemůže jevit na krevním agaru jako nehemolytické. Úplná beta-hemolýza vzniká společným účinkem delta-hemolyzinu s beta-hemolyzinem na krevním agaru s ovými erythrocyty. Zvýraznění synergického působení těchto toxinů, i působení alfa-hemolyzinu na beraní erythrocyty, se dosáhne kultivací v mikroaerofilním prostředí (Bene–2002, Votava et al. 2003).

Panton v-Valentin v leukocidin se skládá ze dvou složek (LukS-PV and LukF-PV). V membránách neutrofilů a makrofágů tvoří póry a vede k lýze těchto buněk. Stafylokoky chrání před účinkem leukocytů a uplatňuje se v patogenezi vážných infekcí kůže i plicních zánětů (Tristan et al. 2009, Votava et al. 2003).

Stafylokokové *enterotoxiny (A-E, G-R)* je možné prokázat přítomností u poloviny kmenů *Staphylococcus aureus*. Stafylokokové enterotoxiny jsou vysoce termostabilní molekuly, snesou půlhodinový var a odolávají účinku trávicích enzymů. Toxiny vyvolávají průjmy a zvracení. Nejčastějším enterotoxinem u původců stafylokokových enterotoxióz je enterotoxin A. U nemocných kmenů je nejčastějším enterotoxinem enterotoxin B, který může vyvolávat pseudomembranózní enterokolitidu po antibiotické léčbě. Kmeny produkující enterotoxiny mohou být příčinou i syndromu toxického šoku (Greenwood et al. 1999, Votava et al. 2003).

Toxin syndromu toxického šoku 1 (TSST-1) je superantigenem, který zvyšuje permeabilitu v endoteliích již při nepatrných koncentracích a zesiluje letální účinek endotoxinu. Při syndromu toxického šoku zodpovídá za příznaky a multiorgánové selhání (Votava et al. 2003).

Exfoliativní toxiny, exfoliatiny neboli *epidermolytické toxiny* jsou známy ty i, nejvíce se uplatňují ET-A a ET-B. Exfoliatiny A a B jsou proteolytické a rozpouštějí

mukopolysacharidovou matrix v epidermis a způsobují tak infekci, které se říká stafylokokový syndrom opálené kůže (staphylococcal scaled skin syndrome - SSSS). Při této infekci dochází k olupování pokožky ve velkých plochách, mírnější forma infekce se projevuje jako puchýřnaté onemocnění (Beneš 2002, Votava et al. 2003).

1.1.1.1.4 Patogeneze

Staphylococcus aureus vyvolává onemocnění, která jsou nejčastěji hnisavá, například s celkovými toxickými příznaky nebo jde o otravy z potravin. Predispozicemi ke vzniku stafylokokových infekcí jsou poranění, popáleniny, operační rány, cizí tělesa (implantované pomůcky, ale i stehy), virové infekce (stafylokoková bronchopneumonie po chřipce), diabetes mellitus, malignity, imunodeficity. Benigní kožní infekce jsou časté, oproti tomu závažné stavy s postižením vnitřních orgánů a sepsí se vyskytují především u disponovaných jedinců (Votava et al. 2003).

Stafylokokové infekce se vyznačují tvorbou ohraničených zánettivých ložisek, abscesů. Absces se plní hnisem, který vzniká z rozpadlých leukocytů a bakterií, stafylokokový hnis má smetanovitou barvu a je bez zápachu. Pozdní přecitlivlost vůči stafylokokovému antigenům se podílí na vzniku příznaků u chronických stafylokokových infekcí. Někdy se může stafylokokový hnisavý proces šířit i jako flegmóna, která ale bývá způsobena streptokoky pyogenními (Votava et al. 2003).

1.1.1.1.5 Patogenita

Staphylococcus aureus se nejčastěji vyskytuje na nosní sliznici, na hrázi, v axilách a na vulvě. Asi třetina populace jsou nositeli. Nozokomiální infekce způsobené *S. aureus* bývají jednou z hlavních příčin morbidity a mortality (Murray et al. 2003, Votava et al. 2003).

Nejběžnějšími stafylokokovými infekcemi jsou hnisavá (purulentní) onemocnění kůže a jejich adnex, obecně nazývané pyodermie. Nejčastější stafylokokové pyodermie jsou impetigo, folikulitida, furunkl a karbunkl (viz tab. 3). Impetigo se vyskytuje typicky u malých dětí. Jsou to puchýřky uložené jen povrchově v epidermis, obsah puchýřků se rychle zakalí hnisem žluté barvy, pokrývající se žlutohndou krustou. Folikulitida je hnisavá infekce vlasového folikulu, která začíná v mazové žláze a projevuje se jako

flutavá pustulka se zarudlým okolím. Sycosis barbae je chronická splývající folikulitida ve vousaté části obličeje. Na oku *Staphylococcus aureus* vyvolává nejčastěji zánět mazové žlázy na okraji víčka, nazývané hordeolum (ječné zrno), a zánět víčka spojený obvykle s hnisavým zánětem spojivky (conjunctivitis). Furunkl je kožní absces vzniklý rozšířením zánětu folikulu do sousední kůže. Mnohočetné furunkly, které se vyskytují převážně na zádech, se nazývají karbunkly. Epidemiologicky významný je zánět mléčné žlázy u kojících žen. Hnisavý zánět potní žlázy se vyskytuje nejčastěji v podpaří. U některých jinak zcela zdravých jedinců mají stafylokokové pyodermie sklon probíhat opakovaně a chronicky (Beneš 2002, Votava et al. 2003).

Tabulka 3: Stafylokokové infekce (Greenwood et al. 1999)

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Pyogenní onemocnění	Onemocnění vyvolaná toxinem
furunkly	syndrom opálené kůže
karbunkly	pemphigus neonatorum
infekce rány	syndrom toxického šoku
abscesy	otrava z potravin
impetigo	
mastitida	
sepsis	
osteomyelitida	
pneumonie	

U stafylokokových sepsí není často známo primární infekční ložisko, neboť mohlo jít o zdánlivě nekodnou ranku na kůži.

Staphylococcus aureus se může krví dostat do různých tkání a orgánů a v nich mohou vznikat abscesy. Velmi nebezpečnou je akutní stafylokoková endokarditida. Vegetace, které přiléhají na srdečních chlopních narástají, se skládají ze stafylokoků obklopených mezibuněčnou hmotou. Jedná se o typ biofilmu, z kterého se uvolňují stafylokoky a jako septické vmetky jsou roznášeny po těle a vyvolávají vznik metastatických abscesů v kůži, plicích, mozku, ledvinách. Osteomyelitis neboli stafylokokový zánět kostní dřeně může vzniknout hematogenně nebo po úrazu. Pokud se vyskytuje v blízkosti kloubů, může se komplikovat hnisavou artritidou.

Běžnými stafylokokovými infekcemi respiračního traktu jsou akutní záněty vedlejších dutin nosních a plic (Votava et al. 2003).

Syndrom toxického šoku je onemocnění, které bylo objeveno v USA v roce 1980. Onemocnění může být způsobeno kmeny, produkujícími pili v místě infekce TSST-1 nebo některý z enterotoxinů. Onemocnění se vyskytuje i v souvislosti s používáním menstruačních tamponů, kdy se v pochvě, ucpané vysoce absorbujícím tamponem, vytvářejí vhodné podmínky pro pomnožení stafylokoků. Nedostatek cirkulujících protilátek proti TSST-1 je hlavním rizikovým faktorem pro vznik syndromu toxického šoku (Greenwood et al. 1999).

Hlavním klinickým a epidemiologickým problémem je v současnosti výskyt methicilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA), které se začaly významně šířit v 80. letech 20. století. Problém methicilinové rezistence spoívá v obtížné léčitelnosti infekcí, protože kmeny MRSA mají rezistenci i k ostatním širokospektrálním antibiotikům, a včetně i k makrolidům, linkosamidům, aminoglykosidům, chloramfenikolu, chinolonům a tetracyklinu (Murray et al. 2003).

1.1.2 Koaguláza-negativní stafylokoky

Koaguláza-negativní stafylokoky tvoří hlavní část normální mikroflóry sliznice a kůže člověka, a mohou se uplatnit i jako oportunní patogeny. Nejčastějším a nejdělejší druhem koagulázanegativních stafylokoků je *Staphylococcus epidermidis*, méně častými jsou *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis* a *Staphylococcus warneri*. *Staphylococcus hominis* ssp. *novobioceticus*, poddruh *Staphylococcus hominis* rezistentní k novobiocinu, který je mnohem vzácnější než běžný poddruh *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis*. U člověka se vyskytují asi dvacetiny všech popsaných KNS a jejich zastoupení je velice nerovnoměrné (Petráková 1999, Votava et al. 2003). Z dalších druhů KNS rezistentních k novobiocinu je významný *Staphylococcus saprophyticus* ssp. *saprophyticus*, který je primárním uropatogenem. Další novobiocin rezistentní druhy viz tabulka 4.

Tabulka . 4: Novobiocin rezistentní druhy KNS (Petrá–2010)

Druhy rezistentní k novobiocinu
<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>saprophyticus</i>
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>
<i>S. xylosum</i>
<i>S. lentus</i>
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>ureolyticus</i>
<i>S. vitulinus</i>
<i>S. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>
<i>S. sciuri</i> ssp. <i>sciuri</i>

1.1.2.1 Mikroskopie

Základním diagnostickým barvením užívaným v bakteriologii je metoda barvení dle Grama. Barvením dle Grama je možné bakterie rozdělit na dvě základní taxonomické skupiny:

É bakterie grampozitivní (G+)

É bakterie gramnegativní (G-)

Rozdělení mikroba podle barvitelnosti dle Grama není samou o sobě, ale odráží řadu anatomických a fyziologických vlastností mikroba, včetně jejich citlivosti na různé antibiotika.

