

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Adéla Zelenková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

Adéla Zelenková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**KLINICKÁ DIAGNOSTIKA INFEKČÍ ZPŮSOBENÝCH
REZISTENTNÍMI STAFYLOKOKY**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

PLZEŇ 2024

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Zelenková Adéla

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Klinická diagnostika infekcí způsobených rezistentními stafylokoky

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Počet stran – číslované: 40

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 38

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, MRSA, antibiotická rezistence

Souhrn:

Tato bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V teoretické části se práce zaměřuje na podrobné seznámení s rodem *Staphylococcus* spp. V rámci této části je poskytnut detailní přehled o obecných charakteristikách stafylokoků, včetně faktorů virulence, výskytu, přenosu a patogenity. Zvláštní důraz je kladen na klinicky nejvýznamnější druh této bakterie, *Staphylococcus aureus*. Dále se práce věnuje problematice rezistentních kmenů stafylokoků, které jsou odolné vůči antibiotikům. V rámci této části je také podrobně rozebrán mechanismus rezistence a působení účinku antibiotik. Poslední část teoretické části je věnována metodám používaným pro diagnostiku stafylokoků. Praktická část práce se zaměřuje na detekci stafylokoků, zejména na meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA). Tato část práce zahrnuje statistické zpracování dat o výskytu této bakterie ve Fakultní nemocnici Plzeň. Cílem této části je poskytnout podrobný přehled o rozšíření a výskytu MRSA v nemocničním prostředí.

Abstract

Surname and name: Zelenková Adéla

Department: Department of Paramedical Science, Medical Diagnostics Studies and Public Health

Title of thesis: Clinical diagnosis of infections caused by resistant staphylococci

Consultant: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Number of pages – numbered: 40

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 38

Keywords: Staphylococcus aureus, MRSA, antibiotic resistance

Summary:

This bachelor thesis is divided into theoretical and practical parts. In the theoretical part, the thesis focuses on a detailed introduction to the genus *Staphylococcus* spp. This part provides a detailed overview of the general characteristics of staphylococci, including virulence factors, occurrence, transmission, and pathogenicity. Special emphasis is placed on the most clinically important species of this bacterium, *Staphylococcus aureus*. Furthermore, the thesis addresses the issue of antibiotic resistant strains of staphylococci. The mechanism of resistance and the action of antibiotics is also discussed in detail. The last part of the theoretical part is devoted to the methods used for the diagnosis of staphylococci. The practical part of the thesis focuses on the detection of staphylococci, especially MRSA. This part of the work includes statistical processing of data on the occurrence of this bacterium in the University Hospital Pilsen. The aim of this part is to provide a detailed overview of the prevalence and incidence of MRSA in the hospital environment.

Poděkování

S hlubokým uznáním a vděčností bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování Mgr. Kateřině Chudějové, Ph.D. Za její odborné vedení, cenné rady a poskytnutí materiálů pro klíčové a úspěšné dokončení mé práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 STAFYLOKOKY	17
1.1 Obecná charakteristika.....	17
1.2 Rozdělení	18
2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	19
2.1 Charakteristika obecně.....	19
2.2 Faktory virulence	19
2.2.1 Povrchové faktory virulence.....	19
2.2.2 Extracelulární faktory virulence	20
2.3 Přirozený výskyt <i>S. aureus</i>	21
2.4 Původ infekce a způsob přenosu.....	21
2.5 Patogenita.....	22
2.6 Terapie infekcí způsobených kmeny <i>S. aureus</i>	22
3 KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY	24
3.1 Rozdělení KNS	24
3.2 Faktory virulence	24
3.2.1 Biofilm.....	24
3.2.2 Další faktory virulence KNS	25
3.3 Přirozený výskyt	25
3.4 Původ infekce a způsob přenosu.....	25
3.5 Patogenita.....	25
3.6 Terapie infekcí způsobenými KNS.....	26
4 REZISTENCE STAFYLOKOKŮ K ANTIBIOTIKŮM	27
4.1 Antibiotika obecná charakteristika	27
4.2 Mechanismus účinku antibiotik	27
4.3 Mechanismus rezistence u stafylokoků	27
4.3.1 MRSA.....	29
4.3.2 MLS _B rezistence	32
4.3.3 VRSA a VISA	33
5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA STAFYLOKOKŮ.....	34

5.1	Mikroskopie	34
5.2	Kultivace	34
5.3	Identifikace kmenů <i>S. aureus</i>	35
5.3.1	MALDI-TOF MS	35
5.3.2	Biochemické testy	35
5.3.3	Sérologické testy	36
5.3.4	Molekulární metody	36
5.3.5	Testování citlivosti k antibiotikům	36
	PRAKTICKÁ ČÁST	39
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	39
6.1	Hlavní cíl.....	39
6.2	Dílčí cíle.....	39
7	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT DETEKCE MRSA KMENŮ VE FN PLZEŇ ZA OBDOBÍ 2020-2023	40
7.1	Obecná statistika záchytu kmenů <i>S. aureus</i> ve FN Plzeň za období 2020-2023 ..	40
7.2	Obecné statistické zpracování dat záchytu MRSA kmenů	44
7.3	Statistické zpracování neduplicitních dat kmenů MRSA	48
	DISKUZE	53
	ZÁVĚR.....	55
	SEZNAM LITERATURY	56
	SEZNAM PŘÍLOH	59
	PŘÍLOHY	60

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1	- Počty detekovaných izolátů kmene <i>S. aureus</i> za jednotlivé roky sledovaného období 2020-2023	40
Graf č. 2	- Počty zpracovaných biologických materiálů s přítomností <i>S. aureus</i> za sledované období 2020-2023	41
Graf č. 3	- Počty detekovaných izolátů <i>S. aureus</i> dle věku za sledované období 2020-2023	42
Graf č. 4	- Počty detekovaných izolátů <i>S. aureus</i> dle pohlaví za sledované období 2020-2023	42
Graf č. 5	- Počty detekovaných izolátů <i>S. aureus</i> dle oddělení za sledované období 2020-2023	43
Graf č. 6	- Počty detekovaných izolátů MRSA z celkového počtu izolantů za období 2020-2023	44
Graf č. 7	- Počty detekovaných izolátů MRSA dle roku za období 2020-23	44
Graf č. 8	- Počty detekovaných izolátů MRSA dle materiálu za sledované období 2020-2023	45
Graf č. 9	- Počty detekovaných izolátů MRSA dle věku za sledované období 2020-2023	46
Graf č. 10	- Počty detekovaných izolátů MRSA dle pohlaví za sledované období 2020-2023	46
Graf č. 11	- Počty detekovaných izolátů MRSA dle oddělení za sledované období 2020-2023	47
Graf č. 12	- Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA v jednotlivých letech za sledované období 2020-2023	48
Graf č. 13	- Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA dle typu zpracovávaného biologického materiálu za sledované období 2020-2023	49
Graf č. 14	- Počty zpracovaných neduplicitních izolátů MRSA dle věku za sledované období 2020-2023	49
Graf č. 15	- Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA dle pohlaví za sledované období 2020-2023	50
Graf č. 16	- Počty zpracovaných neduplicitních izolátů MRSA dle oddělení za sledované období 2020-2023	50
Graf č. 17	- Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA v závislosti na část nemocnice za sledované období	51
Graf č. 18	- Přehled citlivosti/rezistence neduplicitních izolátů MRSA na základní spektrum testovaných antibiotik za sledované období 2020-2023	52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Znázornění stafylokoka v elektronovém mikroskopu.....	17
Obrázek 2 Schéma mechanismu rezistence MRSA	30
Obrázek 3 Znázornění procentuálního podílu invazivních izolátů MRSA v roce 2022 v jednotlivých zemích Evropy ...	31
Obrázek 4 Podíl invazivních izolátů MRSA v letech 2000-2022 v České republice	32
Obrázek 5 <i>S. aureus</i> na krevním agaru s beta-hemolýzou (foceno s podsvícením)	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Počty zpracovaných izolátů vybraných MRSA dle citlivosti na ATB za období 2020-2354.....	52
---	----

SEZNAM ZKRATEK

- ATB antibiotika
- CA-MRSA komunitní meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
- DNA..... deoxyribonukleová kyselina
- EARS-net..... evropská síť pro monitoring antibiotické rezistence (z angl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance network*)
- ECDC..... Evropské centrum pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění (z angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*)
- ELISA enzymově značená imunoanalýza (z angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- EU/EEA Evropská unie a Evropský hospodářský prostor
- GISA glykopeptid intermediární *S. aureus*
- GRSA..... glykopeptid *rezistentní S. aureus*
- HA-MRSA..... meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* v nemocničním zařízení
- KNS koaguláza-negativní *Staphylococcus*
- MALDI-TOF MS..... hmotnostní spektrometrie a analyzátozem doby letu a laserovou desorpčí/ionizací za účasti matrice (z angl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*)
- MBC..... minimální baktericidní koncentrace
- mecA*..... gen kódující protein PBP2a
- mecC* gen kódující protein PBP2c
- MIC..... minimální inhibiční koncentrace

MLS_B rezistence vůči makrolidům, linkosamidům a streptograminu
B

MRSA meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MSSA..... *S. aureus* citlivý na meticilin

NAG..... N-acetylglukosaminu

NAM N-acetylmuramové kyseliny

PBP2a/c..... penicilin-vázající protein 2a/c

PCR..... polymerázová řetězová reakce (z angl. *polymerase chain reaction*)

PVL..... Panton-Valentinův leukocidin

rRNA..... ribozomální RNA

VISA vankomycin-intermediálně rezistentní *Staphylococcus aureus*

VRSA..... vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*

ÚVOD

Stafylokoky, především druh *Staphylococcus aureus*, jsou častou příčinou bakteriálních infekcí u lidí. Jejich schopnost rychle se šířit a adaptovat na nové prostředí, zvyšuje riziko infekcí, zejména v prostředí nemocnic a dalších zdravotnických zařízení, kde jsou pacienti často vystaveni vyššímu riziku infekcí z důvodu oslabené imunity nebo invazivních lékařských zákroků.

V posledních desetiletích se stafylokokové infekce staly jedním z hlavních problémů veřejného zdraví po celém světě. Zvláště alarmující je vzestup a šíření rezistentních kmenů, jako je meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), které představují značnou výzvu pro klinickou diagnostiku a léčbu způsobených infekcí.

Stafylokokové infekce mají potenciál způsobit závažné komplikace a negativně ovlivnit prognózu pacientů, zejména pokud jsou tyto kmeny rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům. MRSA je známý svou schopností odolávat léčbě antibiotiky ze skupiny betalaktamů, což komplikuje terapeutické postupy a zvyšuje riziko komplikací. Rezistentní kmeny mohou vyvolat široké spektrum onemocnění, od mírných kožních infekcí až po závažné invazivní infekce, jako jsou pneumonie, sepse nebo infekce chirurgických ran.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na klinickou diagnostiku infekcí způsobených rezistentními stafylokoky. Hlavním cílem této bakalářské práce je seznámit se s problematikou stafylokokových infekcí, jejich epidemiologií, možnostmi terapie a laboratorní diagnostikou. Praktická část se bude zaměřovat na statistické zpracování výskytu kmenů *S. aureus* ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2020 až 2023, se zaměřením na kmeny MRSA.

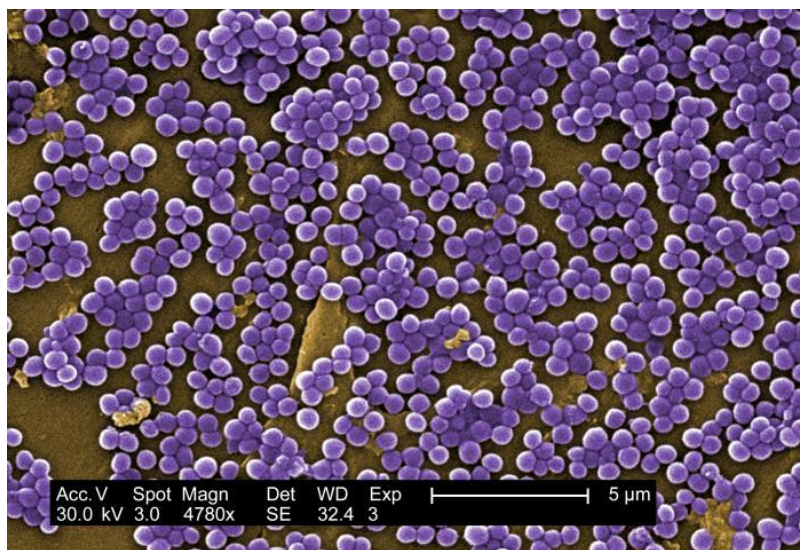
TEORETICKÁ ČÁST

1 STAFYLOKOKY

1.1 Obecná charakteristika

Stafylokoky byly poprvé nezávisle popsány v roce 1880 dvěma vědci, L. Pasterem a A. Ogsonem. Ogson představil termín "Staphylococcus". Slovo odvozené z řeckého "staphylé", což znamená hrozen, a "kokkos", který označuje zrnko, jako odkaz na charakteristickou morfologii těchto mikroorganismů. V roce 1884 provedl německý lékař F. J. Rosenbach diferenciaci bakterií na základě barvy kolonií hlíz. Toto vedlo k identifikaci dvou hlavních druhů: *S. aureus* z latinského "aurum", neboli zlatý, a *S. "albus"*, což znamená bílý. Později byl *S. albus* přejmenován na *S. epidermidis* vzhledem k jeho rozšířenému výskytu na lidské kůži. (1)

Bakterie z rodu *Staphylococcus*, představují gram-pozitivní mikroorganismy nesporujícího charakteru. Pohybující se výjimečně a mající velikost přibližně 1 mikrometru. Obvykle se seskupují do charakteristických shluků připomínajících hrozny. Nejsou ale výjimkou ani jiné morfologické uspořádání, jako jsou shluky, krátké řetízky nebo tetrády, což můžeme vidět na **Obrázku 1**. Co se týče jejich odolnosti vůči nepříznivým podmínkám, stafylokoky jsou známé svou schopností přežít i v suchém prostředí. Nevytvářejí spory, bičíky ani pouzdra. (2; 3; 4)



Obrázek 1 Znárodnění stafylokoka v elektronovém mikroskopu

Zdroj: (32)

1.2 Rozdělení

Stafylokoky se rozdělují na dvě skupiny, koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní, podle toho, zda jsou schopny produkovat enzym koagulázu. Tento enzym umožňuje přeměnu fibrinogenu na fibrin, což způsobuje srážlivost krve. (3)

Z koaguláza-pozitivních stafylokoků je jedním z nejběžnějších patogenů u lidí *Staphylococcus aureus*. Tento druh má schopnost vyvolávat rozsáhlé spektrum onemocnění s různým stupněm závažnosti, zahrnující invazivní hnisavé infekce a toxikózy. Látky, které umožňují *S. aureus* způsobovat infekce a kolonizovat hostitele, jsou produkovány tímto patogenním druhem ve formě řady faktorů virulence. (2)

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou obvykle příležitostnými patogeny, což znamená, že mohou vyvolat nemoci, zejména u jedinců s predispozicí k oslabení imunitního systému. Jedním z klíčových mechanismů, kterým mohou tyto bakterie způsobovat infekce, je tvorba biofilmů. (5)

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

S. aureus je jediným klinicky významným koaguláza-pozitivním stafylokokem. (6)

2.1 Charakteristika obecně

S. aureus, též známý jako "zlatý stafylokok," představuje významný a často se vyskytující patogen u lidí, schopný vyvolat rozsáhlou škálu nemocí. Tyto infekce jsou běžné v komunitním i nemocničním prostředí. Jejich léčba je často komplikovaná vzhledem k výskytu multirezistentních kmenů, jako je meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA). Tento patogen může poškozovat makroorganismus, buď přímým působením v místě infekce nebo uvolňováním toxinů. (2; 7)

2.2 Faktory virulence

S. aureus disponuje bohatým množstvím faktorů virulence, zahrnujících jak povrchově vázané na buněčnou stěnu, tak extracelulární látky uvolňované do okolí. Tato rozmanitost faktorů virulence přispívá k širokému spektru klinických projevů stafylokokových infekcí. Jednotlivé kmeny *S. aureus* se v tomto ohledu výrazně liší, což může vést k různým klinickým onemocněním. (3; 5; 8)