Podstatou rozdílů v barvitelnosti dle Grama je rozdílná stavba bakteriální stěny. Při barvení vzniká v bakteriální buňce komplex krystalové violeti s jódem, který se u gramnegativních bakterií snadno vyplavuje alkoholem nebo acetonem, u grampozitivních bakterií odbarvení po určité době vzdoruje. Avšak při delším působení alkohol a zejména aceton nebo metanol mohou odbarvovat i grampozitivní bakterie (Votava et al. 2000).

Jednotlivé KNS nejsou mikroskopicky rozlišitelné, záleží na stavbě kultury (Votava et al. 2003).

1.1.2.2 Kultivace p ůd a morfologie koloniů

Na b ůlnůch kultiva nůch p ůdůch (na krevnům agaru) rostou n kterů KNS v pom rn velkůch koloniůch, jinů v drobnůch koloniůch. Kolonie jsou pigmentovůny bůle nebo blede-ůd , u n kterůch kmen můvajů kolonie porcelůnov bůle zbarvenů (*Staphylococcus epidermidis*). *Staphylococcus haemolyticus* bůvů bůlů, ale m fle r st i v nafloutlůch koloniůch, obklopenůch hemolůzou a neodli-itelnůch od *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus pasteurii* a *xylosus* majů flut pigmentovanů kolonie (Votava et al. 2003).

Pro *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* ssp. *novobiosepticus* a *Staphylococcus lugdunensis* je typicků tvorba hemolyzinu, kterů je dosti blůzků hemolyzinu delta u *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus pseudintermedius* a oba poddruhy *Staphylococcus schleiferi* produkujů stafylokokovů beta-hemolyzin, kterů se poznů dle ůchladovůho efektu ů po ulofnůnů kultiva nůch p ůd do chladni kovů teploty nebo i del-ům ponechůnů p i pokojovů teplot (Votava et al. 2003).

1.1.2.3 Druhovů identifikace

Druhovů identifikace KNS humůnnůho p vodu je zalofnů jednak na r znůch biochemickůch znacůch, a jednak na zji-t nů citlivosti k novobiocinu. Mezi d leflitů biochemicků znaky pat ů-t penů mannitolu, mo oviny, trehalosu, sacharosu, xylosu, ornithinu a tvorba acetoinu, glukosidasy a pyrrolidonylarylamidasy. Zůkladem identifikace stafylokok kome r nůmi soupravami je prův kombinace t chto a dal-ůch test . Dnes jsou ale k dispozici i novů rychlů modernů metody ō identifikace pomoců hmotnostnů spektrometrie a identifikace pomoců analůzy DNA, kterů je dnes zlatům standardem pro za azenů bakteriů do druhu (Votava et al. 2003).

1.1.2.4 Patogeneze

Jako potenciůlnů faktory virulence zůstupce KNS, *Staphylococcus epidermidis*, byly ozna eny peptidoglykan a receptor pro transferin. Peptidoglykan vyvolůvů uvoln nů TNF- , IL-1 a IL- 6 z monocyt . Jako nejd leflit j-ů adhesin byl popsůn kapsulůrnů polysacharid ō adhesin (PS/A), dal-ůmi adhesiny jsou kyselina teichoovů adherujůců na

aktivované trombocyty, stafylokokové povrchové proteiny SSP-1 a SSP-2, fibrinogen vázající protein a autolyzin E. Ve tvorbě zralého biofilmu se angažují především polysacharidový intercelulární antigen (PIA), s akumulací spjatý protein (AAP), se slizem asociovaný antigen (SSA) a extracelulární slizová substance (EES). *Staphylococcus saprophyticus*, povodce močových infekcí zpravidla u mladých žen, má zase na povrchu struktury, jimiž adhezuje na fibronektin a na epitelie močových cest a tyto pak pokračuje enzymem ureasou (Beneš 2002, Votava et al. 2003).

Koaguláza - negativní stafylokoky vyvolávají u zdravých lidí infekci jen vzácně, v tísnu k tomu jako oportunní patogeny vyžadují určité podmínky. Přesto i tyto stafylokoky mohou vyvolat závažná onemocnění. Mezi osoby predisponované k infekcím vyvolaným koaguláza-negativními stafylokoky patří nemocní se zavedenými i implantovanými pomůckami, imunokompromitovaní jedinci a nezralí novorozenci s nevyvinutým opsonofagocytárním systémem a neutropenií a intravenózní narkomani závislé na heroinu (Votava et al. 2003).

Mezi implantované pomůcky, které se nejčastěji stávají zdrojem infekce, patří intravenózní katetry a vstupy (flexily, porty), cévní protézy, umělé srdce ní chlopně, likvorové spojky (shunty), kardiostimulátory (pacemakery) a jejich vývody, katetry k peritoneální dialýze, permanentní močové katetry a pomůcky z kovu a kloubní protézy, ortopedické šrouby, fixační pomůcky. Intravenózní katetr může být kolonizován z kůže podél zevního povrchu katétru, kontaminací vstupu do katétru s následnou migrací stafylokoků skrze lumen nebo během bakteriémie ze vzdáleného ložiska. Stejně jako u cévních katétrů, i na dalších umělých pomůckách pacienta, může dojít k jejich kolonizaci hematogenně i klinicky nevýznamné bakteriemi. Ke kontaminaci umělých srdce ní chlopní, kloubních protéz i likvorových shuntů KNS dochází především během operačních výkonů. V uchycení na umělých površích hraje zásadní roli tvorba biofilmu. Následný infekční proces probíhá obvykle pomalu a poměrně indolentně, výraznější příznaky se dostavují až po mnoha měsících (Votava et al. 2003).

1.2 Obecné zásady odběru a transportu materiálu na mikrobiologické vyšetření

Cílem mikrobiologického vyšetření je prokaz mikroorganismů ve vzorcích klinického materiálu, a rychlá a přesná identifikace bakteriálních izolátů, která je důležitá v indikovaných případech a popis stanovení jeho citlivosti k antimikrobiálním látkám. Mikrobiolog by měl zhodnotit význam nálezu daného mikroba a posoudit, zda se jedná o etiologické agens, nebo zda je prokázáný mikrob součástí běžné mikroflóry, či je nález jen důsledkem neřádné kontaminace. Velmi významným předpokladem úspěšnosti a smysluplnosti mikrobiologického vyšetření je správná volba druhu odebíraného materiálu. Důležitým je zároveň i správný způsob odběru vzorku, a to z důvodu nebezpečí kontaminace vzorku běžnou mikroflórou z okolí místa odběru nebo mikroby ze zevního prostředí. Neméně jsou důležité i správné podmínky transportu vzorku, které zajistí kvalitu vzorku a zabrání jeho znehodnocení ve smyslu falešné negativity vzorku nebo změny proporciálních poměrů bakterií ve vzorku (Votava et al. 1998).

1.2.1 Odběr materiálu

Vzorek pro bakteriologické vyšetření je nutné odebrat před zahájením antimikrobiální léčby. Pokud byla léčba již zahájena, je nutné uvést používaná antimikrobiální léčiva v řádance na vyšetření. Odběr by měl být proveden z místa právě probíhajícího infekčního procesu a odpovídající uvedené klinické diagnóze. Odběr by měl být proveden správnou technikou v dostatečném množství do vhodné, sterilní odběrové soupravy. Tkáň a tekutý materiál jsou vhodnější než sliznice a výtoky, zejména při požití na anaerobní kultivaci. Aerobní i anaerobní kultivace se provádí z jednoho vzorku. Sliznice a výtoky odebírat za použití odběrového tampónu s transportním médiem, které zajistí podvodní kvantitativní složení vzorku bez přerůstání rychleji rostoucích, často kolonizujících nebo kontaminujících bakterií. Správně odebraný vzorek by měl být urychleně transportován do laboratoře, kde je zpracován pomocí standardních metod, které vedou k izolaci etiologického agens infekce.

Je-li infekční onemocnění provázeno celkovými známkami infekce (horečka, zvýšený počet leukocytů a dalších markerů zánětu, atd.) je důležitou součástí diagnostiky kultivace krve v hemokultivačních lahvičkách.

Odběr krve na hemokulturu se provádí u pacientů se septickým stavem. Samotný odběr krve na hemokulturu musí být proveden lege artis, jinak může dojít k tomu, že výsledek bude falešně pozitivní nebo negativní a mohlo by tak dojít k poškození pacienta. Krev musí být odebrána za přísného dodržení zásad asepse.

Počet odběrů na hemokulturu by měl být minimálně dva, nejlépe tři odběry, a lépe alespoň v hodinových intervalech, nejlépe najednou. Krev je nutno odebírat před nasazením antibiotik, pokud je pacient již léčen, je potřeba krev odebrat těsně před podáním další dávky antibiotik (Votava et al. 1998, Votava et al. 2010).

1.2.2 Laboratorní diagnostika

Kultivace prokaz koaguláza a negativních stafylokoků vzhledem k jejich nenáročnosti není zvláštní problémy. Podrobná identifikace KNS je v současnosti nutná u izolátů z krve a dalších za normální situace sterilních míst (likvor). Jako základní test k rozlišení od koaguláza a pozitivních stafylokoků je využívána komerční souprava k prokazu plazmakoagulázy a následně biochemická identifikace. To v taktu umožňuje zařadit kmen do příslušného taxonu. V současné době se k identifikaci koaguláza a negativních stafylokoků využívá i hmotnostní spektrometrie technologií MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry; Petráš 2000, Votava et al. 2003).

1.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) umožňuje stanovení aminokyselinové sekvence specifických cílových proteinů, ale v rutinní laboratorní praxi je zaměřena především na identifikaci bakteriálních druhů (Carbonnelle et al. 2007, Glowalla et al. 2009).

Hmotnostní spektrometrie obecně je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Dosavadní způsoby ionizace a detekce umožňovaly analyzovat látky jen s nízkou molekulovou hmotností. Po dvou desetiletích výzkumu bylo zjištěno, že ke generování iontů látek s vyšší molekulovou

hmotností, je laserem zapotřebí zajistit efektivní a kontrolovatelný přenos energie na vzorek a zároveň zamezit jeho tepelnému rozkladu. Obě podmínky jsou splněny, pokud molekula rezonančně absorbuje energii vlnové délce laseru a tedy energie fotonu laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly a tím i k její ionizaci, a pokud se přenos energie děje ve velmi krátkém čase, řádově v jednotkách až desítkách nanosekund (Havliček 1999).

Molekuly vzorku jsou ionizovány laserem přímo, v důsledku se však stávají neřízeným způsobem. Z toho důvodu se začala používat matrice. Při přenosu ionizační energie laseru na molekuly vzorku přes matrici, je zabráněno jejich ztrátě. Ionizace laserem přes matrici umožňuje měřit jiné molekulové hmotnosti v téže vzorku. Ke stanovení vybraných molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vypočítat rychlost částice (Havliček 1999).

Při identifikaci je prováděna analýza vzorku (část bakteriální kolonie) přes vrstvenou matrici. Matrice absorbuje laserové světlo a za vzniku elektrického náboje se spolu se vzorkem odpaří (dojde k ionizaci). Extrahované částky zajišťují vysokonapávaná elektrická pole, které ionizované částice urychlují směrem vzhůru, do vakuové trubice, kde dochází k jejich rozdělení podle hmotnosti a doby letu (menší a šlehčí molekuly letí rychleji než větší). Výsledky jsou zobrazeny ve formě křivek (pík), které odpovídají známým fragmentům peptidních molekul ve vzorku. Spektra jsou porovnávána s databází spekter známých druhů bakterií a jsou nabídnuty výsledky o druhu a poddruhu mikroorganismu, kterými může vzorek být a procentuální pravděpodobnost (spolehlivost identifikace). Zaznamenaný signál je softwarově zpracován a prezentován jako graf intenzity v závislosti na hmotnosti v Daltonech (Da). (bioMérieux S.A., 2011).

Hlavním přínosem MALDI-TOF MS technologie pro mikrobiální identifikaci je možnost získat identifikaci pomocí jediné kolonie, což eliminuje potřebu subkultury a další inkubaci (Anderson et al. 2012, bioMérieux S.A. 2011, Garcia et al. 2012, Cherkaoui et al. 2010, Nagy et al. 2011).

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnocení souasných možností laboratorní diagnostiky stafylokokových infekcí a porovnání různých metod užívaných k podrobné identifikaci koagulázanegativních stafylokoků v rutinní praxi v Laboratorii lékařské mikrobiologie, Pracovišti bakteriologie v Nemocnici České Budjovice a.s.. Tato bakalářská práce se primárně zabývá koagulázanegativními stafylokoky (KNS).

3. Metodika

Identifikace stafylokok byla prováděna v Laboratorii lékařské mikrobiologie na Pracovišti bakteriologie v Nemocnici České Budějovice a.s.. Diagnostika stafylokokových infekcí byla prováděna pomocí mikroskopického vyšetření a kultivace odebraných vzorků na neselektivních i selektivních pevných médiích.

Základní rozlišení stafylokok koaguláza - pozitivních a - negativních bylo prováděno na základě výsledků latexové aglutinace. Následně byla u 52-ti kmenů stafylokok koaguláza-negativních (STKN) provedena druhová identifikace. Kmeny STKN byly izolovány z centrálních filních katétrů (CfK), hemokultur a jiných klinicky závažných materiálů. Druhová identifikace všech 52 kmenů STKN byla prováděna biochemickou identifikací STAPHYtestem 16 (fa. Erba Lachema) a paralelní hmotnostní spektrometrií pomocí technologie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry; systém VITEK MSTM, fa. bioMérieux).

3.1 Mikroskopie

Na Pracovišti bakteriologie byl u všech tekutých vzorků, srať a hemokultur zhotoven mikroskopický preparát barvený dle Grama.

Jedna až dvě kapky tekutého materiálu byly přeneseny na podlovní sklíčko a byly vytvořeny rovnoměrný tenký roztěr. Následně byl roztěr ponechán do zaschnutí a ofixován nad plamenem. V případě srať nebo výtěrů na odběrovém tamponu bylo tamponem rolováno po podlovním skle tak, aby nedošlo k destrukci celulárních elementů, a poté byl preparát fixován nad plamenem.

Manuální barvení preparátu:

- přeuvrštění fixovaného preparátu krystalovou violetí (20 sekund)
- preelití Lugolovým roztokem (20 sekund)
- odbarvení alkoholem (dokud stále odtéká zbarvení)
- opláchnutí vodou
- barvení karbolfuchsinem (1 minuta)
- opláchnutí vodou a sušení

Na pracovišti PBAK byl k barvení používán automatický barvicí systém MIRASTAINER II. Postup barvení byl zachován.

Po dokonění barvení byly preparáty vyhodnoceny pod mikroskopem. Jako grampozitivní byly identifikovány bakterie, které jsou v preparátu zbarveny modře, jako gramnegativní bakterie zbarvené červeně.

V mikroskopickém preparátu, barveném podle Grama jsou stafylokoky viditelné jako grampozitivní koky, vyskytující se jednotlivě, v párech i v nepravidelných shlucích.

3.2 Kultivace

Stafylokoky rostou na běžných kultivačních půdách. Ke kultivaci odebraných klinických vzorků v PBAK bylo používáno neselektivní médium CSB (krevní agar s 5 % beraní krve, fa. BIO-RAD) nebo selektivní půda pro záchyt grampozitivních bakterií CNA (Columbia agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou fa. BIO-RAD).

Pevné půdy byly inkubovány 18 - 24 až 48 hodin při 36 ± 1 °C v termostatu, nárost STKN byl pozorován jako okrouhlé kolonie o průměru 2-3 mm, s hladkým lesklým povrchem. Kolonie byly nepřehledné, většinou pigmentované (zlatoflut, béžové, smetanově bílé).

3.2.1 Kultivace hemokultur

Krev je kultivována v uzavřeném automatickém systému v tzv. hemokultivačních nádobkách (hemokulturách) při 36 ± 1 °C. K jejich inkubaci je používán automatický systém, který umožňuje nepřetržitě sledování růstu bakterií, což umožňuje rychlé informování klinických lékařů o jejich pozitivitě (La Scola et al. 2009).

Na Pracovišti PBAK je používán automatický hemokultivační systém BacT/ALERT 3D (fa. bioMérieux), který je připravený pro zakládání hemokultivačních lahví za 24 hodin. Princip detekce je založen na kolorimetrické detekci oxidu uhličitého (CO₂). V automatickém systému se projeví růst mikroorganismů zvýšením tenze CO₂ v hemokultivační lahvičce, systém na tuto změnu reaguje optickým a akustickým signálem obsluze. Lahvičky jsou označeny štítkem s identifikačními údaji pacienta (SOP). V případě

jejich pozitivita byly lahvičky vyjmuty z přístroje BacT/ALERT 3D. Z média pozitivní hemokultury byl připraven mikroskopický preparát, který byl barven dle Grama (viz výše). Médium z hemokultury poté bylo naočkováno na vhodné pevné kultivační prostředí (neselektivní krevní agar s 5% beraní krve a selektivní MacConkeyho agar pro gramnegativní bakterie). Kultivace pevného média probíhala 18 až 24 hodin při 36 ± 1 °C v termostatu. Po této době byl hodnocen nárost na kultivačních médiích, provedena identifikace izolovaných kultur a stanovení testu citlivosti k antibiotikům.

3.2.2 Kultivace centrálních filních katétrů

Distální centrální filní katétrů (CfiK) o velikosti 5 cm byly asepticky odebrány do sterilních zkumavek a bezprostředně transportovány do laboratoře ke kultivaci. Zde jsou katétrů kultivovány za použití metody dle Makiho (Maki et al. 1977, Patil et al. 2011).

Vzorky byly inokulovány na doporučená základní pevná média a byly kultivovány s cílem zachytu suspektních kolonií patogenů.

Katétrů byly za použití sterilní pinzety sterilně přeneseny na pevnou kultivační prostředí CSB. Následně byla kanylka opakovaně rolována po povrchu média za pomoci sterilní pinzety a sterilně přenesena a zcela ponořena do tekuté pomnožovací prostředí (thioglykolátová pomnožovací prostředí, Dulab). Kultivační prostředí byly inkubovány při teplotě 36 ± 1 °C, 18-24 až 48 hodin aerobně v termostatu.

Po inkubaci bylo provedeno semikvantitativní hodnocení kultivace. V případě nálezu suspektního prostředí byla provedena identifikace (Isenberg 2007).