2.2.1 Povrchové faktory virulence

Stafylokoky mohou být vybaveny mimořádně tenkým **polysacharidovým obalem**, obklopujícím jejich buněčnou stěnu. Pouzdro zastává klíčovou roli v ochraně stafylokoků před fagocytózou imunitními buňkami hostitele. Hlavní složkou buněčné stěny bakterií je **peptidoglykan**, který zabezpečuje integritu bakteriální buňky a chrání ji před osmotickou lýzou. Tato látka má schopnost aktivovat imunitní odpověď hostitele a komplement. Mezi další povrchové faktory virulence patří **adheziny, kyselina teichoová, polysacharid A a další proteiny**. Tyto faktory přispívají ke kolonizaci sliznic a kůže tím, že usnadňují adhezi bakterií k mezibuněčné hmotě, zahrnující fibrinogen, fibronektin, kolagen a povrchové molekuly hostitelských buněk. Naopak, **protein A** brání opsonizaci a fagocytóze. (7; 9; 10; 11)

2.2.2 Extracelulární faktory virulence

ENZYMY

Enzymy, zahrnují **volnou koagulázu**, která projevuje schopnost indikovat srážení krevní plazmy. Její odlišnost od vázané koagulázy spočívá v tvorbě stafylotrombinu, komplexu, který předchází transformaci fibrinogenu na fibrin. **Lipáza**, další z enzymů, se specializuje na rozkládání lipidů. **Hyaluronidáza** projevuje vysokou efektivitu při rozkládání kyseliny hyaluronové, klíčové složky extracelulární matrix tkání hostitele. **Proteázy** disponují schopností rozkládat hostitelské proteiny, mezi něž patří imunoglobuliny, komplementové složky a cytokiny. **Termostabilní nukleáza**, známá též jako stafylokoková nukleáza, aktivně přispívá k degradaci hostitelské DNA. **Kataláza**, další enzym, který katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. (7; 9; 11; 12)

TOXINY

Mezi významné toxiny řadíme hemolyziny, a Panton-Valentinův leukocidin. **Hemolyziny** mají unikátní schopnost rozkládat červené krvinky a narušovat strukturu membrán erytrocytů a dalších hostitelských buněk. Tato aktivita vede k uvolňování hemoglobinu do okolního prostředí a vytváření zón hemolýzy kolem bakteriálních kolonií na agarovém médiu, tak usnadňuje pronikání bakterie do tkání a jejímu unikání před imunitní obranou hostitele. *S. aureus* produkuje čtyři typy hemolyzinů-alfa, beta, gama a delta. Alfa-hemolyzin je z těchto toxinů nejlépe prozkoumaný a je schopen vyvolat úplnou hemolýzu. Tento hemolyzin je schopen lyzovat různé hostitelské buňky, včetně červených a bílých krvinek a může též narušovat membrány hostitelských buněk a aktivovat imunitní reakce hostitele. Beta-hemolyzin dokáže hydrolyzovat sfingomyelin v plazmatické membráně hostitelských buněk, to zvyšuje jejich citlivost na další lytické faktory. Gama-hemolyzin je schopen lyzovat erytrocyty a leukocyty, zatímco delta-hemolyzin se projevuje ve tvorbě kožních abscesů. Naopak, **Panton-Valentinův leukocidin** nezpůsobuje hemolýzu, ale způsobuje nekrózu tkání, což vede k jejich destrukci. Dále ničí leukocyty a odpovídá za těžké až smrtelné infekce, hlavně v případě plicní tkáně a měkkých tkání pohybového systému. (7; 9)

SUPERANTIGENY

Mezi významné superantigeny patří enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliatiny. **Enterotoxiny**, považované za superantigeny, vykazují schopnost aktivovat

rozsáhlé množství T-buněk, to vede k masivnímu uvolňování cytokinů a často následně k rozvoji syndromu toxického šoku. Jejich tepelná stabilita a odolnost vůči tepelným úpravám je činí hlavní příčinou otrav potravinami. Existuje několik typů enterotoxinů, včetně A, B, C, D, E, G a Q. Mechanismus působení **Toxinu syndromu toxického šoku** je podobný enterotoxinu, avšak jeho účinky vedou k rozvoji těžké sepse s postupným selháváním orgánů a v konečném důsledku k úmrtí pacienta. **Exfoliatiny** způsobují poškození kůže a tvorbu puchýřů, zaměřují svou účinnost na štěpení desmogleinu 1, klíčového proteinu odpovědného za spojování kožních buněk. Štěpení vede k odlupování vnější vrstvy kůže, což vytváří stav známý jako stafylokokový syndrom opařené kůže. Tento syndrom se obvykle vyskytuje u kojenců a malých dětí, ale může postihnout i dospělé jedince s oslabeným imunitním systémem. (3; 7; 11; 12)

2.3 Přirozený výskyt *S. aureus*

S. aureus je bakterie, která je převážně asociována s lidským hostitelem, ale rovněž se může nacházet v prostředí volně žijících zvířat. Nositel této bakterie se stává přibližně jedna třetina zdravé populace, což činí nosičství poměrně běžným jevem. Vyšší prevalence byla zaznamenána u jedinců trpících kožními onemocněními, jako jsou ekzém a psoriáza. Zvýšený výskyt byl také zaznamenán u zdravotnického personálu. *S. aureus* je typicky lokalizován v nosní sliznici s méně častým výskytem na sliznici v oblasti hltanu. Mimo to je možné ho také nalézt na povrchu kůže a jejích přídatných orgánech, vzácně na vaginální sliznici. (5)

2.4 Původ infekce a způsob přenosu

Tento patogen může vyvolat infekce různého původu, exogenního nebo endogenního charakteru. Převážná část infekcí vzniká endogenní cestou, a vychází tak z přirozeného osídlení pacienta, zejména na kůži a v horních cestách dýchacích. Možné infekce jsou obvykle způsobeny nositelskými kmeny konkrétního onemocnění. Stejně tak je možnost exogenního původu, zejména pokud jde o přenos z jiných jednotlivců nebo kontaminovaných povrchů. Přenos obvykle probíhá prostřednictvím fyzického kontaktu, a to i přesto, že přenos vzduchem kapénkami na krátkou vzdálenost je také možný, zejména v situacích, kdy se nedodrží respiracní etiketa. Tímto způsobem se obvykle nepřenáší patogen přímo, ale dochází spíše ke kontaminaci povrchů a okolí, které mohou následně sloužit jako zdroj přenosu prostřednictvím kontaktu. (5)

2.5 Patogenita

Mezi nejběžnější formy infekce vyvolané tímto patogenem se řadí pyodermie, což jsou hnisavá onemocnění kůže, jako jsou furunkly, folikulitida a impetigo, které se často vyskytují u malých dětí. Stafylokoky mohou také vyvolat infekce prostřednictvím toxinů, což může zahrnovat závažný syndrom spálené kůže, syndrom toxického šoku nebo enterotoxikózu, která vzniká kontaminací potravin a je obvykle šířena z rukou člověka. V dýchacím traktu mohou způsobovat sinusitidy a sekundárně u starších osob dokonce smrtelnou pneumonii. (3; 7)

Kromě toho mohou stafylokoky proniknout z primárního infekčního ložiska do regionálních lymfatických uzlin, a odtud se šíří hematogenní cestou, což často vede k sepsi. Krev může přenášet stafylokoky do různých orgánů, kde mohou vytvářet abscesy. Absces představuje ohraničené zánětlivé ložisko světle žlutého hnisu, který obsahuje živé i rozkládající se bílé krvinky a bakterie. Absces je obklopen stěnou složenou z fibrinu a fibroblastů, kdy okolní tkáně jsou zanícené. Tímto způsobem, případně po úrazu, mohou také způsobit zánět kostní dřeně nebo kloubů. (3)

Rovněž existují různé faktory zvyšující náchylnost k infekci zlatým stafylokokem. Jedná se především o situace, kdy se v ráně nacházejí cizí tělesa v důsledku chirurgických zákroků, implantovaných zařízení nebo stehů. Taktéž je pozorována vyšší náchylnost u jedinců s popáleninami, virovými infekcemi, toxikomanií, alkoholismem, diabetem mellitus, pacientů na dialýze a jedinců s oslabeným imunitním systémem. (5)

2.6 Terapie infekcí způsobených kmeny *S. aureus*

V léčbě hnisavých ložisek a abscesů je nezbytný chirurgický přístup. Provede se incize abscesu, aby byl odstraněn hnis, případně se odstraní cizí tělísko, a následně se aplikuje drenáž pro efektivní odvod tvořícího se hnisu. V případě ATB terapie se postupuje v situacích, kdy infekce projevuje tendenci k šíření z primárního ložiska a provází ji horečka s oslabením organismu. Většinou se jedná o ohraničenou infekci uloženou hluboko v tkáních, či postihující důležitý orgán. Taktéž se uvažuje o ATB při klasických formách infekcí s maligním průběhem, jako je endokarditida, stafylokokový toxický šok, sepse a další.

Díky časté rezistenci na ATB závisí volba léku na výsledku kultivace. V současné době vykazuje většina kmenů rezistenci vůči penicilinu, proto se již moc nevyužívá. Naopak

oxacilin se ukázal jako účinná volba, zejména při léčbě stafylokokových infekcí rezistentních na penicilin, a je také indikován při akutních a septických infekcích, avšak není účinný proti MRSA. Dalším významným léčivem je amoxicilin. Pro léčbu infekcí kostí je efektivní klindamycin, který se vyznačuje schopností dobře pronikat do kostní tkáně. V případě léčby MRSA se často využívají léky, jako jsou vankomycin nebo linezolid.

Jednou z efektivních strategií pro prevenci šíření infekce, zejména u MRSA, je proces dekolonizace. Tento postup zahrnuje komplexní dekontaminaci kůže, sliznic a ran. Pacient je podroben celotělové očištění speciálním roztokem nebo pěnou s antiseptickým účinkem. Poté se provádějí kontrolní stěry k prevenci rekolonizace. I když dekolonizace MRSA není rutinně vyžadována, je-li pacient vystaven vysoce rizikové operaci, je vhodné zvážit podstoupení dekolonizace kůže a nosu. Tato opatření mohou výrazně minimalizovat riziko infekce v chirurgické oblasti a současně snížit možnost přenosu infekce na další pacienty. (7; 8)

3 KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY

Koaguláza-negativní stafylokoky (KNS) jsou skupinou stafylokoků, které jsou charakterizovány absencí nebo nízkou aktivitou enzymu koagulázy. KNS jsou členy široké skupiny bakterií a sdílejí podobnou morfologii s koaguláza-pozitivními stafylokoky. KNS, které byly dříve opomíjeny, jsou dnes klasifikovány jako oportunní patogeny, což znamená, že mají tendenci způsobovat infekce, převážně u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Jejich význam v oblasti zdravotnictví se v současné době stále více uznává, zejména v kontextu nemocničních infekcí a komplikací spojených s lékařskými zákroky, proto se také staly předními patogeny nozokomiálních infekcí. (7)

3.1 Rozdělení KNS

KNS se dělí do několika druhů a poddruhů na základě různých charakteristik, včetně biochemických vlastností a antigenových struktur. Tato skupina zahrnuje více než 50 různých druhů, přičemž pouze několik z nich má klinický význam. Nejdůležitějším zástupcem této skupiny je *Staphylococcus epidermidis*, který byl identifikován jako zodpovědný za řadu infekcí, zejména v oblasti zdravotní péče. Mezi další klinicky významné druhy KNS patří např. *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus lugdunensis*. (2; 5)

3.2 Faktory virulence

I přes nižší virulenci ve srovnání s dobře prozkoumaným patogenem *S. aureus* se počet sekvenovaných kmenů KNS neustále zvyšuje, což vede ke stále většímu množství identifikovaných faktorů virulence. Mezi tyto faktory patří především tvorba biofilmu, což je s kolonizací povrchů považováno za jeden z nejvýznamnějších aspektů jejich virulence. K jejich virulenci dále přispívají faktory, jako je odolnost vůči antimikrobiálním látkám a produkce bakteriocinů a enterotoxinů. (13)

3.2.1 Biofilm

Biofilmy představují mnohobuněčná a pečlivě organizovaná uskupení mikroorganismů, která se přichytávají k povrchu a vytvářejí matici extracelulárních polymerních látek. Tyto komplexní struktury slouží k ochraně buněk před různými vnějšími stresovými faktory, jako jsou antimikrobiální látky a útoky imunitního systému hostitele, čímž umožňují přežití buněk uvnitř biofilmu. Schopnost tvořit biofilm je nejdůležitějším

virulentním faktorem, který usnadňuje jeho adhezenci a kolonizaci na umělých materiálech. (2; 13)

3.2.2 Další faktory virulence KNS

Dále byla doložena existence širokého spektra potenciálních faktorů virulence. Tyto faktory zahrnují tvorbu kapsuly, produkci slizových látek, aktivitu esterázy, přítomnost sideroforů a aktivitu DNázy. (13; 14)

3.3 Přirozený výskyt

KNS představují přirozenou součást mikroflóry člověka a běžně se vyskytují na povrchu kůže, kožních adnex a některých sliznic, včetně horních cest dýchacího traktu, uretry a vaginy. (5)

3.4 Původ infekce a způsob přenosu

Původ infekcí vyvolaných KNS lze rozdělit na dvě hlavní kategorie, přičemž převážně endogenní původ je charakterizován přenosem patogenů z rezidentně osídlené kůže na cévní katetr a následným vznikem extraluminálního biofilmu. Naopak, exogenní původ je typický pro infekce spojené s umělými implantáty, přičemž tyto implantáty jsou nejčastěji kontaminovány během chirurgických zákroků. Další možností je hematogenní přenos patogenu na implantát v případě bakterémie pocházející z jiného zdroje.

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou typicky přenášeny kontaktem, a to prostřednictvím rukou, kontaminovaných předmětů a zdravotnických pomůcek. Významným způsobem může docházet i k přenosu patogenu vzduchem, přičemž kontaminace vzduchu může nastat odlučováním šupinek kůže u zdravých osob. Tyto částice mohou potenciálně sloužit jako zdroj kontaminace chirurgických ran a umělých implantátů. (5; 8)

3.5 Patogenita

KNS hrají významnou roli při infekcích, zejména spojených s implantací cizích materiálů nebo zavedením různých medicínských pomůcek. Mezi nejběžnější infekce způsobené KNS patří infekce krevního oběhu, které se často vyskytují u pacientů s intravenózními katétry a mohou vést k bakterémii, případně až k rozvinutí katérové sepse. Tato bakterie může také infikovat umělé srdeční chlopně, kloubní protézy a další implantáty, což zvyšuje riziko infekčních komplikací. (3; 5)

3.6 Terapie infekcí způsobenými KNS

Pro efektivní terapii katérových sepsí a infekcí spojených s implantovanými pomůckami je potřebným prvkem chirurgické odstranění infikovaného implantátu. V případě léčby ATB, vykazují kmeny KNS větší odolnost vůči běžným proti stafylokokovým preparátům, než *S. aureus* s výjimkou MRSA. Tato odolnost vychází z nižší citlivosti k ATB a tvorby biofilmu. Výběr konkrétní terapie je opět závislý na výsledcích kultivačních testů. V případě možnosti se upřednostňuje použití oxacilinu, pokud za rezistentní lze zvolit vankomycin nebo linezolid. (7; 8)

4 REZISTENCE STAFYLOKOKŮ K ANTIBIOTIKŮM

4.1 Antibiotika obecná charakteristika

Antibiotika jsou látky, jež vykazují schopnost inhibovat růst jiných mikroorganismů při nízkých koncentracích. Tento účinek může být buď bakteriostatický, kdy je zastaven růst bakterií, nebo baktericidní, kdy jsou bakterie přímo usmrceny. Zároveň však minimalizují potenciální škodlivé účinky na lidské buňky a tkáně. Tyto antimikrobiální látky mohou být odvozeny jak z přírodních zdrojů, tak i vyrobeny uměle prostřednictvím syntetických postupů. (15; 16)

4.2 Mechanismus účinku antibiotik

Optimální antimikrobiální látky by měly vykazovat selektivní toxicitu, což znamená, že by měly účinně eliminovat patogenní bakterie nebo alespoň zastavit jejich růst, přičemž by měly vyvolat minimální nebo žádné negativní účinky na hostitelský organismus. V praxi se proto preferují antimikrobiální látky s nízkou toxicitou, což zahrnuje minimální nežádoucí vedlejší účinky. Bohužel však většina dostupných antimikrobiálních látek nedosahuje této ideální charakteristiky. (15)

Antimikrobiální látky vykazují svůj účinek na stafylokoky prostřednictvím rozmanitých mechanismů, které zahrnují regulaci několika klíčových buněčných procesů. Například beta-laktamová ATB mezi něž patří penicilin a cefalosporiny, vykazují svůj účinek inhibicí syntézy peptidoglykanu, což představuje klíčovou komponentu buněčné stěny. Další skupiny antimikrobiálních látek účinných na kmeny stafylokoků, včetně makrolidů a tetracyklinů směřují svůj účinek k procesu syntézy bílkovin. Tyto látky interagují s bakteriálními ribozomy, tudíž brání normální syntéze nových bílkovin. V důsledku tohoto zásahu může dojít k tvorbě neúplných nebo nefunkčních proteinů, to následně vede k buněčné smrti stafylokoků. Fluorochinolony představují další třídu antimikrobiálních látek s odlišným mechanismem účinku. Tyto látky ovlivňují syntézu DNA stafylokoků, což má za následek hromadění poškozené DNA v bakteriální buňce a konečně vede k buněčné smrti. (11; 17; 18; 19)

4.3 Mechanismus rezistence u stafylokoků

Rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám představuje odolnost, která se stává celosvětovým problémem a vzniká jako důsledek nesprávného užívání těchto

látek. Rezistenci lze klasifikovat do dvou základních kategorií: přirozenou, též známou jako inherentní a získanou. (15; 16)

Přirozená rezistence vzniká prostřednictvím genetických mutací a postihuje celkovou populaci konkrétního druhu stafylokoka. Tato forma rezistence je geneticky závislá a projevuje se k určitému ATB, bez ohledu na předchozí expozici této látky. K této specifické formě rezistence dochází v důsledku absence nebo nepřítomnosti cílové struktury pro dané ATB.

Získanou rezistencí se rozumí odolnost vůči ATB, která vzniká genetickými mutacemi nebo přenosem genů rezistence od jiných bakterií. Tento proces může probíhat v průběhu antibiotické terapie nebo v důsledku předchozí expozice ATB. Získaná rezistence může být rozdělena do dvou základních kategorií: genetická adaptace a fenotypická adaptace.

Hlavní mechanismy rezistence u stafylokoků zahrnují především produkci hydrolyzujících enzymů, jež degradují cílové skupiny ATB, zejména pak beta-laktamů, což je spojeno s produkcí beta-laktamázy. Dalším podstatným mechanismem rezistence je modifikace cílového místa, což vede k neschopnosti vázání ATB na určené struktury. (20)

PRODUKCE BETA-LAKTAMÁZ

Penicilin byl původně objeven na základě svého účinku na stafylokoky a následně využíván jako účinný prostředek k léčbě infekcí způsobených těmito bakteriemi. Bohužel však brzy po jeho zavedení do praxe vznikl problém rezistence, který byl spojen s produkcí enzymu beta-laktamázy, do které spadá penicilináza. Penicilinázy jsou enzymy serinového typu, jejichž geny jsou často kódovány na plasmidech. Hlavní funkcí penicilináz je rozkládání beta-laktamového kruhu u beta-laktamových ATB. Navíc, penicilinový typ rezistence představuje vícestupňovou formu odolnosti, kde citlivost k ATB postupně klesá s narůstající koncentrací tohoto léčiva. (21)

ZMĚNA CÍLOVÉHO MÍSTA

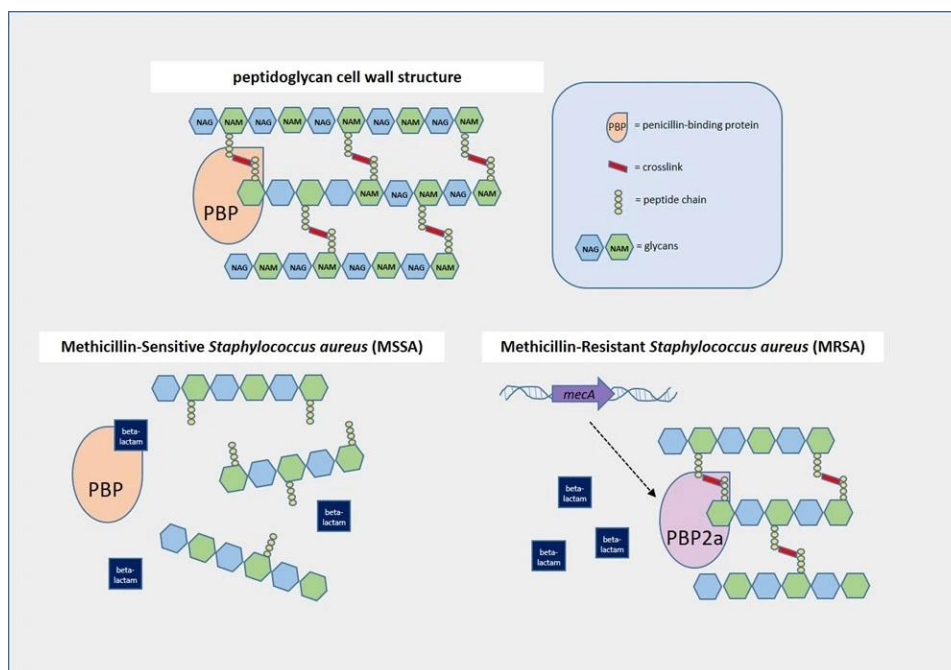
Modifikace cílového místa působení představuje u stafylokoků nejvýznamnější mechanismus rozvoje rezistence k ATB. Tento mechanismus spočívá v úpravě nebo zablokování cílové struktury, což má za následek snížení nebo úplnou inhibici afinity k ATB. Mezi tyto významné rezistentní druhy spadá zkřížená rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B (MLS_B rezistence), meticilin-rezistentní stafylokoky (MRSA), vankomycin-rezistentní stafylokoky (VRSA) a vankomycin-intermediálně rezistentní stafylokoky (VISA). (22; 23)

4.3.1 MRSA

MRSA, také označovaná jako „superbakterie“ představuje podtyp bakterie *S. aureus*, který vykazuje rezistenci vůči meticilinu a dalším beta-laktamovým ATB, jež běžně slouží k léčbě bakteriálních infekcí. Tento specifický typ rezistence dále může zahrnovat také odolnost vůči dalším třídám ATB.

S. aureus má peptidoglykanovou buněčnou stěnu. Tato stěna obsahuje střídající se molekuly N-acetylglukosaminu (NAG) a N-acetylmuramové kyseliny (NAM), které jsou zesíleny příčnými vazbami vytvořenými proteiny vázajícími penicilin (PBP). Tyto proteiny jsou cílem beta-laktamových antibiotik. U kmenů *S. aureus* citlivých na meticilin (MSSA) tato antibiotika vážou PBP a zabráňují tvorbě příčných vazeb, čímž narušují syntézu buněčné stěny.

Rezistence MRSA vzniká důsledkem přítomnosti specifického proteinu nazývaného PBP2a. Tento protein je upravenou verzí běžného proteinu PBP2. Transformace PBP2 na PBP2a je zprostředkována genetickým materiálem bakterie, konkrétně elementem nazývaným *mecA*, který obsahuje gen pro PBP2a. Gen *mecA* je umístěn na chromozomové kazetě stafylokoka označované jako *SCCmec* (*Staphylococcal Chromosome Cassette mec*), která má schopnost přenášet se mezi různými kmeny grampozitivních bakterií. Struktura PBP2a se od běžného PBP2 liší hlavně v aktivním místě, kde interaguje s beta-laktamovými antibiotiky viz **Obrázek 2**. Klíčovou změnou je nahrazení aminokyseliny serin alaninem v takzvaném serinovém penicilinovém vazebném motivu, což snižuje afinitu antibiotika k aktivnímu místu proteinu a umožňuje tak bakteriím odolávat účinku beta-laktamových antibiotik. (37)



Obrázek 2 Schéma mechanismu rezistence MRSA

Zdroj: (37)

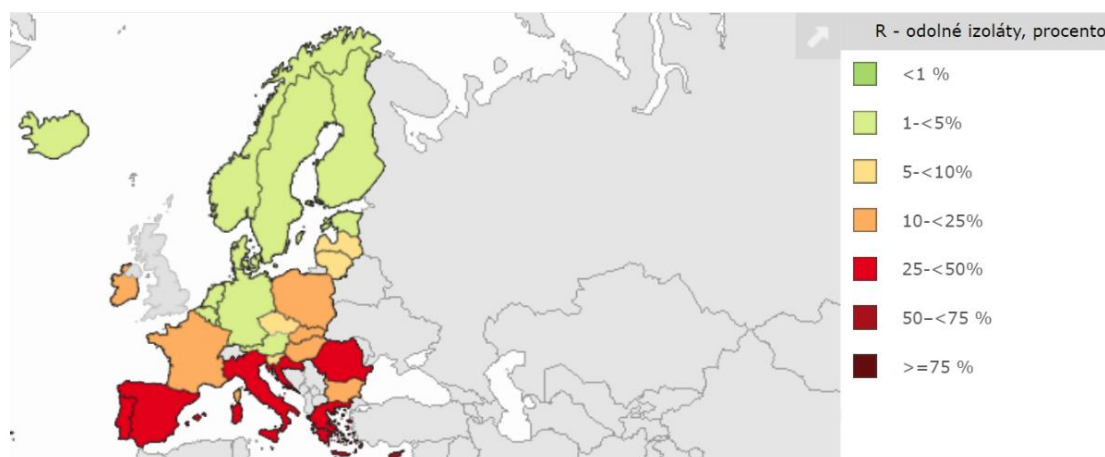
MRSA představuje významný problém ve zdravotnictví, způsobuje endemický výskyt v nemocnicích po celém světě a stává se jednou z hlavních příčin morbidity a mortality ve společnosti.

Infekce spojené s MRSA mohou být rozděleny do dvou hlavních kategorií: nemocniční (*health care-associated MRSA*, HA-MRSA) a komunitní (*community-associated MRSA*, CA-MRSA). **HA-MRSA** infekce se často vyskytují u imunokompromitovaných pacientů, zejména po chirurgických zákrocích, a jsou přenášeny přímým kontaktem s infikovanými ranami prostřednictvím kontaminace rukou nebo zdravotnických prostředků. Naopak, **CA-MRSA** postihují zdravé jedince mimo nemocnice nebo ty, kteří nedávno podstoupili chirurgický zákrok. I přesto, že obě formy MRSA pocházejí z jedné bakterie, každá z nich vykazuje zcela odlišné faktory rezistence a virulence. Významným znakem některých izolátů CA-MRSA je produkce genového toxinu Panton-Valentine leukocidin. Tento toxin zajišťuje transformaci tkání hostitele na živiny nezbytné pro prosperitu stafylokoka. Mechanismem působení tohoto exotoxinu spočívá v likvidaci místních leukocytů a dalších obranných buněk hostitele, což mu umožňuje projevit se jako virulentní superantigen. Také proto jsou izoláty CA-MRSA spojovány s různými typy infekcí, včetně infekcí měkkých tkání, exacerbace

atopické dermatitidy, nekrotizující fasciitidy, nekrotizující pneumonie, sepse a syndrom toxického šoku. Predispoziční faktory pro infekci CA-MRSA zahrnují diabetes mellitus a dlouhodobou antibiotickou terapii. Naopak, HA-MRSA jsou spojeny s dermatitidami, otravami jídlem, infekcemi kostí, bakterémií a infekcemi implantovaných pomůcek (srdeční chlopně, kloubní náhrady, ...). Většina nemocnic ustanovila ochranná opatření sloužící ke sledování MRSA infekcí a k eliminaci šíření infekce z osoby na osobu. Při každém novém případě je vyžadováno hlášení epidemiologovi příslušné nemocnice, následované adekvátními opatřeními, jako je izolace postiženého jedince a zachování vysoké úrovně osobní hygieny, zejména hygiena rukou. (11; 15; 22)

Epidemiologie MRSA v Evropě

MRSA představuje významný faktor v rozvoji infekcí odolných vůči ATB, což vyžaduje systematické monitorování a zaznamenávání. Aktuální výkonný souhrn údajů o rezistenci proti ATB v Evropě za rok 2022 reflektuje významné regionální rozdíly v prevalenci MRSA mezi evropskými státy. Tento dokument konstatuje vysoké procentuální hodnoty rezistence v zemích ležících na jihu a východě Evropy, zatímco nižší hodnoty jsou evidovány na severu a západě Evropy. Detailní informace o rozšíření MRSA v jednotlivých zemích byly získány díky poskytnutí dat všech členských zemí Evropské unie a Evropského hospodářského prostoru (EU/EEA) do sítě evropského monitorování antibiotické rezistence (EARS-Net). Tato data, týkající se diagnostikovaných případů z invazivních izolátů, potvrzují jednoznačně geografické variace v prevalenci MRSA, což je patrné z **Obrázku 3**. (24; 25)

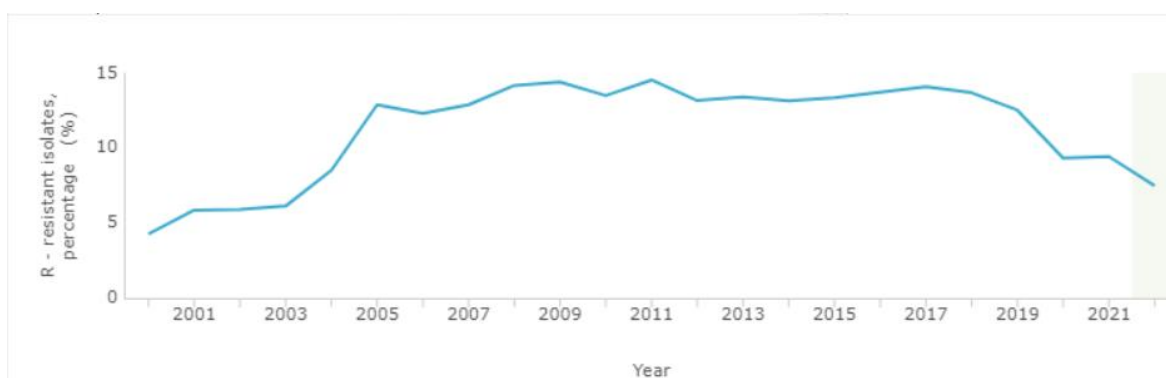


Obrázek 3 Znárodnění procentuálního podílu invazivních izolátů MRSA v roce 2022 v jednotlivých zemích Evropy

Zdroj: (25)

Data shromážděná ECDC v období od roku 2000 do roku 2022 lze pozorovat dynamiku výskytu MRSA v České republice. Prvních pět let tohoto období charakterizuje výrazný nárůst prevalence, kdy došlo od roku 2000 k roku 2005 k ztrojnásobení výskytu z 4,3 % na 12,9 %. Nejvyšší výskyt MRSA byl zaznamenán v roce 2011, kdy dosáhl hodnoty 14,5 %. Postupně v průběhu let dochází k mírnému poklesu, přičemž v roce 2018 byl výskyt MRSA snížen na 13,7 %. Nadále pokračuje pokles strměji až do posledního sledovaného roku, tedy roku 2022, kdy byl zaznamenán výskyt na úrovni 7,5 %, což je zobrazeno na **Obrázku 4**. Je třeba poznamenat, že pokles výskytu MRSA během pandemie covid-19, která propukla na začátku roku 2020, by mohl být způsoben nedostatkem systematického sledování a screenování tohoto patogenu. Skutečný dopad pandemie na výskyt MRSA bude možné zhodnotit až na základě podrobných dat z následujících let.

(25)



Obrázek 4 Podíl invazivních izolátů MRSA v letech 2000-2022 v České republice

Zdroj: (25)

4.3.2 MLS_B rezistence

Rezistence vůči makrolidům, linkosamidům a streptograminu B představuje způsob odolnosti bakterií vůči ATB, které zahrnují makrolidy (například erytromycin), linkosamidy (jako klindamycin) a streptogramin B. Tento mechanismus rezistence je spojen s modifikací cílového místa, které mají tato ATB společné, a to na ribozomu. Tato modifikace zabraňuje efektivní interakci s ATB a jeho následnému působení. Odolnost vůči ATB může vzniknout prostřednictvím různých mechanismů. Často je tato rezistence regulována geny *erm*, zvláště u stafylokoků dominují geny *ermA* a *ermC*. Tyto geny jsou odpovědné za tvorbu ribozomální metylázy (erythromycin ribosomal methylase), což je enzym, jenž provádí modifikaci cílového místa působení všech ATB z MLS_B skupiny prostřednictvím methylace 23S rRNA na ribozomu. Existují dvě hlavní formy exprese rezistence v rámci

skupiny MLS_B – konstitutivní a induktivní. V případě konstitutivní rezistence dochází k průběžné a stabilní syntéze metylázy s aktivní účastí mRNA, což vede k vývoji rezistence vůči všem ATB z MLS_B skupiny. Naopak u induktivní rezistence se vytváří neaktivní mRNA, jejíž aktivace vyžaduje přítomnost specifického induktoru. Teprve poté dochází k započatí syntézy metylázy, a tím i k rozvoji rezistence. Vzácně může rezistence vůči ATB plynout i z mutací v chromozomálních genech, jež kódují ribozomální proteiny. (34)

4.3.3 VRSA a VISA

VRSA identifikuje kmeny *S. aureus*, které vykazují rezistenci vůči vankomycinu. Tuto rezistenci způsobuje přítomnost genu *vanA*, který je přenesen od enterokoků. Kmeny s touto formou rezistence jsou někdy označovány jako GRSA (*glycopeptide-resistant S. aureus*). Tento druh rezistence má v klinické praxi větší význam než VISA. V současné době nejsou tyto kmeny v České republice zaznamenány a nejsou vysoce zastoupeny ani ve světě, přičemž nejvyšší výskyt je hlášen ze Spojených států amerických.