3.2.3 Kultivace tekutého materiálu a výtěrů

Materiál byl do laboratoře transportován ve sterilních transportních nádobkách a na výtěrových tamponech (suchá výtěrka, sterilní tampón v transportní prostředí). Vzorky byly inokulovány na doporučená základní, selektivní a selektivně-diagnostická média.

U tekutého materiálu (punktáty, hnisy) byla posuzována konzistence vzorku. Serózní (průhledný) materiál byl centrifugován 3 minuty při 2500 otáčkách, supernatant odsán do sterilní skleněné zkumavky (ve zkumavce se sedimentem bylo ponecháno cca 0,5-1

ml supernatantu) a ponechán pro event. dodatečné testy. Sediment byl resuspendován ve zbývajícím supernatantu a inokulován na kultivační pody pro aerobní a anaerobní kultivaci-pevné pody (CSB, MacConkey agar, Schaedler agar - fa. BIO-RAD) a tekuté pomnožovací pody (thioglykolátová pomnožovací poda, anaerobní pomnožovací poda s parafínem ó fa. Dulab).

Purulentní (vazký) materiál byl inokulován přímo, bez centrifugace na kultivační pody. Kultivační pody byly inkubovány při teplotě 36 ± 1 °C, 18-24 a 48 hodin aerobně a 42-48 hodin při teplotě 36 ± 1 °C anaerobně v termostatu.

Výtřiky/střiky byly inokulovány na pevné kultivační pody (CSB, MacConkey agar) a tekutou pomnožovací pody (thioglykolátová pomnožovací poda). Kultivační pody byly inkubovány při teplotě 36 ± 1 °C, 18-24 a 48 hodin aerobně v termostatu.

U všech materiálů byl zhotoven mikroskopický preparát (viz 3.1).

Po inkubaci bylo provedeno hodnocení kultivace. V případě nálezu suspektního patogenu byla provedena identifikace příslušnými metodami (Isenberg 2007).

3.3 Identifikace

K základní identifikaci bylo využíváno zhodnocení morfologie kolonií na pevných podacích, produkce katalázy a latexová aglutinace.

3.3.1 Kataláza

Kataláza slouží k základnímu odlišení od streptokoků a enterokoků. Enzym kataláza rozkládá peroxid vodíku (H_2O_2) na vodu (H_2O) a plynný kyslík (O_2). Projevem pozitivní reakce je bublání uvolněného kyslíku.

Streptokoky, enterokoky a stafylokoky mohou mít někdy podobnou makroskopickou morfologii. Stafylokoky jsou kataláza pozitivní, zatímco streptokoky a enterokoky jsou kataláza negativní. Katalázu netvoří pouze jediné dva striktně anaerobní stafylokoky a to *Staphylococcus saccharolyticus* a *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius* (Petráček 2000).

K provedení testu byl používán 3% roztok H_2O_2 , který byl připraven zředěním koncentrovaného 30% peroxidu vodíku destilovanou vodou v poměru 1:10. Na podložní

sklí ko byly p eneseny narostlé kolonie testovaného kmene a zakápnuty 3% roztokem H₂O₂.

3.3.2 Rozli-ení stafylokok koaguláza - pozitivních a stafylokok koaguláza - negativních

Ke zji-t ní produkce vázané koagulázy latexovou aglutinací byl pouffíván PROLEX™ STAPH LATEX KIT (fa. PRO-LAB Diagnostic). Tento test umohl uje rozli-ení stafylokok koaguláza - pozitivních a koaguláza - negativních.

Principem testu je detekce vázané koagulázy, tzv. clumping faktoru, proteinu A a kapsulárního polysacharidu *Staphylococcus aureus*. Na latexových ásticích jsou navázané specifické monoklonální protilátky, a v p ítomnosti homologního antigenu dochází k aglutinaci latexových partikulí (SOP).

Na testovací kartu byla kápnuta kapka latexové suspenze Staph Test Latex Reagent. Jednorázovou kli kou bylo p eneseno n kolik kolonií testovaného kmene a smícháno s kapkou latexu. Suspenze byla krouffivým pohybem promíchávána p íblifn 10 sekund a homogenizována jemným kýváním a rotací karty. Výsledek byl viditelný do 30 sekund. V p ípad pozitivní reakce byla provád na negativní kontrola, kterou bylo mofné odli-ít spontánn aglutinující kmeny a kmeny koaguláza ó pozitivní.

P í pozitivní reakci do-lo b hem 30 sekund od za átku homogenizace suspenze k vytvo ení aglutinátu. Kmen koaguláza - pozitivní neaglutinuje s negativní kontrolou.

P í negativní reakci nedo-lo k vytvo ení aglutinátu.

3.3.2.1 Druhová identifikace stafylokok koaguláza - negativních

3.3.2.1.1 Biochemická identifikace

Biochemická identifikaci stafylokok byla provád na pomocí soupravy STAPHYtest 16 (fa. Erba Lachema). Souprava je vyuffívána k identifikaci bakterií rodu *Staphylococcus* a ostatních grampozitivních kataláza pozitivních kok . Soupravu STAPHYtest 16 je mofné vyuffít k identifikaci -edesáti kmen pomocí -estnácti biochemických test . T chto -estnáct biochemických test je umíst no v jamkách mikrotitra ní desti ky ve

dvou řadách po osmi jamkách. Dalšími testy, kterými bylo možné doplnit identifikaci, byl prkaz tvorby acetoinu (VP test), pyrrolidonylarylamidázy (PYRA test) a oxidázy (OXI test; Lachema 2011).

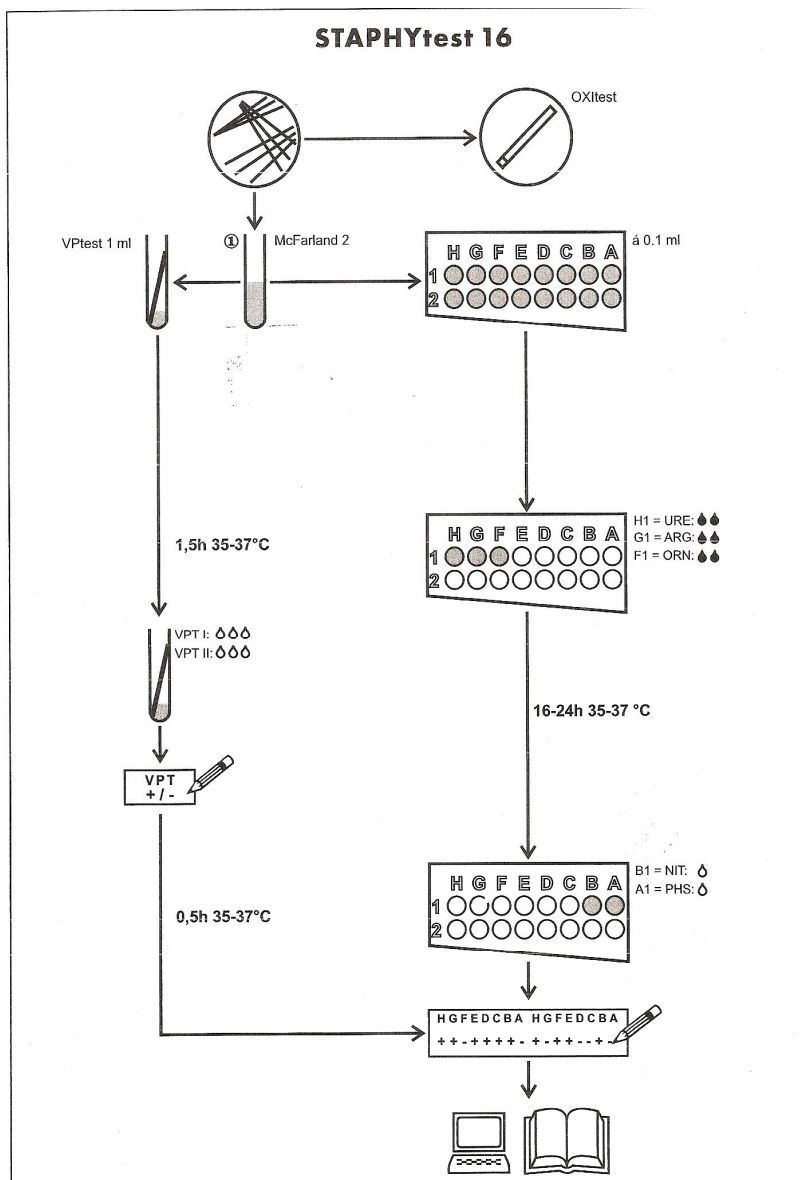
K testování byla použita čistá kultura kmene STKN. Někdy bylo možné k testování použít i primokulturu, v případě smíšených primokultur byla nejprve provedena izolace na krevní agar (CSB). Čistá kultura byla testována na prkaz produkce katalázy (viz výše). Pokud byl test pozitivní, grampozitivní, kataláza pozitivní koky byly identifikovány soupravou STAPHYtest 16.

Z čisté 24 hodin staré kultury byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o hustotě 2 stupně McFarlanda. Pokud by nebyla suspenze doporučené denzity, mohla by vést k chybné identifikaci kmene. Pro ověření čistoty inokula bylo stejnou kličkou, kterou byla připravena suspenze, provedeno rozokování na krevní agar (CSB). Agar byl inkubován v termostatu při 36 ± 1 °C. Čistota kultury byla posuzována po 24 hodinách inkubace.

Připravená suspenze testovaného kmene byla před inokulací důkladně homogenizována.

- 0,1 ml suspenze byl inokulován do jamek příslušných dvou řad v destičce sloufčících k testování 1 kmene (viz obrázek 1) při inokulaci bylo dbáno na to, aby nedošlo ke kontaminaci sousedních jamek)

Obr. . 1: Schéma inokulace



● = Parafinový olej - Paraffin oil - Пар.масно - Olej parafinowy - Paraffinolaj - Paraffinöl - Aceite de parafina
 △ = Činidlo - Reagent - Реактив - Odczynnik - Reagens - Reagenzmittel - Reactivo
 ① = Fyziologický roztok - Saline - Физиологический - Roztworze fizjologiczny - Fiziológias sóoldatban - Physiologische Lösung - Solutiön fiziologica salina

- k jamkám H, G, a F prvé ady (testy ureáza, arginin a ornithin) byly p idány po inokulaci 2 kapky sterilního parafinového oleje
- do zbytku suspenze o hustot 2 stup McFarlanda (1 ml suspenze) ve zkumavce byl vlofen proufek VP testu

- byl proveden diskový test citlivosti na novobiocin pro rozlišení rodů a druhů stafylokoků a mikrokoků
- reakce s naočkovanými biochemickými testy byl vložen do inkubačního sáčku
- STAPHYtest 16 i zkumavky s VP testem byly vloženy do termostatu, VP test byl inkubován 1,5 hod., dle pokynů 24 hodin při teplotě 36 ± 1 °C.
- po 1,5 h inkubaci byla hodnocena reakce ve zkumavce s proufkem VP testu
 - do zkumavky bylo přidáno po 3 kapkách inidla pro VPT I a inidla pro VPT II, obsah zkumavky byl řádně homogenizován a inkubuje dalších 30 minut při 36 ± 1 °C
 - po uplynutí doby inkubace byla VP reakce odečtena.

Při hodnocení STAPHYtestu 16 byla použita barevná srovnávací stupnice, případně tabulka s interpretací reakcí v návodu výrobce, nebo barevné reakce kontrolních kmenů.

- po 24 hodinách inkubace byly jamky zakapány inidly
 - do jamky B (Nitráty) 1 kapka inidla pro NIT
 - do jamky A (Fosfatáza) 1 kapka inidla pro PHS
- všechny odečtené testy a výsledky byly zapsány do formuláře pro záznam výsledků (viz obrázek 2) a byla vyhodnocena identifikace.

Obr. . 2 Formulá pro záznam výsledk STAPHYtest 16

MIKROTEST®		Datum/Dátum/Date/Дата	Zprac./Sprac./Ref./Идент. провев	Erba Lachema s.r.o. Karásek 1d 621 33 Brno, CZ												
STAPHYtest 16																
Kmen č./Kmeň č./Strain No./Но. анализа		Poznámky/Notes/Отметки														
31976		10.		✓ 127												
STAPHYtest 16																
Řádek/Riadok/Strip/Стрип 1								Řádek/Riadok/Strip/Стрип 2								
VPT	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
	URE	ARG	ORN	bGA	GLR	ESL	NIT	PHS	GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	3		2		6			3		4		3				
Profil/Profile/Профиль																
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты								Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация								
								327 mykon								
11/10																

MIKROTEST®		Datum/Dátum/Date/Дата	Zprac./Sprac./Ref./Идент. провев	Erba Lachema s.r.o. Karásek 1d 621 33 Brno, CZ												
STAPHYtest 16																
Kmen č./Kmeň č./Strain No./Но. анализа		Poznámky/Notes/Отметки														
K 2371		J.		124												
STAPHYtest 16																
Řádek/Riadok/Strip/Стрип 1								Řádek/Riadok/Strip/Стрип 2								
VPT	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
	URE	ARG	ORN	bGA	GLR	ESL	NIT	PHS	GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	3		3		2			7		4		3				
Profil/Profile/Профиль																
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты								Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация								
								524 mykon								
11/10																

Identifikace byla prováděna pomocí Diagnostického seznamu pro STAPHYtest 16. Při identifikaci byla posuzována kultura komplexně. Byl hodnocen charakter kolonií, pigmentace, hemolýza, mikroskopie, p vod izolátu, další znaky.

Interpretace výsledků byla prováděna dle identifikační tabulky (viz tab. 5).

Tabulka 5: Interpretace výsledků STAPHYtest 16 (fa. Erba Lachema s.r.o)

Sloupec	Test	Zkratka testu	Reakce	
			pozitivní	negativní
Řádek 1				
H	Ureáza	URE	červenofialová, oranžovočervená	žlutá, světle oranžová
G	Arginin	ARG	červenofialová, červená	žlutá, světle oranžová
F	Omitin	ORN	červenofialová, červená	žlutá, světle oranžová
E	β -Galaktozidáza	bGA	žlutá, světle žlutá	bezbarvá, zákal suspenze
D	β -Glukuronidáza	GLR	žlutá, světle žlutá	bezbarvá, zákal suspenze
C	Eskulin	ESL	černá, tmavě hnědá	bezbarvá, nahnědlá
B	Nitráty	NIT	tmavě červená, červená	bezbarvá, narůžovělá
A	Fosfatáza	PHS	červenofialová	bezbarvá, světle růžová
Řádek 2				
H	Galaktóza	GAL	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
G	Sacharóza	SUC	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
F	Trehalóza	TRE	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
E	Mannitol	MAN	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
D	Xylóza	XYL	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
C	Maltóza	MLT	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
B	Mannóza	MNS	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
A	Laktóza	LAC	žlutá, žlutohnědá	fialová, šedofialová
VPtest	Acetoin	VPT	červená, růžová	bezbarvá, mírně narůžovělá
OXItest	Oxidáza	OXI	modrá	bezbarvá
PYRAtest	Pyrolidonylarylamidáza	PYR	červená, oranžová	žlutá

3.3.2.1.2 *Identifikace hmotnostní spektrometrií o technologie MALDI- TOF*

Mikrobiální identifikace metodou MALDI TOF MS se skládá ze čtyř kroků: 1) získání čerstvé kultury, 2) analýza hmotnostního spektra, 3) srovnání výsledného spektra s internetovou databází, 4) vyhodnocení výsledku.

Pro identifikaci v t-iny izolát byla vybrána z pevných kultivačních médií jedna kolonie a pomocí jednorázové kličky nanášena přímo do terčíku na nosič. Na pracovišti PBAK je používán hmotnostní spektrometr VITEK MSTM (fa. bioMérieux), pracující metodou MALDI TOF, který umožňuje analyzovat až 144 vzorků v jedné analýze (Anderson et al. 2012, bioMérieux S.A. 2011, Garcia et al. 2012, Cherkaoui et al. 2010, Nagy et al. 2011).

Obr. 3 Pístroj MALDI TOF VITEK MSTM fa. bioMérieux (Zdroj: autorka)

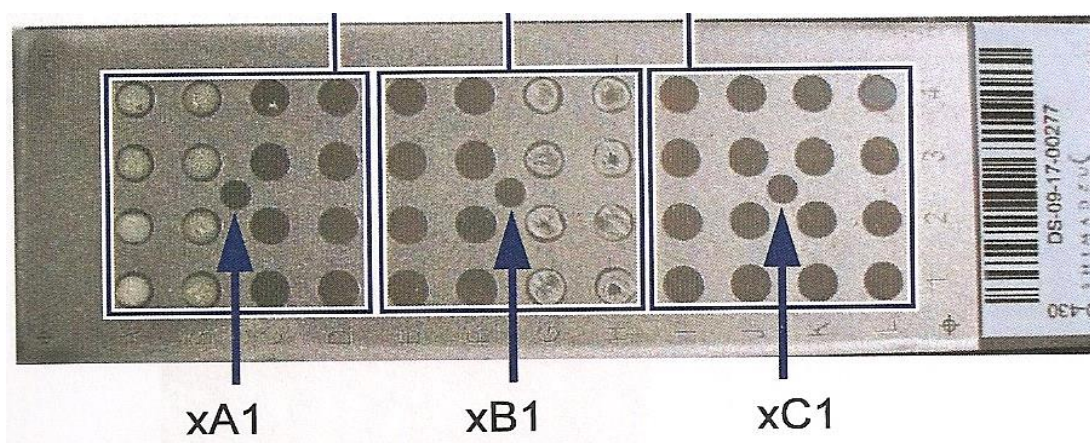


Kmeny STKN z primokultur nebo subkultur byly izolovány na krevním agaru. Vzorky k m ení byly izoláty z erstvé kultury inkubované maximáln 72 hodin.

K m ení na hmotnostním spektrometru VITEK MSTM byla krom erstvé kultury m eného vzorku nutná i erstvá kultura kalibra ního kmene *Escherichia coli* ATCC 8739, který bylo pot eba inkubovat 18 ó 24 hodin na CSB p i teplot 36±1 °C.

Jako nosi byl poufíván jednorázový nosi VITEK MS ó DS se 48 pozicemi na vzorky. Každý nosi obsahoval t i m ící skupiny po 16 pozicích, uprost ed každé m ící skupiny byla jedna pozice ur ena pro kalibrátor, kam byla aplikovaná erstvá kultura kalibra ního kmene *Escherichia coli* ATCC 8739 (pozice kalibrátoru xA1, xB1, xC1, viz obr. . 4). Tyto t i pozice sloufily pro kalibraci.