VISA označuje kmeny *S. aureus*, které vykazují intermediární rezistenci vůči vankomycinu v důsledku tvorby abnormálně silné buněčné stěny. Tyto kmeny jsou občas označovány termínem GISA (*glycopeptide-intermediate resistant S. aureus*). Příčinou selhání vankomycinu je často nedostatečná dávka tohoto ATB. (26)

5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA STAFYLOKOKŮ

Při stanovení stafylokokové infekce se běžně využívá přímá kultivace a mikroskopie. Pro průkaz se vhodný biologický materiál odvozuje od typu onemocnění. Hlavním materiálem následné analýzy jsou často tekutiny, zejména hnis. Dále se využívá krev pro hemokultivaci, sputum, exudáty, aspiráty, moč, různé typy stěrů a po případě i jiné materiály. Při vyšetření na stafylokoky není zapotřebí žádných speciálních opatření pro odběr a transport vzorku. Klíčové je však zabránit kontaminaci. (2; 3; 8)

5.1 Mikroskopie

Mikroskopický preparát je podroben barvení dle Grama, což umožňuje identifikaci grampozitivních koků v shlucích spolu s výrazným zastoupením leukocytů. I přes tuto úvodní analýzu toto vyšetření není schopno spolehlivě rozlišit stafylokoky od ostatních grampozitivních koků. V klinické praxi se proto často obracíme k dalším specifickým vyšetřením, která umožňují přesnější identifikaci daného mikroorganismu. (3; 6)

5.2 Kultivace

Stafylokoky rostou na standardních kultivačních médiích, pro kultivaci se primárně využívá krevní agar obsahující 5% beraní krve. Na tomto médiu inkubovaném při 37°C po dobu 24 hodin vykazují tvorbu hladkých kolonií s rovnými okraji o průměru 1-3 mm. Tyto kolonie mohou vykazovat variabilní barvu od smetanové po zažloutlou až oranžovou. Kmeny, které produkují alfa-hemolýzu, jsou obklopeny zónou kompletní hemolýzy, zatímco při beta-hemolýze vytvářejí částečnou hemolýzu což je patrné z **Obrázku 5**.



Obrázek 5 *S. aureus* na krevním agaru s beta-hemolýzou (foceno s podsvícením)

Zdroj: (27)

Pro detekci kontaminovaných vzorků se využívají selektivně diagnostická média. Prvním z nich je slaný agar s mannitolem a fenolovou červení, kde stafylokoky, především *S. aureus* štěpící manitol, vykazují růst ve formě žlutých kolonií. Manitol neštěpící druhy, zahrnující většinu koaguláza-negativní stafylokoky, produkují kolonie s červenou barvou. Baird-Parkerův agar slouží k izolaci koaguláza-pozitivních stafylokoků. Jeho agarový substrát obsahuje pyruvát sodný a žloutkovou emulzi, což podporuje růst *S. aureus*. Přítomnost chloridu lithného a telluricitanu draselného inhibuje nežádoucí mikroorganismy. *S. aureus* vytváří lesklé černé kolonie a proteolytické enzymy, které produkuje a způsobují projasnění okolní oblasti. Na tekutých médiích vykazují růst ve formě zákalu. Pro zachycení a identifikaci MRSA jsou používána chromogenní média, jež jsou selektivní pro MRSA díky obsahu ATB, například cefoxitinu. (8; 27)

5.3 Identifikace kmenů *S. aureus*

5.3.1 MALDI-TOF MS

Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) vychází z principu rozdělování nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Prostřednictvím této techniky analyzujeme odběr malého vzorku bakteriální kultury. Základem metody je analýza a profilování proteinů. Na kovovou destičku se nanese kolonie zkoumaného agens, doplní se matricí a nechá se uschnout při pokojové teplotě. Následně je destička vložena do přístroje, kde je tato směs osvětlena laserem. Matrice po osvětlení absorbuje energii, rozkládá se a zároveň ionizuje molekuly vzorku. Dojde k uvolnění iontů, které putují skrz prostor přístroje, přičemž jejich pohyb je ovlivněn elektrickým polem. Doba letu se zaznamenává. Získané hmotnostní spektrum, specifické pro daný mikroorganismus, je automaticky porovnáno softwarem s databází referenčních hmotnostních spekter. Výsledkem je hodnota, která vyjadřuje míru shody mezi oběma hmotnostními spektry, poskytující identifikaci mikroorganismu. Tato rychlá a přesná metoda má široké spektrum využití při zjišťování různých mikroorganismů s vynikající úspěšností v určování stafylokoků. (3; 7; 28)

5.3.2 Biochemické testy

Biochemická identifikace mikroorganismů spočívá v provedení série biochemických testů, kde jsou výsledky porovnávány s charakteristikami známých druhů. Tento přístup využívá skutečnost, že každý bakteriální druh produkuje specifickou sestavu enzymů. Testy

jsou realizovány buď ve zkumavkách nebo formou mikro testů, přičemž výsledkem je detekce změn nebo formování specifického zbarvení. Biochemické testy se k dourčování bakterií v klinické praxi využívají velmi málo. Ve většině případů byly plně nahrazeny MALDI-TOF identifikací. U stafylokoků se v některých případech používají testy k detekci koagulázy pro odlišení koaguláza pozitivních a negativních stafylokoků. (6; 29)

5.3.3 Sérologické testy

Metoda ELISA je založena na imunochemické interakci mezi antigeny a specifickými protilátkami, přičemž tyto protilátky jsou značeny enzymem. Tímto způsobem je možné u stafylokoků detekovat produkované toxiny. Metoda nalézá využití zejména v Národních referenčních laboratořích. (30)

5.3.4 Molekulární metody

V případech, kdy tradiční kultivační metody selžou při identifikaci patogenů, nabízejí se moderní molekulární techniky. Tyto přístupy poskytují vysokou citlivost a specifčnost, což umožňuje rychlou a přesnou identifikaci druhů stafylokoků a dalších charakteristik. Mezi významné metody molekulární diagnostiky stafylokoků patří 16S sekvenace, která využívá technologii polymerázové řetězové reakce. 16S sekvenace při své analýze zaměřuje svou pozornost na genetickou informaci obsaženou v 16S ribozomální RNA (rRNA) genu bakterií, který má klíčovou roli v procesu syntézy proteinů v bakteriálních buňkách. Tento gen, známý jako 16S rRNA, zahrnuje hypervariabilní oblasti, které projevují odlišnosti mezi různými bakteriálními druhy, což usnadňuje jejich taxonomické zařazení. Sekvenací tohoto genu lze identifikovat konkrétní bakterie a provádět detailní analýzy mikrobiálních společenstev. Tato metoda se uplatňuje v identifikaci patogenů a taxonomickém zařazení bakterií na základě genetických informací. (9; 31)

5.3.5 Testování citlivosti k antibiotikům

Cílem testování je primárně identifikovat citlivost konkrétního mikroorganismu k ATB, což následně umožňuje navrhnout správnou léčbu s maximální účinností. Pro vyšetření izolovaného infekčního agens je možné zvolit, jak kvalitativní analýzu často prováděnou pomocí diskové difuzní metody, tak i kvantitativní stanovení pomocí diluční metody pro určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo minimální baktericidní koncentrace (MBC). Alternativně lze využít metody vyočkováním nebo E-testu.

Disková difuzní metoda

Základem této metody je potlačení růstu zkoumaného bakteriálního kmene pomocí ATB, které difunduje koncentračním gradientem v agarové kultivační půdě z testovacího disku. Testovací disk tvoří filtrační papír nasycený přesně stanoveným množstvím ATB. Pro tuto techniku se typicky využívá Mueller-Hintonova půda. Po inkubaci 18–24 hodin při teplotě 37 °C vzniká inhibiční zóna kolem disku s ATB. Velikost této zóny v milimetrech následně slouží jako kritérium pro kategorizaci mikroorganismu jako citlivého nebo rezistentního vůči testovanému ATB.

Stanovení MIC

V situacích, kdy kvalitativní stanovení citlivosti není dostatečné, dochází k provedení dilučního testu. Tento postup zahrnuje očkování zkoumaného kmene do médií s koncentračním gradientem testovaných ATB, buď ve formě řady zkumavek nebo mikrotitrační destičky. Po inkubaci je sledován stupeň zkalení média nebo sedimentace. První jamka v řadě, kde došlo k potlačení růstu a médium zůstává čiré, poskytuje informaci o minimální inhibiční koncentraci. (3; 5)

Detekce MRSA

V současné době je k dispozici rozsáhlé množství metod pro identifikaci izolátů MRSA. Kritériem pro efektivitu těchto metod je rychlost, přesnost a citlivost. Diagnostika MRSA využívá přímé metody, jako je mikroskopie a kultivace na pevných i tekutých půdách, kde se uplatňují hlavně selektivní diagnostické média, obsahující kombinaci ATB, včetně cefoxitinu a oxacilinu. Přímá identifikace MRSA je dosažena přidáním chromogenního substrátu, jenž je štěpen glukosidázou produkovanou kmeny *S. aureus*, vytvářející barevný komplex. Kromě toho je nezbytné provést kultivaci vzorků i na neselektivní půdě, neboť některé kmeny MRSA mohou vykazovat nízkou rezistenci k oxacilinu a mohly by být na selektivní půdě nesprávně považovány za citlivé. Mezi další metody detekce se řadí disková difuzní metoda pomocí disku s cefoxitinem, PCR pro identifikaci genů *mecA* nebo *mecC* a metoda latexové aglutinace pro detekci proteinu PBP2a. Široce využívaná je zde metoda MALDI-TOF MS. Rutinní klinické testy mohou opomenout velkou část pacientů, kteří jsou tichými nositeli MRSA a mohou fungovat jako rezervoáry pro další šíření. Pro kontrolu šíření tohoto zvláště virulentního patogenu bylo zavedeno aktivní sledování screeningu na MRSA. Identifikace populace kolonizovaných

jedinců zahrnuje odběr mikrobiologických vzorků od pacientů s rizikovými faktory, i když nevykazují příznaky infekce. Strategie screeningu může zahrnovat metody s rychlou odezvou, například PCR nebo kultivaci, avšak je třeba zdůraznit, že žádná metoda není stoprocentně spolehlivá. Praktický přístup spočívá v kombinaci různých metod, aby se minimalizovalo riziko falešně pozitivních nebo negativních výsledků. (32; 33)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo seznámit se s problematikou stafylokokových infekcí, jejich epidemiologií, možnostmi terapie a laboratorní diagnostikou. Praktická část se zaměřuje na statistické zpracování výskytu kmenů *S. aureus* ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2020 až 2023, se zaměřením na kmeny MRSA.

6.2 Dílčí cíle

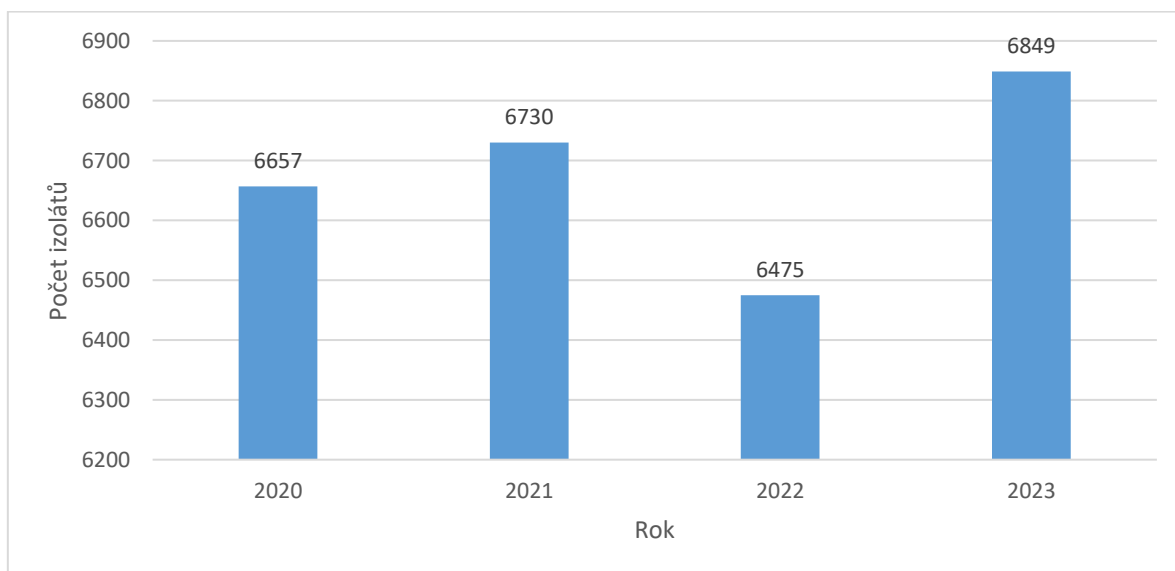
1. Popsat výskyt MRSA a posoudit vývoj rezistence MRSA v uvedeném časovém období.
2. Popsat faktory ovlivňující výskyt MRSA, jako jsou patientské charakteristiky, které mohou ovlivnit výskyt MRSA.
3. Popsat výskyt rezistenci na základní ATB v uvedeném časovém období.

7 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT DETEKCE MRSA KMENŮ VE FN PLZEŇ ZA OBDOBÍ 2020-2023

V rámci praktické části byla statisticky zpracovávána záchytnost kmenů *S. aureus* a jeho meticilin-rezistentní formy ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2020 až 2023. Data byla získána a zpracována pomocí laboratorního informačního systému LIS a následně vizualizována pomocí tabulek a grafů v programu Microsoft Excel.

7.1 Obecná statistika záchytu kmenů *S. aureus* ve FN Plzeň za období 2020-2023

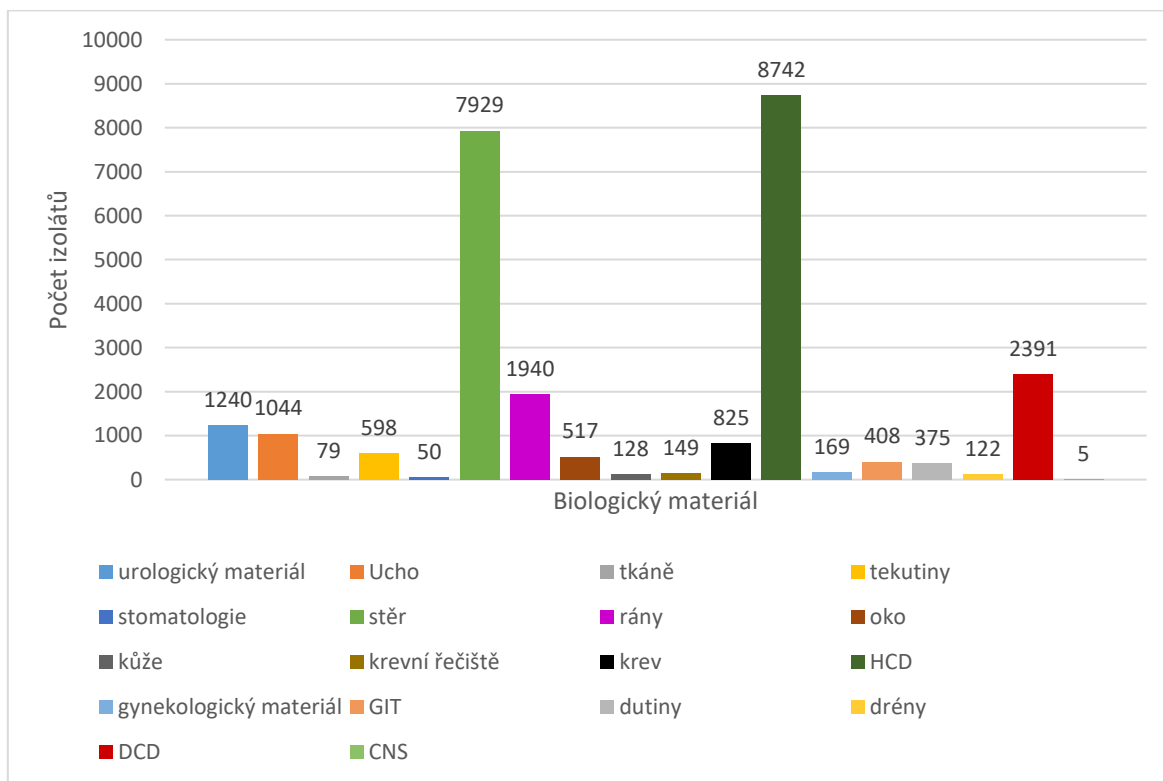
Během sledovaného období čtyř let bylo reportováno celkem 26 711 biologických materiálů s přítomností kmene *S. aureus* bez ohledu na jejich citlivost. Tato data nebyla očištěna o duplicity, tzn. jsou započítány i opakované záchyty od jednoho pacienta. **Graf 1** zobrazuje četnost záchytu kmenů *S. aureus* za jednotlivé roky, a ukazuje že nejvyšší počet detekovaných případů stafylokoků byl zaznamenán v roce 2023 ($n = 6\,849$). Naopak, nejnižší počet případů byl zaznamenán v roce 2022 ($n = 6\,475$).