Obr. . 4: P íprava nosi e (bioMérieux S.A., 2011)

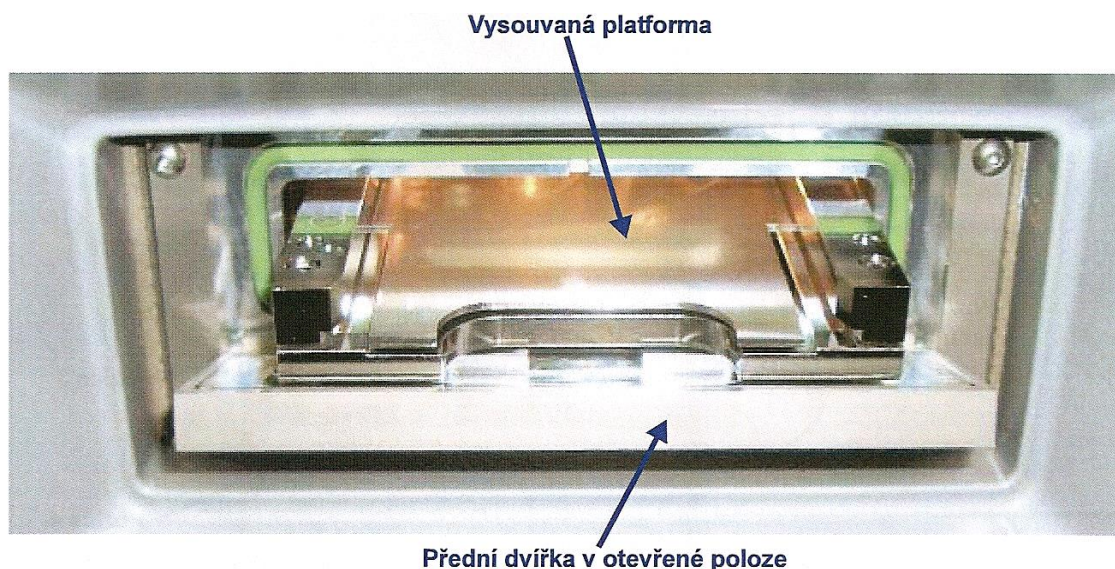


Kalibrovanou kli kou o objemu 1 l byla nabrána ást testované kolonie kmene STKN (vzorek) a aplikována do st edu pozice. Vzorek byl rozet en rovnom rn po celé plo-e testovací pozice.

Na pozici se vzorkem byl následn aplikován 1µl matri ního roztoku HCCA (kyseliny -kyano-4-hydroxy-sko icové). Po zaschnutí vzork na nosi i byl nosi (viz obr. . 4) zalofen do systému.

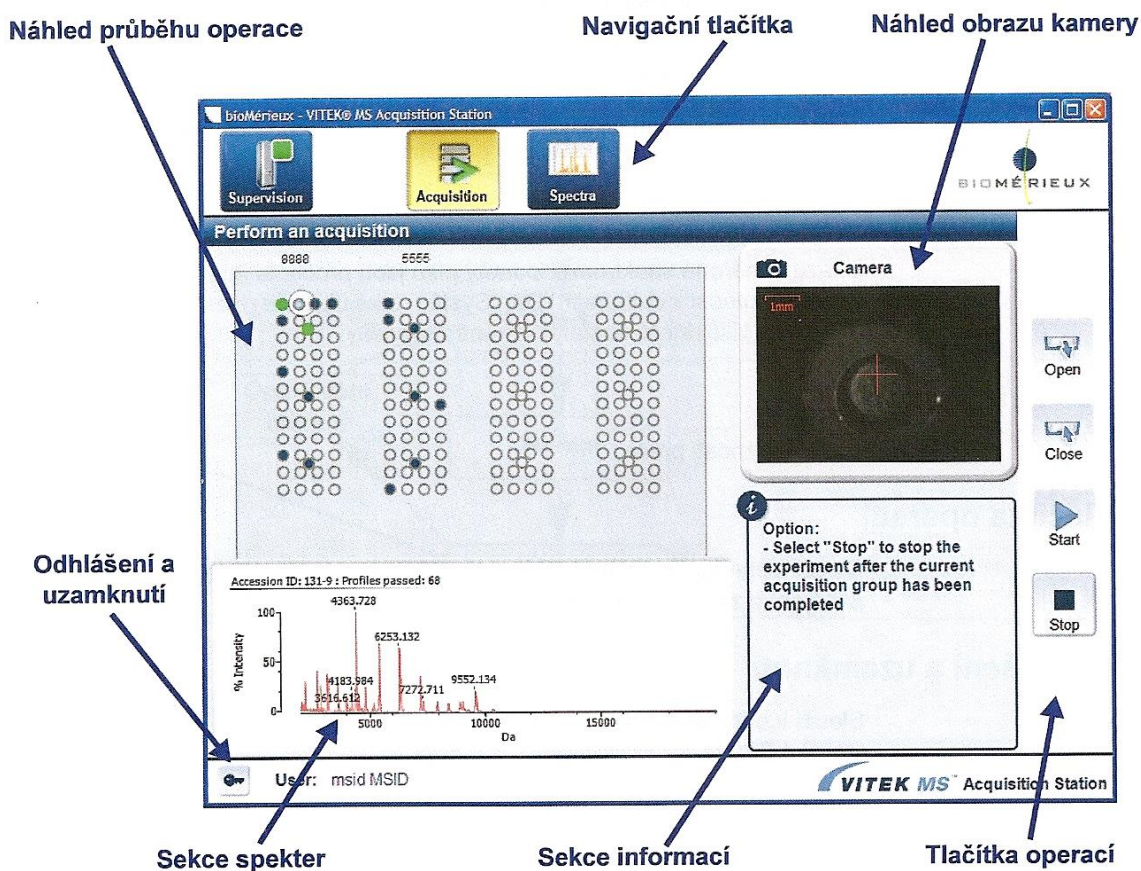
Nosi s nao kovanými vzorky byl do p ístroje vlofen p es na tení árového kódu nosi e te kou. Po na tení árového kódu byl adaptér (viz obr. 5) s nosi em zasunut do p ístroje a systém od erpal vzduch z vakuového systému. Ve chvíli kdy vakuový systém dosáhl provozního tlaku, systém automaticky spustil analýzu.

Obr. . 5: Adaptér pro uložení nosiče se vzorky



U každé měřicí skupiny 16 vzorků nejprve došlo k proměření kontrolního kmene v kalibrační pozici. Pokud se kalibrace zdařila, analyzátor přešel k první pozici vzorku v dané skupině. Pokud při kalibraci změná spektra neodpovídají spektrům očekávaným u kontrolního kmene (například při nesprávném nanesení kontrolního kmene na pozici) přístroj ohlásí chybu a daná skupina vzorků nebude změněna. Po dokončení měření je kalibrační pozice zkontrolována znovu. Pokud se vnitřní kalibrace nezdařila, přístroj zaslal chybovou zprávu na analytický server. V tomto případě nedošlo k zobrazení výsledků ve formě spekter, která odpovídala známým fragmentům p vodních molekul ve vzorku (viz obr. . 6). Spektra vzorků pak byla porovnána s databází spekter známých kmenů v softwaru přístroje VITEK MSÍ .

Obr. . 6: Obrazovka systému VITEK MSTM Acquisition Station (bioMérieux S.A., 2011)



Po porovnání spekter byla vypočítána procentuální pravděpodobnost vypovídající o míře shody vzorku s typickým spektrem daného mikroorganismu v databázi. Při dokonalé shodě byla pravděpodobnost 99 %. Za pravděpodobně správné určení bylo možné pokládat hodnoty 60-99 %. Pokud pravděpodobnost klesla pod 60 %, byl vzorek považován za neidentifikovaný (viz tab. . 6). Pokud nebyl jednoznačně určen jeden druh, systém nabídl seznam možných kmenů nebo sdílil, že vzorek nebylo možné identifikovat (bioMérieux S.A. 2011).

Tabulka . 6: Výsledek identifikace (bioMérieux S.A., 2011)

Spolehlivost identifikace	Počet kandidát	Pravd podobnost (%)	Poznámky
Dobrá	1	60 - 99,9	
Nízké rozlišení	2 - 4	< 60	Nutno určit dalšími testy
Neidentifikováno	-	-	Neodpovídá žádnému spektru v databázi

4. Výsledky

Ve své bakalářské práci jsem prováděla druhovou identifikaci 52 kmenů stafylokoků koaguláza-negativních izolovaných v období od prosince 2012 do března 2013. Kmeny byly identifikovány pomocí biochemické identifikace STAPHYtestem 16 (fa. Erba Lachema) a zároveň hmotnostní spektrometrií pomocí technologie MALDI-TOF systémem VITEK MSTM (fa. bioMérieux). Všechny 52 kmeny STKN byly izolovány z klinicky závažných materiálů v laboratorii Lékařské mikrobiologie Nemocnice České Budějovice a.s..

Nejvíce kmenů STKN bylo izolováno z hemokultur (25 kmenů), dále pak z centrálních filálních katétrů (CfK; 17 kmenů), z katétrů jiných než CfK (4 kmeny), z punktátů (3 kmeny), z hnisů (2 kmeny) a z výtěrů z ran (1 kmen).

U všech 52 kmenů byla provedena základní identifikace testem přítomnosti katalázy a latexovou aglutinací. Všechny kmeny STKN použité v této práci byly kataláza pozitivní, plasma koaguláza negativní.

4.1 Identifikace kmenů STKN biochemicky (STAPHYtest 16)

V tabulce 7 jsou uvedeny výsledky z biochemické identifikace za použití STAPHYtest 16 u 52 kmenů STKN. Z 52 kmenů byla u 25 kmenů identifikace výborná (48,1 %), u 8 kmenů velmi dobrá (15,4 %), u 2 kmenů dobrá (3,8 %). U 5 kmenů byla identifikace intermediární (9,6 %). 12 kmenů se testem nepodařilo identifikovat (23,1 %). Celková úspěšnost identifikace byla 67,3 %.

Tabulka 7: Výsledky biochemické identifikace

Identifikace	Počet kmenů	Celková úspěšnost metody %
výborná	25	67,3
velmi dobrá	8	
dobrá	2	
intermediární	5	
neidentifikováno	12	

4.2 Identifikace kmenů STKN systémem VITEK MSTM

Všechny kmeny STKN byly identifikovány systémem VITEK MSTM. Z 52 kmenů se nepodařilo identifikovat 2 kmeny a u 50 kmenů byla spolehlivost identifikace s 99,9% pravděpodobností. Celková úspěšnost identifikace byla 96,2 %.

Tabulka 8: Výsledky identifikace metodou MALDI-TOF

Spolehlivost identifikace	Počet kmenů	Pravděpodobnost %	Úspěšnost metody %
dobrá	50	99,9	96,2
nízké rozlišení	0		
neidentifikováno	2		

4.3 Porovnání identifikace kmenů STKN biochemicky (STAPHYtest 16) metodou MALDI TOF MS systémem VITEK MSTM

Identifikace kmenů STKN získaných do studie byla prováděna paralelně ze shodné kultury. Porovnání obou metod je uvedeno v tabulkách 9 a 10. Identifikace byla shodná u 38 kmenů a u 2 kmenů došlo k rozporu výsledku. Metodou MALDI-TOF MS se nepodařilo identifikovat 2 kmeny, biochemickou identifikací STAPHYtest 16 se nepodařilo identifikovat 12 kmenů.

Tabulka 9: Porovnání identifikace kmenů STKN metodami biochemické identifikace a MALDI-TOF

Identifikace	Počet identifikovaných kmenů STKN
shoda	38
rozpor	2
neidentifikováno přístrojem VITEK MS TM	2
neidentifikováno testem STAPHYtest 16	12

Tabulka . 10: Výsledky identifikace jednotlivými metodami

Kmen	STAPHYtest 16	MALDI TOF MS
1	STHH	STHH
2	STEP	STEP
3	STEP	neidentifikováno
4	STEP	STEP
5	STEP	STEP
6	neidentifikováno	STCA
7	STEP	STEP
8	STEP	STEP
9	neidentifikováno	neidentifikováno
10	STWA	STWA
11	STWA	STWA
12	neidentifikováno	STEP
13	neidentifikováno	STEP
14	neidentifikováno	STHA
15	STLU	STLU
16	STEP	STEP
17	STCA	STHA
18	neidentifikováno	STEP
19	STEP	STEP
20	STHH	STHH
21	STLU	STLU
22	STHH	STHH
23	STEP	STEP
24	STEP	STEP
25	neidentifikováno	STCA
26	STWA	STWA
27	STEP	STEP
28	neidentifikováno	STCP
29	STEP	STEP
30	neidentifikováno	STHH
31	STEP	STEP
32	STEP	STEP
33	STEP	STEP
34	STEP	STEP
35	neidentifikováno	STHH
36	STEP	STEP

Kmen	STAPHYtest 16	MALDI TOF MS
37	STEP	STEP
38	STEP	STEP
39	STEP	STEP
40	STEP	STEP
41	STEP	STEP
42	STEP	STEP
43	STEP	STEP
44	STEP	STEP
45	neidentifikováno	STCA
46	STEP	STEP
47	STEP	STEP
48	STEP	STEP
49	STEP	STEP
50	STHH	STHO
51	neidentifikováno	STHO
52	STEP	STEP

intermediární identifikace

Vysv tlivky: *STEP* ó *Staphylococcus epidermidis*, *STHH* ó *Staphylococcus hominis ssp. hominis*, *STCA* ó *Staphylococcus capitis*, *STWA* ó *Staphylococcus warneri*, *STHA* ó *Staphylococcus haemolyticus*, *STLU* ó *Staphylococcus lugdunensis*, *STCP* - *Staphylococcus caprae*, *STHA* ó *Staphylococcus hominis*

4.4 Zastoupení jednotlivých kmen STKN dle výsledk identifikace metodou MALDI-TOF MS systémem VITEK MS™

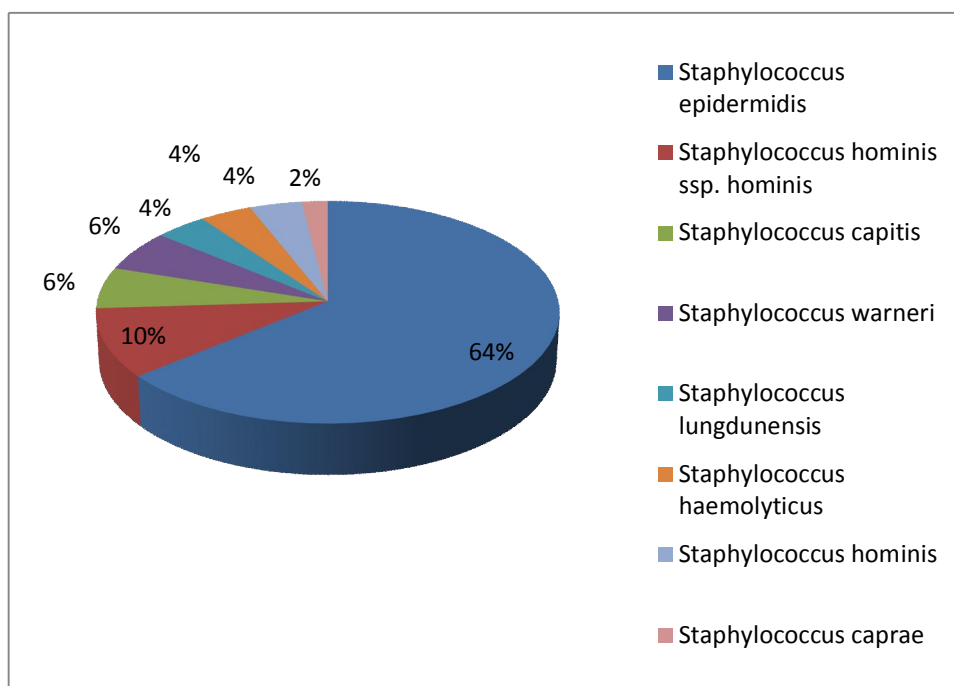
Metodou MALDI-TOF bylo 32 kmen STKN dour eno jako *Staphylococcus epidermidis* (64 %), 5 kmen *Staphylococcus hominis ssp. hominis* (10 %), 3 kmeny *Staphylococcus capitis* a *Staphylococcus warneri* (6 %), 2 kmeny *Staphylococcus lugdunensis* a *Staphylococcus hominis* (4 %), 1 kmen byl dour en jako *Staphylococcus caprae* (2%).

Tabulka . 11: Identifikace kmen STKN metodou MALDI-TOF

Výsledek identifikace	Počet kmen	% zastoupení ze skupiny STKN
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	64
<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	5	10
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	6
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	6
<i>Staphylococcus lungdunensis</i>	2	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	4
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	4
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	2

V grafu . 1 je znázorněno (v %) zastoupení jednotlivých druhů stafylokoků izolovaných z klinického materiálu.

Graf .1: Zastoupení jednotlivých druhů STKN ve sledovaném souboru



5. Diskuse

Cílem práce bylo porovnat možnosti laboratorní diagnostiky stafylokokových infekcí a porovnat metody používané k podrobné identifikaci kmene na Pracovišti bakteriologie. Celkem bylo do práce zahrnuto 52 izolát koaguláza a negativních stafylokoků, které byly izolovány z hemokultur, centrálních žilních katétrů a ostatních klinicky závažných materiálů v období od prosince 2012 do března 2013. K jejich identifikaci byly paralelně použity metody biochemické identifikace - STAPHYtest 16 - a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Tyto metodami se podařilo identifikovat ze skupiny zahrnuté do studie 50 kmenů STKN na úrovni druhu. Při porovnání jednotlivých metod použitých k identifikaci, je vidět vyšší úspěšnost při použití metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Touto metodou bylo identifikováno 96,2 % z celkového počtu kmenů. Při použití metody biochemické identifikace testem STAPHYtest 16 byla úspěšnost 67,3 %. Tento rozdíl by mohl být způsoben chybným vyhodnocením testů v mikrotitračních destičkách, chybným zpracováním při inokulaci nebo nestandardními vlastnostmi kmenů, které by poté nebylo možné identifikovat (nedojde ke shodě s očekávanými výsledky a kmen není možné zařadit dle interpretačních tabulek dodávaných výrobcem). Vzhledem k tomu, že hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je založena na porovnání proteinových profilů s databází známých mikroorganismů, odlišnosti na úrovni biochemických vlastností se neprojeví a identifikace je i tak úspěšná. Stejně tak záleží i na použité databázi organismů, se kterou daná metoda operuje. To je případ i dvou kmenů *Staphylococcus caprae*, které nelze identifikovat biochemicky testem STAPHYtest 16, ale byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.

V případě hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF se nepodařilo identifikovat 2 kmeny, což je možné vysvětlit nevhodným zpracováním vzorku nebo právě tím, že získaná spektra neodpovídala žádnému organismu v databázi. Vzhledem k tomu, že v jednom z těchto případů nebyl kmen identifikován ani biochemicky testem STAPHYtest 16, je to pravděpodobné. Druhý kmen, který nebyl identifikován hmotnostní spektrometrií, byl biochemicky identifikován *Staphylococcus epidermidis*. V tomto případě se tedy pravděpodobně jednalo o nesprávné zpracování nebo nanesení vzorku. Použití další

metody k identifikaci (např. PCR) vzorku, jehož identifikace nebyla úspěšná, nebylo v možnostech této bakalářské práce. Stejně tak nebylo možné použít jinou databázi hmotnostních spekter, než tu, která je k dispozici od firmy bioMérieux.