Graf 1 Počty detekovaných izolátů kmene *S. aureus* za jednotlivé roky sledovaného období 2020-2023

Graf 2 podrobně zobrazuje nejčastěji zpracováváné biologické materiály s přítomností kmene *S. aureus*. Nejčastěji se jednalo o materiály z horních cest dýchacích ($n = 8\,742$), zahrnující zejména výtěry z nosu, krku, a tonsil. V tomto případě se často jedná o pravidelné screeniny nosičství kmenů MRSA. Druhou nejčastější skupinou materiálů se záchytem zlatého stafylokoků jsou stěry z různých lokalit s počtem 7 929 záchytů. Mezi

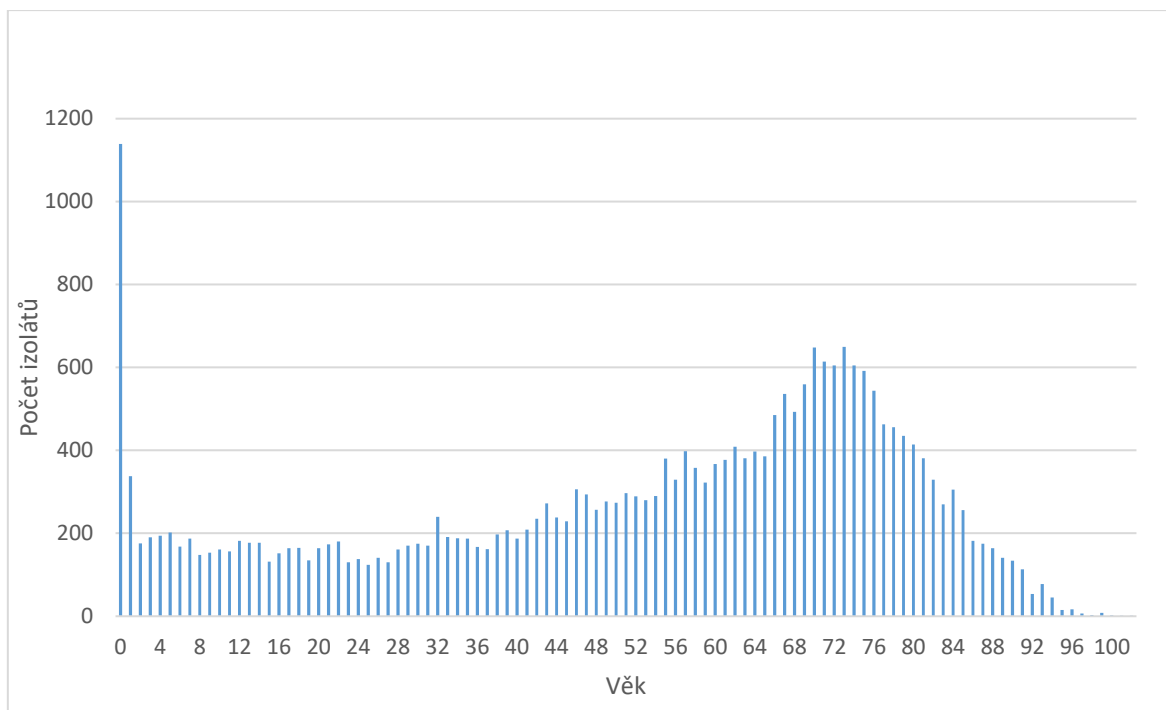
méně časté materiály s pozitivním průkazem *S. aureus* patří dolní cesty dýchací (n = 2 391), rány (n = 1 940), urologický materiál (n = 1 240), výtěry z ucha (n = 1 044), a další materiály.



Graf 2 Počty zpracovaných biologických materiálů s přítomností *S. aureus* za sledované období 2020-2023

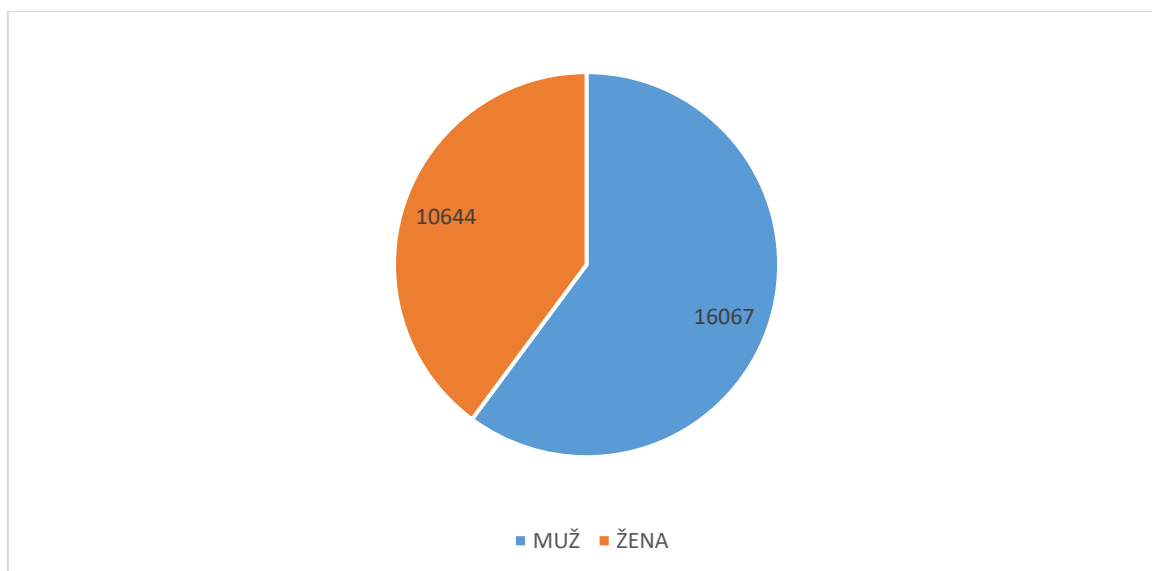
Legenda grafu: urologický materiál (moč, stěr z uretry), ucho (stěr), tkáně (stěr, tkáň placenty), tekutiny (hnis, punktát, aspirát, sekret), stomatologie (stěr – jazyk, ústa), stěr, rány (vřed, defekt, dekubit), oko (stěr), kůže (stěr kůže a puchýřů, výtěr nosu), krevní řečiště (implantáty, katetr), krev, HCD – horní cesty dýchací (výtěr – nos, krk, nosohltan, larynx, tonzil), gynekologický materiál (výtěr – hrdlo, pochva, stěr genitálie, očištění, placentární tkáň), GIT – gastrointestinální trakt (obsah žaludku, žluč, stolice, vřed), dutiny (hnis, drén, výtěr – píštěl, absces, furunkl), DCD – dolní cesty dýchací (sputum, aspirát, bronchoalveolární laváž, výtěr), CNS – centrální nervový systém (mok).

Graf 3 ukazuje trend nárůstu zachytu kmenů *S. aureus* se zvyšujícím se věkem pacienta, přičemž je možné pozorovat výrazný nárůst od 45 let. Kromě toho je z grafu je patrné, že nejpočetnější skupinou jsou nově narozené děti do 1 roku (n = 1139), což může být spojeno s opakovanými screeny možné kolonizace.



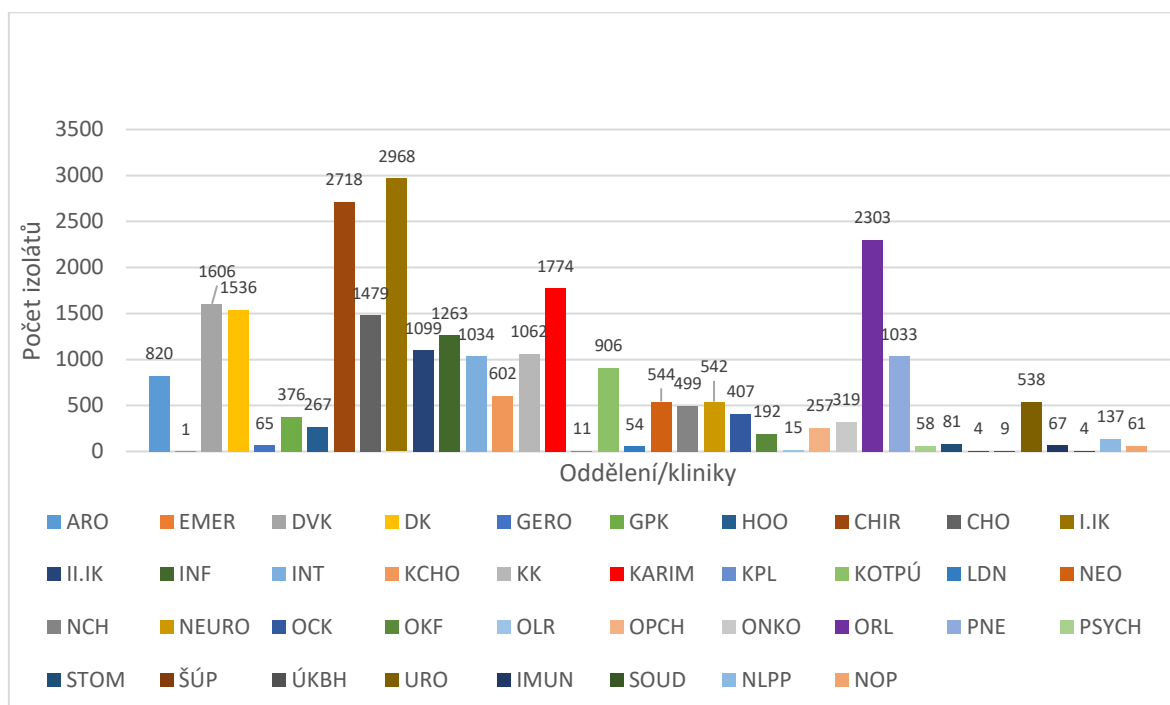
Graf 3 Počty detekovaných izolátů *S. aureus* dle věku za sledované období 2020-2023

V rámci poměru pohlaví byla zjištěna převaha pacientů mužského pohlaví s pozitivním záchytem kmenů *S. aureus* (60 %). Zbýlých 40 % záchytů pocházelo od žen. Početní zastoupení obou pohlaví je znázorněno v **Grafu 4**.



Graf 4 Počty detekovaných izolátů *S. aureus* dle pohlaví za sledované období 2020-2023

V **Grafu 5** jsou znázorněny počty detekovaných izolátů kmene *S. aureus* na základě oddělení/kliniky, kde byl pacient hospitalizován ve Fakultní nemocnici Plzeň. Z grafu je patrné, že největší počet pacientů se záchytem stafylokoků ($n = 2\,968$), byl zaznamenán na I. interní klinice. Další oddělení s významným počtem nálezů zahrnují chirurgickou kliniku ($n = 2\,718$), otorhinolaryngologii ($n = 2\,303$), kliniku anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny ($n = 1\,774$), dermatovenerologickou kliniku ($n = 1\,606$) a dětskou kliniku ($n = 1\,536$).

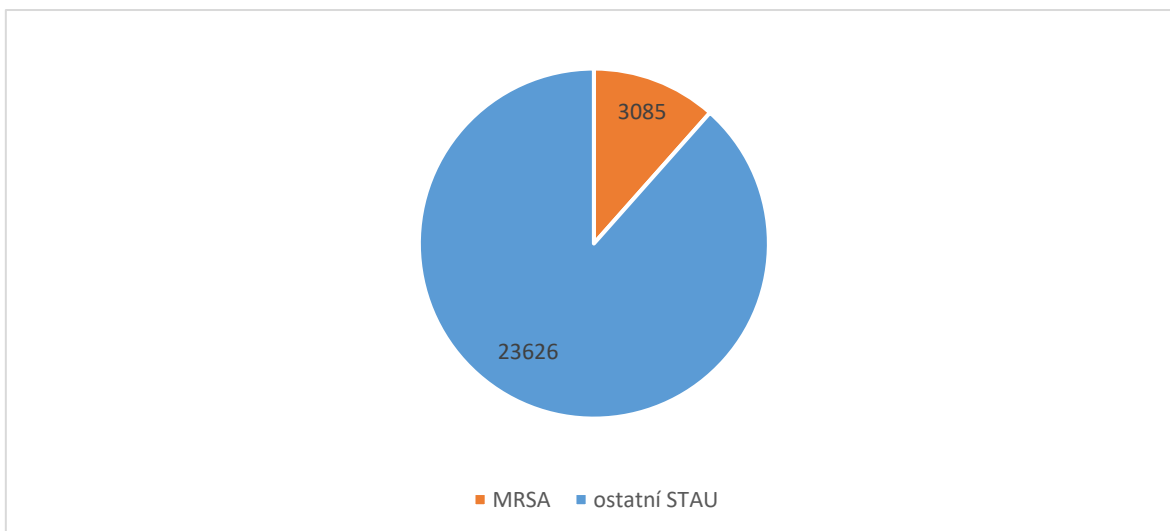


Graf 5 Počty detekovaných izolátů *S. aureus* dle oddělení za sledované období 2020-2023

Legenda grafu: ARO – Anesteziologicko-resuscitační oddělení, EMER – Centrální příjem, DVK – Dermatovenerologická klinika, DK – Dětská klinika, GERO – Geriatrické oddělení, GPK – Gynekologicko-porodnická klinika, HOO – Hematologicko-onkologické oddělení, CHIR – Chirurgická klinika, CHO – Chirurgické oddělení, I. IK – I. interní klinika, II. IK – II. interní klinika, INF – Infekční klinika, INT – Interní oddělení, KCHO – Kardiochirurgické oddělení, KK – Kardiologická klinika, KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, KPL – Klinika pracovního lékařství, KOTPÚ – Klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí, LDN – Lůžka dlouhodobě nemocných, NEO – Neonatologické oddělení, NCH – Neurochirurgická klinika, NEURO – Neurologická klinika, OCK – Oční klinika, OKF – Oddělení klinické farmakologie, OLR – Oddělení léčebné rehabilitace, OPCH – Oddělení plastické chirurgie, ONKO – Onkologie, ORL – Otorhinolaryngologie, PNE – Pneumologie, PSYCH – Psychiatrická klinika, STOM – Stomatologická klinika, ŠÚP – Šiklův ústav patologie, ÚKBH – Ústav klinické biochemie a hematologie, URO – Urologická klinika, IMUN – Ústav imunologie a alergologie, SOUP – Ústav soudního lékařství, NLPP – Útvar náměstka pro LPP, NOP – Útvar náměstkyň pro OP.