U 2 kmenů STKN byly získány odlišné výsledky identifikace (viz tab. 10, str. 43, *S. capitis* a *S. hamolyticus*; *S. hominis* a *S. hominis* ssp. *hominis*). Zde může být vysvětlením opět změna biochemických vlastností kmene, chybný odečet z mikrotitrantní destičky nebo i kontaminace vzorku dvěma druhy STKN a následná identifikace různých kmenů. Vezmeme-li v úvahu, že u obou těchto kmenů byl výsledek biochemické identifikace testem STAPHYtest 16 vyhodnocen jako intermediální, je otázkou, zda pokládat rozdíl v identifikaci za relevantní. V jednom z případů se jednalo pouze o rozdíl zařazení do poddruhu (*S. hominis* a *S. hominis* ssp. *hominis*). Tento výsledek by bylo možné i interpretovat jako shodný, v rutinní praxi je zařazení do druhu dostačující. Nicméně stejně jako v předchozím případě nebylo možné použít jinou metodu k potvrzení identifikace kmene STKN.

Ze získaných výsledků tedy vyplývá velký přínos metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF v rutinní praxi. Dovoluje identifikaci ve velmi krátkém časovém horizontu oproti klasické metodě STAPHYtestem 16 (až 24 hodin) i vysokou spolehlivost (nebyly identifikovány pouze dva kmeny) a jednoduchost celého zpracování.

Nejčastěji byl z našich vzorků identifikován druh STEP (64%), následně STHH (10%), STCA (6%), STWA (6%), STLU (4%), STHA (4%), STHO (4%), STCP (2%). Z hlediska interpretace výsledku je samozřejmě otázkou, zda se jedná o suspektního patogena nebo o suspektní kontaminaci například z kůže, proto je velmi důležité, jak poukazuje i Votava (1998) dbát na preanalytickou fázi vyšetření, která může ovlivnit výsledek vyšetření a následně může vést i k nesprávné nebo neindikované léčbě pacienta. Jak uvádí Votava (2003), u zdravých lidí jsou koaguláza - negativní stafylokoky vyvolavatelem onemocnění, ale u hospitalizovaných pacientů se vzhledem k jejich predispozicím, mohou jako podmíněně patogenní bakterie uplatnit. V případě našich vzorků se jednalo hlavně o hemokultury, kde může dojít k jejich kontaminaci, hlavně kožní flórou při nedostatečné dezinfekci kůže před odběrem. Tomu by mohl odpovídat i nejčastěji identifikovaný *Staphylococcus epidermidis*, který bývá

kolonizuje kůže a nosní dutina. Na druhé straně, jak uvádí Rahman (2012), koaguláza-negativní stafylokoky jsou také nejčastějšími původci nosokomiálních infekcí a zároveň nejčastějšími původci nosokomiálních infekcí krevního řečiště (Herwaldt et al. 1995). Rozhodnutí o tom, zda se jedná o kontaminaci, náleží hlavně klinickým lékařům ve spolupráci s mikrobiology.

6. Závěr

V bakalářské práci jsou hodnoceny současné možnosti laboratorní diagnostiky stafylokokových infekcí se zaměřením na stafylokoky koaguláza - negativní a porovnání metod používaných na pracovišti PBAK k jejich druhové identifikaci.

V současné době dochází k velkému rozmachu hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která je velmi rychlá, jednoduchá a dle našich výsledků spolehlivá. Touto metodou se nám podařilo identifikovat 96,2 % izolovaných kmenů koaguláza - negativních stafylokoků. Na druhé straně použitím biochemické identifikace testem STAPHYtest 16 jsme identifikovali 67,3% kmenů koaguláza - negativních stafylokoků zahrnutých do studie. V porovnání s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF se jedná o méně spolehlivou metodu a dochází k výrazné časové prodávce (min. 24 hodin). Nejčastěji byl z klinických vzorků identifikován *Staphylococcus epidermidis* (64 %), následoval *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis* (10 %), *Staphylococcus capitis* (6 %), *Staphylococcus warneri* (6 %), *Staphylococcus lugdunensis* (4 %), *Staphylococcus haemolyticus* (4 %), *Staphylococcus hominis* (4 %), *Staphylococcus caprae* (2 %).

7. Seznam poufíté literatury

Anderson, N.W., Buchan, B.W., Riebe, K.M., Parsons, L.N., Gnacinski, S., Ledebøer, Banada, P.P., Chakravorty, S., Shah, D., Burday, M., Mazzella, F.M., Alland, D. *Highly sensitive detection of Staphylococcus aureus directly from patient blood*. PloS One 7(2): e31126, 2012.

Bedná, M., Fraková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. ISBN neuvedeno

Beneš, J. *Infekční nemoci*. 2. rozšířené vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-726-2173-4.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. *Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix assisted laser desorption ionization or time of flight mass spectrometry*. J Clin Microbiol 45: 2156-2161, 2007.

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., Solari, S. *Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI*. Rev Chilena Infectol 29: 263-272, 2012.

Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M., Krut, O. *Proteomics-based identification of anchorless cell wall proteins as vaccine candidates against Staphylococcus aureus*. Infect. Immun 77:271962729, 2009.

Greenwood, D., Richard, C. S., Peutherer, J. F. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Příklad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9365-0.

Hájek, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int J Syst Bacteriol 26: 401-8, 1976.

Havlí, J. *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. Vesmír 78, 1999/8.

Herwaldt, L.A., Wenzel, R.P. *Dynamics of hospital-acquired infection*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.C., Tenover, M.A., et al., eds. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 1995.

Cherkaoui A, et al. *Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level*. J. Clin. Microbiol. 48:1169-1175, 2010.

Isenberg, H.D. (ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd edition, 2007.

Lachema. *Lachema* [online]. 2011 [cit. 2013-04-13]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com>

La Scola, B., Fakult, D. *Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry*. PloS One 4: e8041, 2009.

Lee, J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. Journ of Infection 29: 105, 1994.

Maki, D.G., Weise, C.E., Sarafin, H.W. *A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection*. N Engl J Med 296(23): 1305-9, 1977.

Murray, P.R., Baron, E.J. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2003, 2 v. ISBN 15-558-1255-4.

Nagy, E., Becker, S., Sóki, J., Urbán, E., Kostrzewa, M. *Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) Bacteroides fragilis strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J. Med. Microbiol 60(Pt 11):158461590, 2011.

NCB_PBAK_SOP_12_008. *Bakteriologické vyšetření krve, likvoru nebo jiného primárně sterilního, tekutého materiálu v automatickém kultivačním systému BacT/ALERT 3D*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Nemocnice české Budjovice a.s., 2012.

NCB_PBAK_SOP_12_010. *Identifikace a typizace izolovaných kmenů metodou mikroskopickou, kultivační, biochemickou, aglutinační a metodou hmotnostní spektrometrie*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Nemocnice české Budjovice a.s., 2012.

Patil, H.V., Patil, V.C., Ramteerthkar, M.N., Kulkarni, R.D. *Central venous catheter-related bloodstream infections in the intensive care unit*. Indian J Crit Care Med. 15: 2136223, 2011.

Peleg, A.Y., Miyakis, S., Ward, D.V., Earl, A.M., Rubio, A., Cameron, D.R., Pillai, S., Moellering, R.C. Jr, Eliopoulos, G.M. *Whole genome characterization of the mechanism of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of Staphylococcus aureus*. PloS One 7: e28316, 2012.

Petrá, P., Jefe, P. *Smíšená infekce Staphylococcus intermedius a Pasteurella multocida subsp. septica po kousnutí psem*. Zprávy CEM SZÚ (Praha) 7(3): 116-7, 1998.

Petrá, P. *Identifikace stafylokok z klinického materiálu*. Remedía Klin Mikrobiol 3: 50-3, 1999.

Petrá, P. *Biochemická identifikace stafylokok*. Remedía Klin Mikrobiol 4(5): 148-154, 2000.

Petrá, P. Nový š eskýõ stafylokok, *Staphylococcus microti*. Zprávy EM (SZÚ, Praha) 19(1-2): 37-39, 2010.

Petrá, P. *Orides ó orienta ní identifikace koaguláza ó negativních stafylokok z humánního klinického materiálu*. 2010.

Rahman, H.M.A., Mahmud, C., Paul, S.K., Sultana, S., Haque, N., Kabir, M.R., Kubayashi, N. *Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens*. Mymensingh Med J 21: 195-9, 2012.

Tristan, A., Benito, Y., Montserret, R., Boisset, S., Dusserre, E., et al. *The Signal Peptide of Staphylococcus aureus Pantón Valentine Leukocidin LukS Component Mediates Increased Adhesion to Heparan Sulfates*. PLoS ONE 4(4): e5042, doi:10.1371/journal.pone.0005042, 2009.

VITEK MSÍ postup návod k poufítí. bioMérieux S.A., 2011.

Votava, M., Ondrov ík, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1805-4.

Votava, M., Obdrfálek, V., Ondrov ík, P., R fli ka, F., Zahradní ek, O., Woznicová, V. *Léka ská mikrobiologie II.: P ehled vy-et ovacích metod v léka ské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8.

Votava, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.

Votava et al. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.