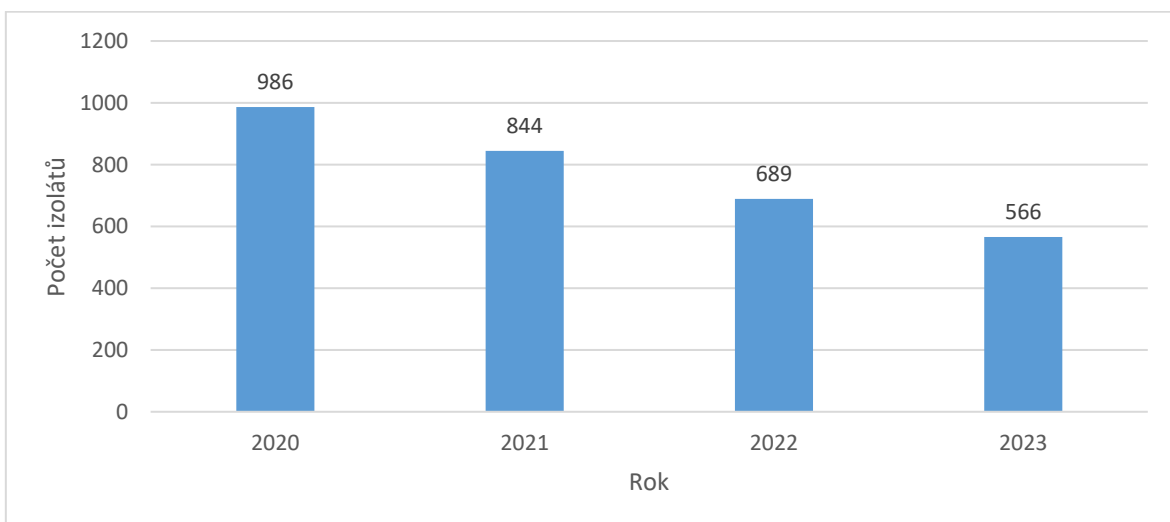
7.2 Obecné statistické zpracování dat záchytu MRSA kmenů

Během monitorovaného období bylo zjištěno celkem 3 085 materiálů obsahujících kmen MRSA, tedy 11,5 % z celkového počtu zachycených izolátů za sledované období 2020-2023 viz **Graf 6**. V této statistice části nebyla nezohledňována jejich možná duplicita.



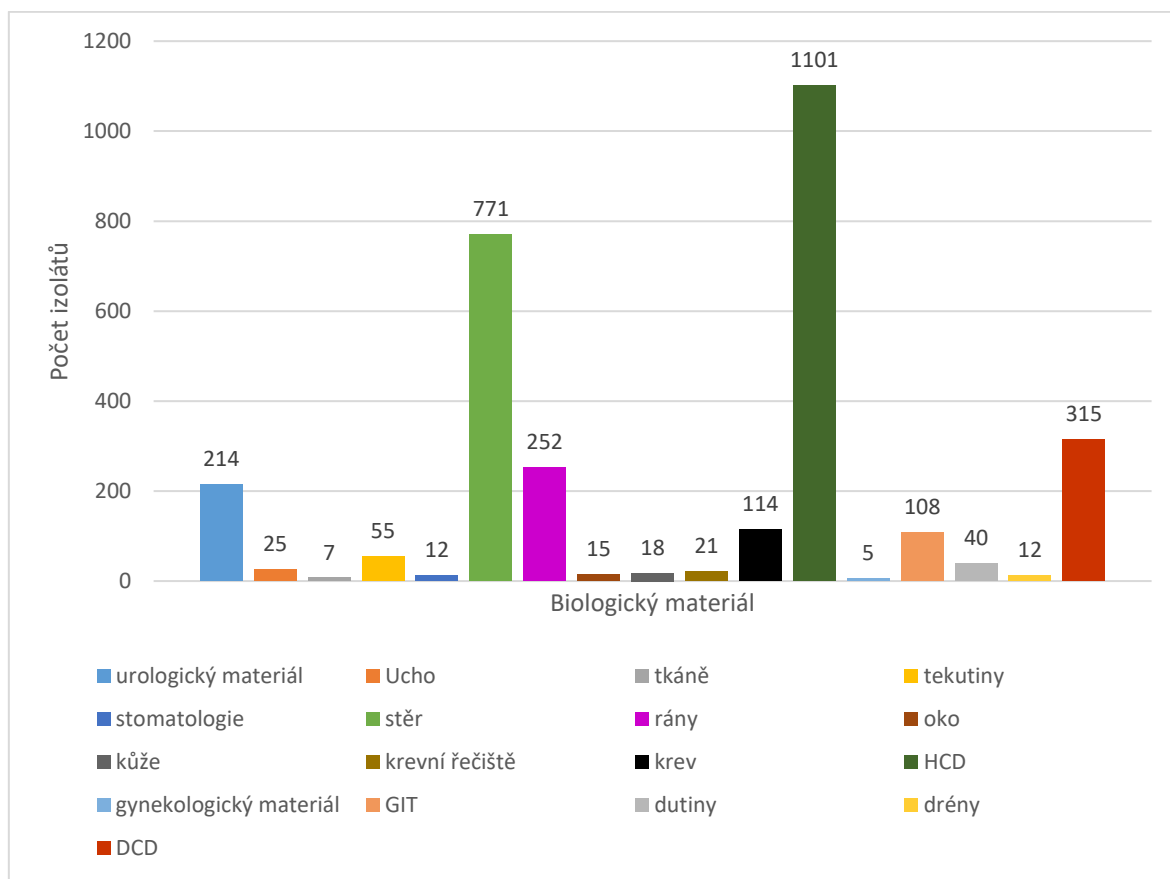
Graf 6 Počet detekovaných izolátů MRSA z celkového počtu izolátů *S. aureus* za sledované období 2020-2023

Z **Grafu 7** vyplývá, že počet záchytů kmenů MRSA se od roku 2020 postupně snižuje. V roce 2023 byl zaznamenán nejnižší počet případů MRSA. Tento trend může souviset s koncem pandemie covidu-19, během kterého bylo obecně detekováno zvýšené množství multirezistentů, nejen MRSA.



Graf 7 Počty detekovaných izolátů MRSA dle roku za období 2020-2023

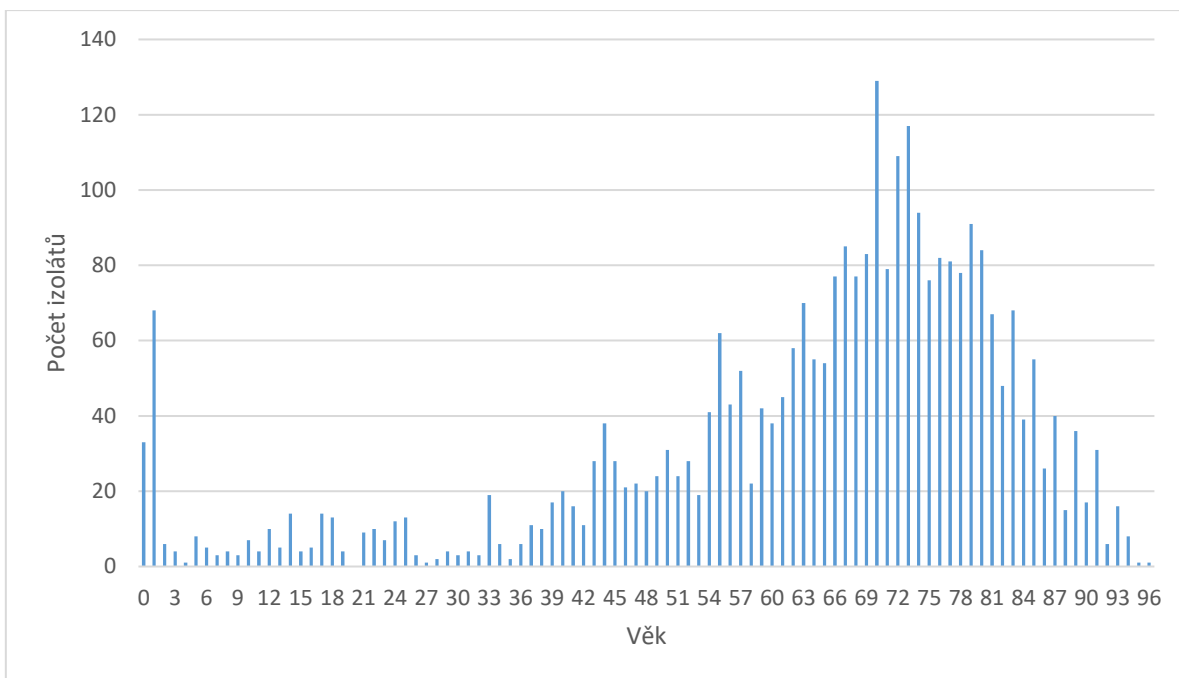
Graf 8 poskytuje přehled o typu zpracovaných materiálů, ve kterých byly kmeny MRSA nejčastěji detekovány. Nejčastějším materiálem byly materiály z horních cest dýchacích (n = 1 101), následně stěry (n = 771). Méně častými materiály s pozitivním průkazem MRSA byly urologické materiály, stěry z ran, krev a také vzorky z dolních cest dýchacích. Nejméně často se jednalo o gynekologický materiál.



Graf 8 Počty detekovaných izolátů MRSA dle materiálu za sledované období 2020-2023

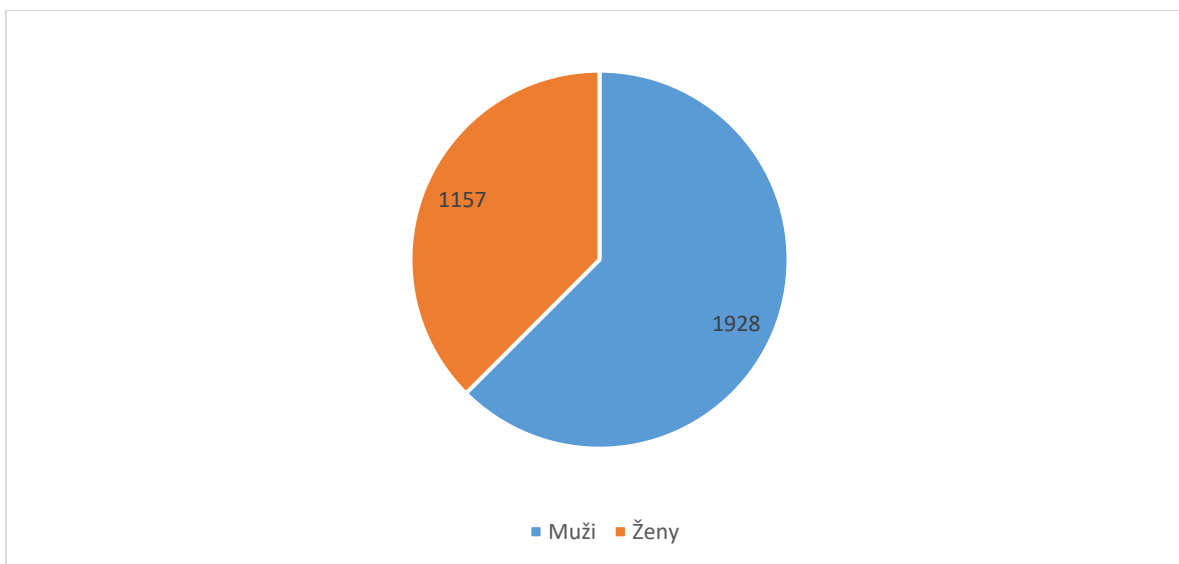
Legenda grafu: urologický materiál (moč, stěr z uretry), ucho (stěr), tkáň (stěr, tkáň placenty), tekutiny (hnis, punktát, aspirát, sekret), stomatologie (stěr - jazyk, ústa), stěr, rány (vřed, defekt, dekubitus), oko (stěr), kůže (stěr kůže a puchýřů), krevní řečiště (implantát, katetr), krev, HCD – horní cesty dýchací (výtěr - nos, krk, nosohltan, larynx, tonzil), gynekologický materiál (výtěr - hrdlo, pochva, stěr genitálie, očištění, placentární tkáň), GIT – gastrointestinální trakt (obsah žaludku, žluč, stolice, vřed), dutiny (hnis, drén, výtěr-píštěl, absces, furunkl), DCD – dolní cesty dýchací (sputum, aspirát, bronchoalveolární laváž, výtěr).

V **Grafu 9** je znázorněno věkové zastoupení pacientů s pozitivní detekcí izolátů MRSA. Nejvyšší počet kmenů bylo detekováno u pacientů ve věku 70 let (n = 129). Nárůst počtu detekovaných kmenů MRSA v biologickém materiálu je patrný již od 37 let.



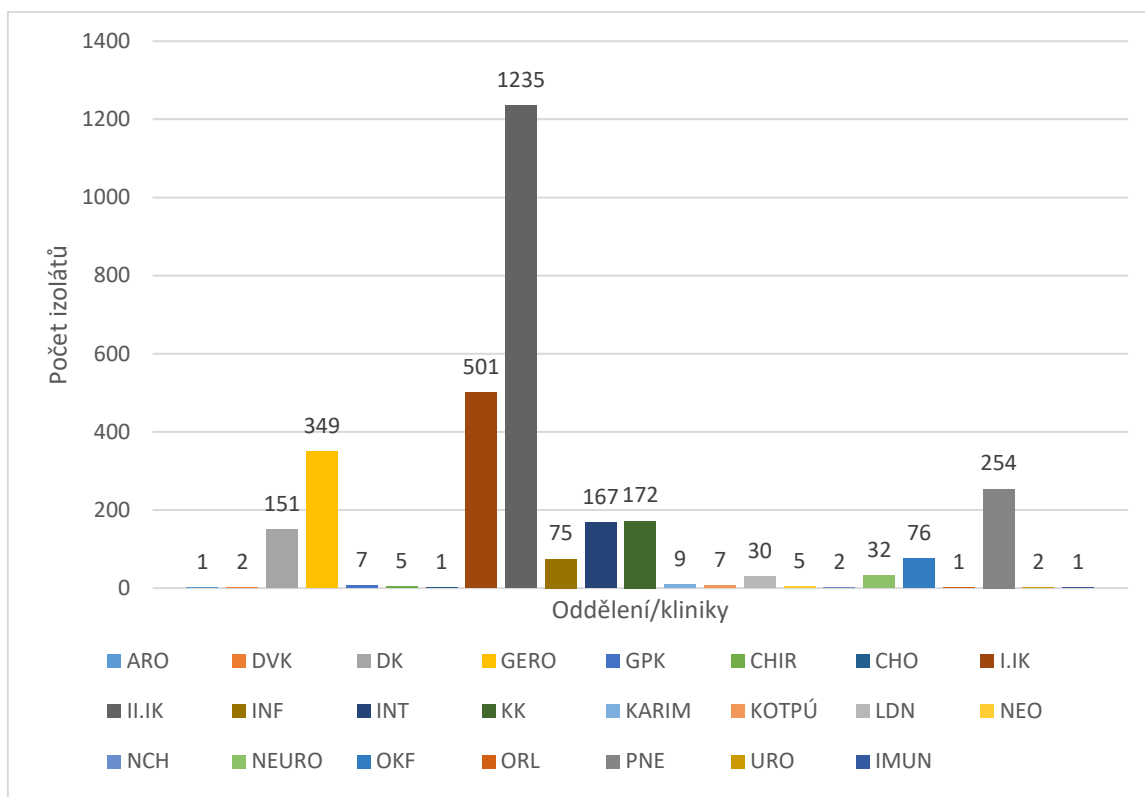
Graf 9 Počty detekovaných izolátů MRSA dle věku za sledované období 2020-2023

Graf 10 ukazuje počty detekovaných izolátů MRSA v závislosti na pohlaví pacienta. Podobně jako u kmenů *S. aureus*, většina detekovaných izolátů MRSA pocházela od mužů (62,5 %). Zbýlých 37,5 % MRSA izolátů pocházela od žen.



Graf 10 Počty detekovaných izolátů MRSA dle pohlaví za sledované období 2020-2023

Graf 11 ukazuje počet zachycených izolátů MRSA na jednotlivých odděleních FN Plzeň. Nejvyšší záchyt byl zaznamenán na II. interní klinice, a to konkrétně 1 235 izolátů. Další významný počet, 501 izolátů, byl zaznamenán na I. interní klinice. Naopak, nejméně případů MRSA bylo na Anesteziologicko-resuscitačním oddělení, Chirurgickém oddělení, Otorhinolaryngologii a Ústavu imunologie a alergologie.



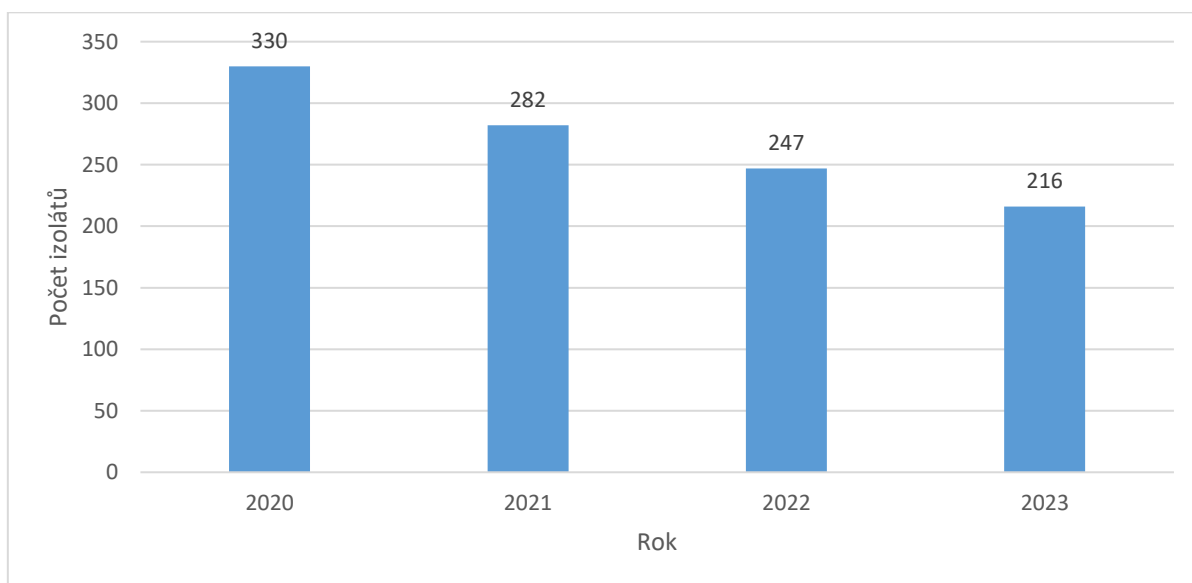
Graf 11 Počty detekovaných izolátů MRSA dle oddělení za sledované období 2020-2023

Legenda grafu: ARO – Anesteziologicko-resuscitační oddělení, DVK – Dermatovenerologická klinika, DK – Dětská klinika, GERO – Geriatrické oddělení, GPK – Gynekologicko-porodnická klinika, CHIR – Chirurgická klinika, CHO – Chirurgické oddělení, I.IK – I. interní klinika, II.IK – II. interní klinika, INF – Infekční klinika, INT – Interní oddělení, KK – Kardiologická klinika, KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, KOTPÚ – Klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí, LDN – Lůžka dlouhodobě nemocných, NEO – Neonatologické oddělení, NCH – Neurochirurgická klinika, NEURO – Neurologická klinika, OKF – Oddělení klinické farmakologie, ORL – Otorhinolaryngologie, PNE – Pneumologie, URO – Urologická klinika, IMUN – Ústav imunologie a alergologie.

7.3 Statistické zpracování neduplicitních dat kmenů MRSA

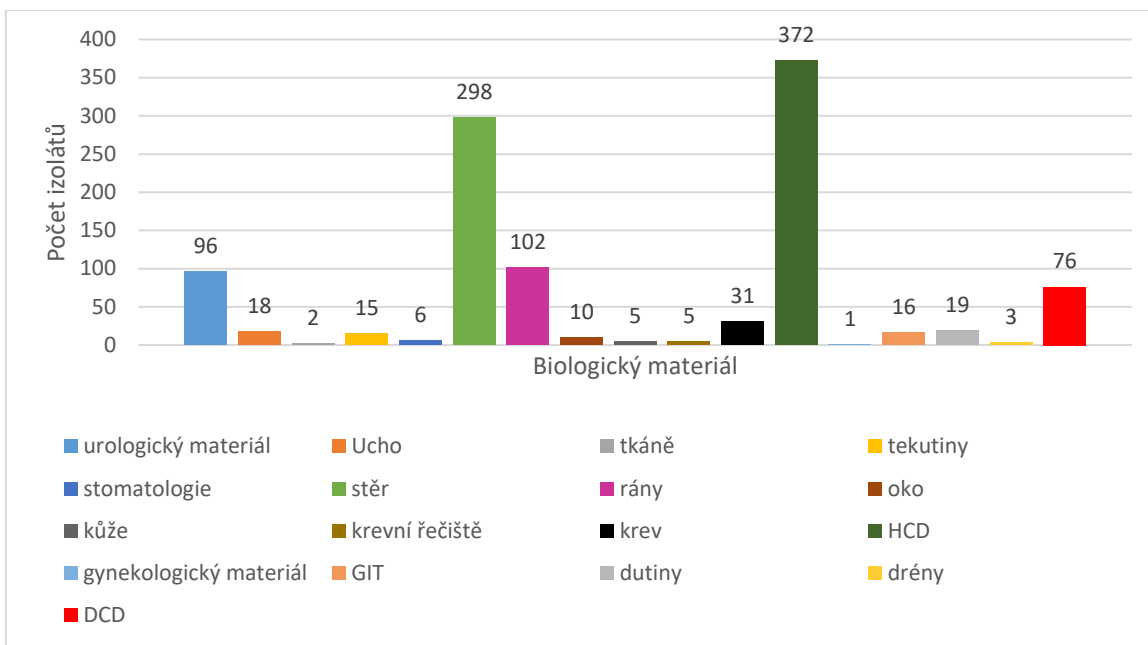
V poslední části statistického zpracování byly předchozí data zachytnosti MRSA kmenů očištěna o duplicity. V této části jsou tedy zpracovány pouze prvozáchyty od každého pacienta. Z celkového počtu 3 085 zachycených kmenů MRSA se jednalo v 1 075 případech o prvozáchyty.

Graf 12 naznačuje postupný pokles počtu pacientů s MRSA během sledovaných let, což může být způsobeno již zmíněným koncem pandemie covidu-19 a snížením selektivního tlaku ATB podávaných pacientům často jako profylaxe.



Graf 12 Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA v jednotlivých letech za sledované období 2020-2023

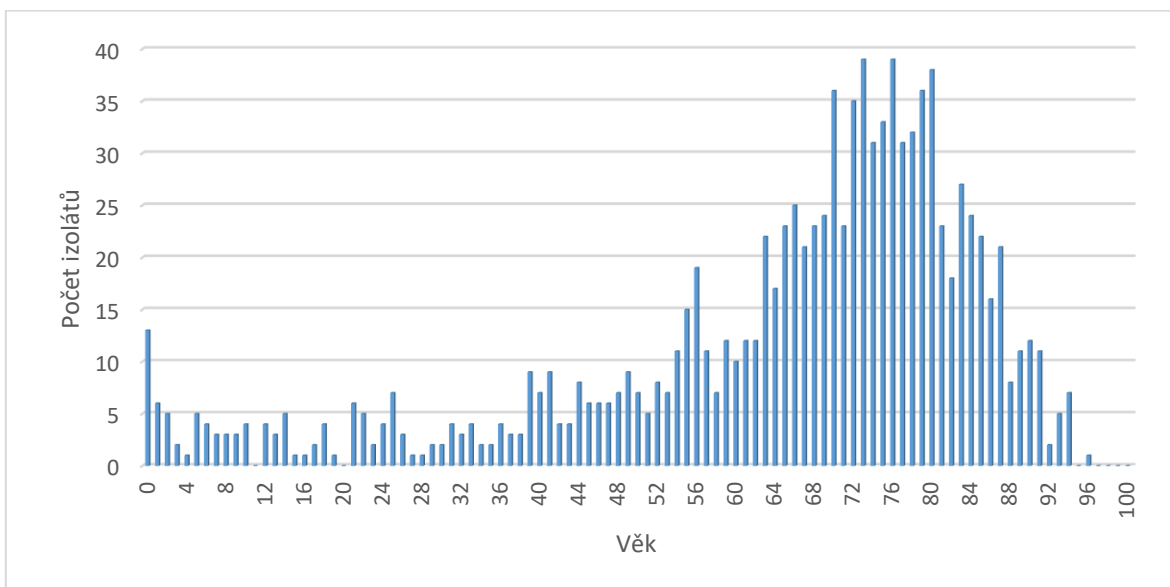
Graf 13 nám dává přehled o typech biologických materiálů, ve kterých byly nejčastěji prvozáchyty izolátů MRSA evidovány. Nejčastěji se jednalo o vzorky z horních dýchacích cest ($n = 372$) a stěry ($n = 298$). Méně často byly odebírány urologické materiály, stěry z ran, krev a vzorky z dolních cest dýchacích. Nejméně často byly MRSA izoláty v gynekologických materiálech.



Graf 13 Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA dle typu zpracovávaného biologického materiálu za sledované období 2020-2023

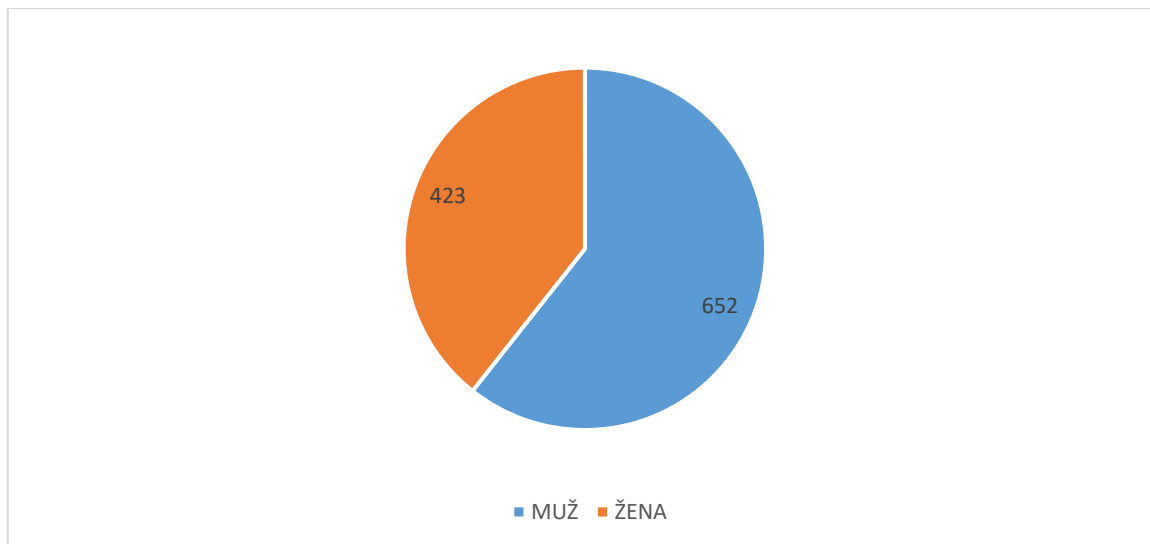
Legenda grafu: urologický materiál (moč, stěr z uretry), ucho (stěr), tkáň (stěr, tkáň placenty), tekutiny (hnis, punktát, aspirát, sekret), stomatologie (stěr - jazyk, ústa), stěr, rány (vřed, defekt, dekubitus), oko (stěr), kůže (stěr kůže a puchýřů), krevní řečiště (implantát, katetr), krev, HCD – horní cesty dýchací (výtěr - nos, krk, nosohltan, larynx, tonzil), gynekologický materiál (výtěr - hrdlo, pochva, stěr genitálie, očištění, placentární tkáň), GIT – gastrointestinální trakt (obsah žaludku, žluč, stolice, vřed), dutiny (hnis, drén, výtěr – píštěl, absces, furunkl), DCD – dolní cesty dýchací (sputum, aspirát, bronchoalveolární laváž, výtěr)

Graf 14 opět ukazuje počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA v závislosti na věku. Jejich záchytnost roste s věkem, přičemž od 40 let je nárůst výrazný. Nejčastěji jsou tyto kmeny detekovány u pacientů ve věku 73 až 76 let.



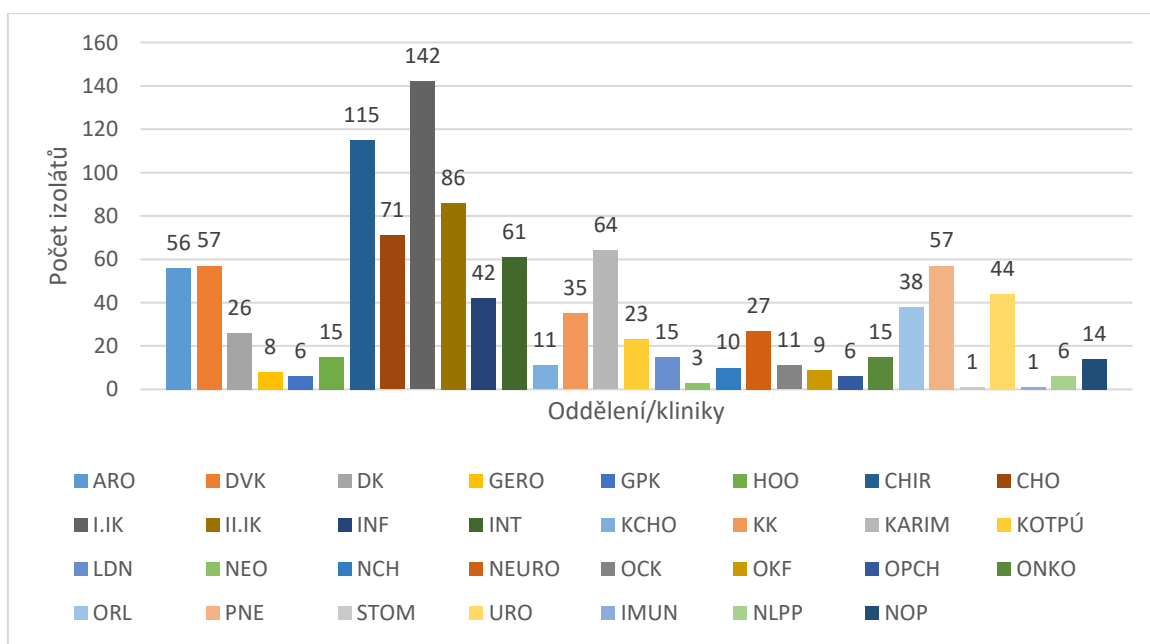
Graf 14 Počty zpracovaných neduplicitních izolátů MRSA dle věku za sledované období 2020-2023

Graf 15 znázorňuje, že MRSA izoláty jsou častěji zaznamenávány u mužů (61 %). Zbýlých 31 % kmenů *S. aureus* s rezistencí k meticilinu bylo zaznamenáno u žen.



Graf 15 Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA dle pohlaví za sledované období 2020-2023

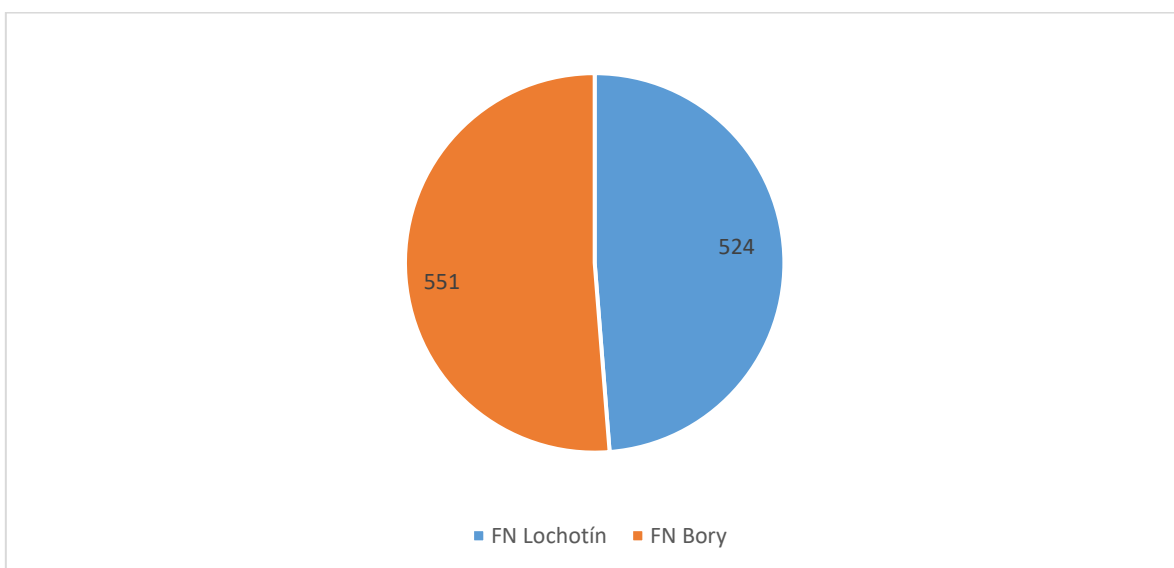
Graf 16 ukazuje, že nejvyšší počet prvozáchytlů izolátů MRSA pocházelo z I. interní kliniky (n = 142), následované chirurgickou klinikou (n = 115). Naopak nejméně často byly tyto izoláty zachycovány v materiálech ze Stomatologické kliniky a Ústavu imunologie a alergologie, kdy byl v obou případech nalezen pouze jeden izolát.



Graf 16 Počty zpracovaných neduplicitních izolátů MRSA dle oddělení za sledované období 2020-2023

Legenda grafu: ARO – Anesteziologicko-resuscitační oddělení, DVK – Dermatovenerologická klinika, DK – Dětská klinika, GERO – Geriatrické oddělení, GPK – Gynekologicko-porodnická klinika, HOO – Hematologicko-onkologické oddělení, CHIR – Chirurgická klinika, CHO – Chirurgické oddělení, I.IK – I. interní klinika, II.IK – II. interní klinika, INF – Infekční klinika, INT – Interní oddělení, KCHO – Kardiochirurgické oddělení, KK – Kardiologická klinika, KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, KOTPÚ – Klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí, LDN – Lůžka dlouhodobě nemocných, NEO – Neonatologické oddělení, NCH – Neurochirurgická klinika, NEURO – Neurologická klinika, OCK – Oční klinika, OKF – Oddělení klinické farmakologie, OPCH – Oddělení plastické chirurgie, ONKO – Onkologie, ORL – Otorhinolaryngologie, PNE – Pneumologie, PSYCH – Psychiatrická klinika, STOM – Stomatologická klinika, ŠÚP – Šiklův ústav patologie, ÚKBH – Ústav klinické biochemie a hematologie, URO – Urologická klinika, IMUN – Ústav imunologie a alergologie, NLPP – Útvar náměstka pro LPP, NOP – Útvar náměstkyně pro OP.

V **Grafu 17** je znázorněn rozdíl v počtu prvozáchtů MRSA izolátů v jednotlivých částech Fakultní nemocnice Plzeň, konkrétně v částech Bory a Lochotín. Rozdíl v počtu izolátů MRSA mezi těmito dvěma částmi nemocnice je minimální, ve prospěch části lochotínské (49 %).

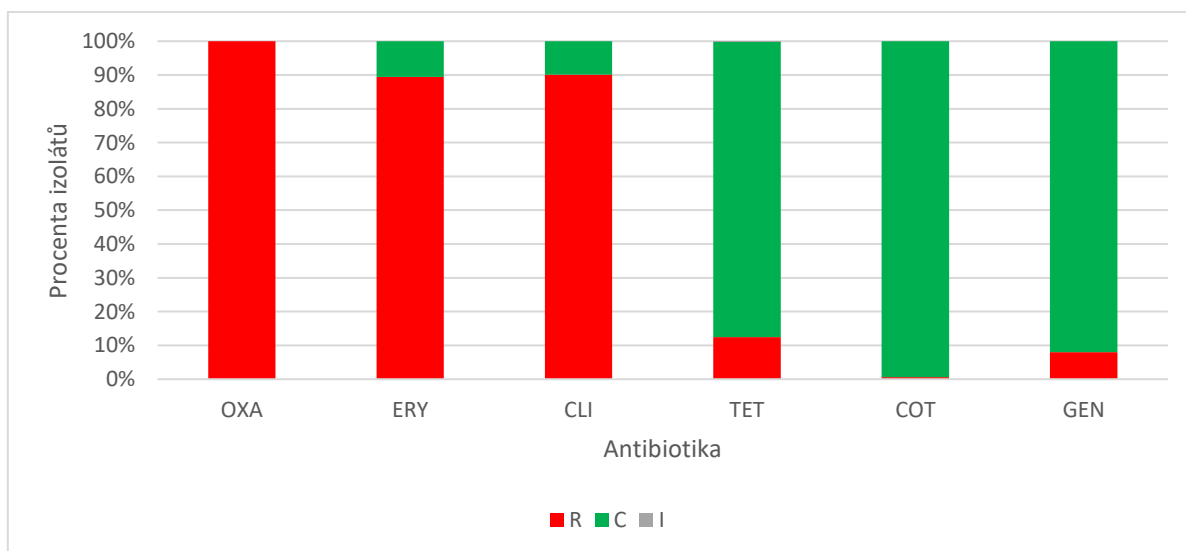


Graf 17 Počty detekovaných neduplicitních izolátů MRSA v závislosti na části nemocnice za sledované období 2020-2023

Nakonec byla provedena statistická analýza výsledků citlivosti neduplicitních izolátů MRSA k základnímu spektru antibiotik, které zahrnovalo oxacilin, erytromycin, klindamycin, tetracyklin, kotrimoxazol a gentamycin. Testování citlivosti bylo provedeno pomocí diskového difuzního testu, a výsledky byly interpretovány dle doporučených break-pointů společnosti *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Získané výsledky jsou zobrazeny v **Tabulce 1** a **Grafu 18**. Jelikož se jednalo o MRSA izoláty, byly všechny testované kmeny rezistentní k oxacilinu (n = 1 075; 100 %). Dále bylo zjištěno, že velká část izolátů vykazovala i rezistenci k erytromycinu (n = 961; 89.4 %) a klindamycinu (n = 969; 90 %), ze skupiny makrolidů, potažmo linkosamidů. Toto naznačuje, že tyto izoláty vykazují MLS_B rezistenci. Na druhou stranu, pouze malý počet vzorků vykázal rezistenci na tetracyklin (n = 131; 12.2 %) a gentamycin (n = 86; 8 %). Nejnižší úroveň rezistence byla zaznamenána u kotrimoxazolu, ke kterému bylo rezistentních pouze 7 izolátů.

Tabulka 1 Přehled citlivosti/rezistence neduplicitních izolátů MRSA na základní spektrum testovaných antibiotik za sledované období 2020-2023

	oxacilin	erytromycin	klindamycin	tetracyklin	kotrimoxazol	gentamicin
rezistentní	1075	961	969	131	7	86
citlivé	0	114	106	918	1067	988
intermediální	0	0	0	1	0	0



Graf 18 Přehled citlivosti/rezistence neduplicitních izolátů MRSA na základní spektrum testovaných antibiotik za sledované období 2020-2023

Legenda grafu: R – rezistentní, C – citlivý, I – intermediální, OXA – oxacilin, ERY – erytromycin, CLI – klindamycin, TET – tetracyklin, COT – kotrimoxazol, GEN – gentamicin

DISKUZE

Problematika výskytu MRSA má globální rozsah a představuje významný epidemiologický problém. Od roku 2000 se Česká republika zapojila do projektu EARS-Net, který sleduje výskyt rezistentních bakterií, včetně MRSA izolátů, které byly izolovány z přirozeně sterilních materiálů, jako jsou krev a likvor. Evropské země s nejvyšším výskytem invazivních infekcí způsobených MRSA kmeny zahrnují Kypr, kde se v roce 2022 zaznamenal výskyt na úrovni 50,8 %, což představuje postupné zvyšování od roku 2017 a Řecko s 39 % bez výrazného trendu změn od roku 2000. Naopak v České republice byl výskyt MRSA kmenů v roce 2022 7,5 %, což je nižší hodnota, než v sousedních zemích jako je Slovensko s 18 % nebo Polsko s 13,3 %. Avšak stále vyšší než v Německu a Rakousku, kde se výskyt MRSA pohybuje kolem 3,9 % Charakterizace izolátů MRSA není zahrnuta ve zprávách sítě EARS, takže údaje o epidemiologii MRSA jsou dostupné pouze z několika časově omezených studií. (25)

Výsledky studie (36), provedené mezi zářím 2017 a lednem 2018 v jedenácti mikrobiologických odděleních po celé České republice, přinesly důležité poznatky o epidemiologii MRSA. Celkově bylo získáno 441 neduplicitních izolátů MRSA. Vzorky byly kultivovány z místa infekce, nebo z nosních, krčních a kožních screeningových výtěrů. Taktéž z mé práce vyplývá, že nejčastěji odebíraným materiálem byly materiály z horních dýchacích cest a následně stěry. Výsledky druhé studie (38), která se zabývala epidemiologickou charakteristikou MRSA z krevních kultur, popisují 62 neduplicitních izolátů MRSA z let 2010–2016 ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Častými místy kolonizace a infekce byly chirurgické nebo chronické rány, dále dýchací cesty, kůže, hrdlo, moč, a nos. I v mé práci byly nejčastěji odebíraným materiálem vzorky z horních cest dýchacích a následně stěry.

Výsledky studie z let 2017-2018 (36) poskytly důležité informace o věkové distribuci pacientů s MRSA, kde medián věku pacientů byl 67,06 let s rozmezím od 1 dne do 107 let. Výsledky druhé studie provedené v letech 2010-2016 (38), která identifikovala střední věk pacientů s MRSA s průměrem 68 let v rozmezí od 1 do 88 let, je shodná. Podobně i mé vlastní výsledky potvrzují obě studie, kdy nejvyšší počet pacientů s MRSA byl ve věkové kategorii kolem 70 let. Zjištění těchto studií naznačují, že pokročilý věk může být významným rizikovým faktorem pro výskyt MRSA. Starší populace má často oslabený imunitní systém, což zvyšuje jejich náchylnost k infekcím. Dále častější hospitalizace

starších jedinců může představovat zvýšené riziko expozice MRSA, další ovlivňující faktory, jako jsou zdravotní stav, expozice lékařským zákrokům a chronická onemocnění, které převážně stoupají s věkem.

V rámci studie provedené v letech 2017-2018 (36) bylo zjištěno, že z celkového počtu 441 pacientů s MRSA bylo 284 (64,40 %) pacientů mužského pohlaví. Tato dominance mužského pohlaví výrazně koresponduje s výsledky mé bakalářské práce, která také ukázala převahu mužské populace s výskytem MRSA, a to v podobě 62,5 %. Důležitou srovnávací informací je také studie z let 2010–2016 (38) provedená ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kde se zjistilo, že pacienti s infekcí krevního řečiště MRSA byli častěji muži a to v 60 % případů. Je však důležité zdůraznit, že tato shoda v distribuci MRSA mezi pohlavími neumožňuje jednoznačné závěry ohledně toho, zda mají muži vyšší riziko nákazy MRSA než ženy.

Nakonec tato studie z let 2017-2018 (36) prokázala vysokou úroveň rezistence MRSA na různá antibiotika. Zjištění naznačují, že izoláty MRSA jsou často rezistentní na erytromycin 87,98 % a klindamycin 84,81. Tyto údaje jsou v souladu s výsledky této práce, kde byla zaznamenána vysoká rezistence na erytromycin 89,4 % a klindamycin 90 %. Co se týče rezistence vůči ostatním antimikrobiálním látkám, výsledky studie ukazují, že rezistence na gentamicin dosahovala 14,51 % a na tetracyklin 10,43 %. Podobné hodnoty byly pozorovány i v mé práci, kde byla zaznamenána rezistence na tetracyklin 12,2 % a gentamicin 8 %. Tato konzistence v rezistenci k dalším antibiotikům naznačuje, že multirezistentní kmeny MRSA jsou v České republice běžné a převažují dominance kmenů rezistentních na erytromycin a klindamycin.

Závěrem této diskuse je důležité zdůraznit, že infekce způsobené izoláty MRSA není možné podceňovat. Tyto infekce bývají vážné a mohou mít dlouhodobé dopady na postižené jedince. Jejich léčba je často náročná a může vyžadovat použití silných antibiotik nebo dokonce chirurgického zákroku. Navíc může dojít k rozvoji chronických stavů nebo komplikací, které mohou ovlivnit kvalitu života pacientů. Pouze pečlivým sledováním, včasnou diagnostikou a správnou léčbou lze efektivněji řešit tento závažný zdravotní problém.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci je zobrazen přehled poznatků o rodu *Staphylococcus* spp., se zaměřením především na druh *Staphylococcus aureus*, který je známý svou rezistencí k antibiotikům, což je u této bakterie celosvětově sledovaným problémem. V této práci je kladen důraz především na rezistenci k meticilinu/oxacilinu.

Analýza dat z Fakultní nemocnice v Plzni za období 2020 až 2023 ukazuje na postupný pokles výskytu MRSA. Tento pokles nemusí být směrodatný, jelikož mohl být zkreslen probíhající pandemií covidu-19 a situaci je nutno dále sledovat. Dále je nezbytné pokračovat ve vzdělávání zdravotnických pracovníků o nových diagnostických metodách a jejich implementaci v klinické praxi. Je důležité zdůraznit potřebu dalšího výzkumu a vývoje inovativních diagnostických nástrojů a terapeutických strategií, které by mohly efektivněji řešit problémy spojené s detekcí a léčbou bakteriálních infekcí. V boji proti MRSA a dalším rezistentním kmenům je třeba se nejen zaměřit na vývoj nových antibiotik, ale také na zlepšení preventivních opatření a postupů, jak v nemocničním, tak v komunitním prostředí.

SEZNAM LITERATURY

1. LICITRA, Giancarlo. Etymologia: staphylococcus. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19.9: 1553.
2. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015.
3. VOTAVA, Miroslav, et al. *Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody*. Neptun, 2010.
4. KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Galén, 2020.
5. JINDRÁK, Vlastimil; HEDLOVÁ, Dana; URBÁŠKOVÁ, Pavla. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Mladá fronta, 2014.
6. MELTER, Oto; MALMGREN, Annika. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Karolinum Press, 2014.
7. HURYCH, Jakub; ŠTÍCHA, Roman. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Stanislav Juhaňák-Triton, 2021.
8. JIŘÍ, Beneš. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009.
9. LIVERMORE, David M. Antibiotic resistance in staphylococci. *International journal of antimicrobial agents*, 2000, 16: 3-10.
10. FELDEN, Brice, et al. The Staphylococcus aureus RNome and its commitment to virulence. *PLoS pathogens*, 2011, 7.3: e1002006.
11. CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*, 2021, 12.1: 547-569.
12. MÉNDEZ-VILAS, Antonio (ed.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center, 2013.
13. FRANÇA, Angela, et al. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. *Pathogens*, 2021, 10.2: 170.
14. HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, 25.9: 1071-1080.

15. ŠTEFAN, Marek. *Antibiotika v klinické praxi*. Druhé vydání. Praha : Galén, 2022..
16. BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Grada Publishing, 2018.
17. REYNOSO, Eugenia, et al. Riboflavin-sensitized photooxidation of Ceftriaxone and Cefotaxime. Kinetic study and effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 142: 35-42.
18. CIHALOVA, Kristyna, et al. *Staphylococcus aureus* and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16.10: 24656-24672..
19. COSTA, Ana Rita, et al. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. 2013.
20. MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23.15: 8088.
21. KESHARWANI, Amit Kumar; MISHRA, Jyoti. Detection of β -lactamase and antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 2019, 17: 720-725..
22. GHERARDI, Giovanni. *Staphylococcus aureus* infection: pathogenesis and antimicrobial resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24.9: 8182.
23. PETINAKI, Efthymia; PAPAGIANNITSIS, Constantinos. Resistance of staphylococci to macrolides-Lincosamides-Streptogramins b (MLS). *Staphylococcus aureus*, 2019, 117: 117-133.
24. WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data*. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2022.
25. European Union, European Centre for Disease Prevention and Control, An agency of the European Union. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Dostupné z: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public> (Antimicrobial resistance/*Staphylococcus aureus*/Meticillin (MRSA)/R/2020-2023)
26. GARDETE, Susana, et al. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 2014, 124.7: 2836-2840.

27. MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Univerzita Pardubice, 2012.
28. VRIONI, Georgia, et al. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of translational medicine*, 2018, 6.12.
29. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing as, 2010.
30. WHEAT, LAWRENCE J.; WHITE, A. C.; NORDEN, C. Serological diagnosis of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Journal of clinical microbiology*, 1985, 21.5: 764-767.
31. WOO, P. C. Y., et al. Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Molecular Pathology*, 2001, 54.4: 244.
32. FRENCH, G. L. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, 15: 10-16.
33. BABEL, Britta S.; DECKER, Catherine F. Microbiology and laboratory diagnosis of MRSA. *Disease-a-Month*, 2008, 54.12: 769-773.
34. LECLERCQ, Roland. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical infectious diseases*, 2002, 34.4: 482-492.
35. JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. Karolinum, 2009.
36. TKADLEC, Jan, et al. The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Czech Republic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, 76.1: 55-64.
37. MORAN, Angelica a LARKIN, Paige M.K., 2023. *Lablogatory: MRSA Testing*. Online. WorldPress. Dostupné z: <https://labmedicineblog.com/2023/01/10/mrsa-testing/>.
38. NERADOVA, Katerina, et al. Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream cultures at University Hospital in the Czech Republic. *Folia Microbiologica*, 2020, 65: 615-622.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



Vážená paní
Adéla Zelenková
Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*
Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF Fakultní nemocnice Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním anonymizovaných informací o laboratorních metodách / analýzách / výsledcích těchto metod, včetně jejich statistického zpracování, používaných na pracovišti *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Klinická diagnostika infekcí způsobených rezistentními stafylokoky*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, **ochrany dat pacientů** a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, pokud budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe na MIKRO, **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní **Chudějová Kateřina, Mgr., Ph.D., odborný pracovník v laboratorních metodách MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
Manažerka pro vzdělávání nelékařů
Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň
Edvarda Beneše 1128/13, 301 00 Plzeň
Tel: 377 401 663
E-mail: chabrovas@fnplzen.cz