



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Klinická a mikrobiologická charakteristika komunitních kmenů *Staphylococcus lugdunensis*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Barbora Petříková

Vedoucí práce: MUDr. Věra Cihlová

České Budějovice 2017

Klinická a mikrobiologická charakteristika komunitních kmenů *Staphylococcus lugdunensis*

Abstrakt

Tato práce je zaměřená na charakteristiku jednoho z koaguláza negativních stafylokoků. *Staphylococcus lugdunensis* je považován za oportunního patogena, ale je schopen jako jeden z mála KNS způsobit infekce i u jinak zdravých jedinců. Cílem této práce je shrnout současné poznatky o klinickém významu, vlastnostech a možnostech laboratorní diagnostiky kmenů *Staphylococcus lugdunensis*.

Úvodní kapitola této práce je věnována popisu stafylokoků, jejich rozdělení na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. V práci je popsána jejich morfologie. Dále je podrobněji popsána charakteristika *Staphylococcus lugdunensis*, jeho mikrobiologické vlastnosti, možnosti identifikace pomocí různých biochemických testů.

Metodická část práce byla prováděna v laboratoři Stafila, spol. s r.o. Byl sledován záchyt *Staphylococcus lugdunensis* v této laboratoři během jednoho roku (leden-prosinec 2016). V této části je popsáno rozlišení stafylokoků pomocí na stafylokoky koaguláza pozitivní a stafylokoky koaguláza negativní. Následuje druhová identifikace, která je zaměřena na kmeny *Staphylococcus lugdunensis*. Tato druhová identifikace byla provedena komerčním testem STAPHYtest24. Dále jsou popsány všechny testy, které se na daném pracovišti pro přesnou identifikaci *S. lugdunensis* provádí – mezi tyto testy patří HYA, PYR test a další. U kmenů identifikovaných jako *Staphylococcus lugdunensis* byla testována citlivost k antibiotikům metodou diskové difúzní citlivosti.

Dále je praktická část práce věnována porovnání výskytu *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus lugdunensis*. Porovnáním těchto dvou mikrobů byla potvrzeno to, co jsem očekávala, a to že výskyt *Staphylococcus aureus* je mnohonásobně vyšší než *S. lugdunensis*, avšak infekce způsobené *S. lugdunensis* jsou klinicky velmi podobné těm u nichž byl jako patogen prokázán *S. aureus*.

Klíčová slova: rod *Staphylococcus*; *Staphylococcus lugdunensis*; stafylokoky koaguláza negativní; biochemická identifikace

Clinical and mikrobiological charakteristics of community strains of *Staphylococcus lugdunensis*

Abstract

The bachelor thesis is focused on characterization of coagulase-negative staphylococcus. *Staphylococcus lugdunensis* is considered to be an opportunist pathogen, which is able to cause an infection in healthy individuals, as only one of few existing CNS. The aim of this thesis is to sum up actual knowledge about a clinical importace, basic characteristic and possibilities of laboratory diagnostics of the species *Staphylococcus lugdunensis*.

The initial chapter of this bachelor thesis is dedicated to a description of staphylococcus and its distribution to a positive and a negative clumbing factor. In the thesis is described its morphology and further the detailed characteristic of *Staphylococcus lugdunensis*, its microbiological characteristic and identification possibilities with assistance of different biochemical tests

Methodical part of the thesis was carried out in the laboratory Stafila Ltd. I was watching the finding of *Staphylococcus lugdunensis* in this laboratory during one year (January – December 2016). In this part is described a differentiation of staphylococcus to staphylococcus clumbing factor positive and staphylococcus clumbing factor negative. Then follows an identification of species which is focused on the species of *Staphylococcus lugdunensis*. The species identification was carried out with a commercial test STAPHYtest24. Then I concentrated on description of all tests which are used in this laboratory for an exact identification *S. lugdunensis*, e.g. HYA test, PYR test and others. For species which were identified as *Staphylococcus lugdunensis* was carried out a test for susceptibility to antibiotics using a method of disc diffusion sensitivity.

Further is a practical part of this thesis dedicated to comparison of species *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus lugdunensis*. The comparison of these two species confirmed, as expected, that a presence of *Staphylococcus aureus* is much higher than *S. lugdunensis*, but infections caused by *S. lugdunensis* are from clinical point of view very similar to them where was proved a pathogen *S. aureus*.

Key words: genus *Staphylococcus*; *Staphylococcus lugdunensis*; coagulase-negative staphylococci; biochemical identification

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci s názvem Klinická a mikrobiologická charakteristika komunitních kmenů *Staphylococcus lugdunensis* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č 111/1998 Sb. Zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.5.2017

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji vedoucí své bakalářské práce, MUDr. Věře Cihlové za odbornou pomoc, cenné rady a vstřícnost. Dále děkuji laborantkám v mikrobiologické části laboratoře Stafila, spol. s r.o. za ochotu při praktické části. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za velkou trpělivost a podporu.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	9
2.1	Rod <i>Staphylococcus</i>	9
2.1.1	Stafylokoky koaguláza pozitivní	10
2.1.2	Stafylokoky koaguláza negativní	11
2.1.3	Molekulární metody	13
2.1.4	Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF	13
2.2	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	15
2.2.1	Mikrobiologické vlastnosti	15
2.2.2	Kolonie	15
2.2.3	Hemolýza	15
2.2.4	Faktory virulence	15
2.2.5	Kultivační průkaz	19
2.2.6	Biochemický profil pro identifikaci	19
2.2.7	Onemocnění	20
2.2.8	Antimikrobiální citlivost	20
2.3	Odběr vzorku	22
3	Cíle práce	23
4	Praktická část	24
4.1	Metodika	24
4.2	Odběr a transport vzorků	24
4.3	Mikroskopie	24
4.4	Kultivace	25
4.4.1	Krevní agar	25

4.4.2	Chromogenní pŕdy	26
4.5	Biochemické testy	27
4.5.1	Kataláza	27
4.5.2	Produkce hyaluronidázy	27
4.5.3	PYRAtest.....	27
4.6	Citlivost k antibiotikŕm.....	32
4.7	MALDI TOF MS a molekulové metody.....	33
5	Vŕsledky.....	34
6	Diskuze	37
7	Závŕr.....	39
8	Zdroje	40
9	Seznam zkratek.....	43

1 Úvod

Bakterie začleněné do skupiny aerobně rostoucích pozitivních koků, kam se řadí i stafylokoky, jsou úzce vázané na člověka. Žijí jako komenzálové na povrchu kůže a sliznic, ale současně jsou vybaveny řadou faktorů patogenity, které jim umožňují při vhodné příležitosti invadovat do tkání. V takovém případě se chovají jako extracelulární patogeny. Vzhledem k dlouhodobé koexistenci těchto mikrobů a člověka si lidský druh ve svém vývoji rozrůznil svojí imunitní i antigenní výbavu. Většina bakterií provedla to samé, projevuje se to rozpadem do řady podskupin, odlišených například sérotypizací, ty se pak navzájem liší svým patogenním potenciálem. Různí lidé jsou pak díky tomu různě vnímaví k působení těchto mikrobů, a naopak i jednotlivé druhy mikrobů mohou vyvolávat klinicky rozdílné nemoci (Beneš, 2009).

Koaguláza negativní stafylokoky jsou přirozenými rezidenty kůže a sliznic a tvoří asi 65-90 % ze všech stafylokoků izolovaných z těchto míst. Proto se také často vyhodnocují pouze jako kontaminanty. Přesto i stafylokoky koaguláza negativní jsou schopni vyvolat onemocnění, především však u predisponovaných jedinců. *Staphylococcus lugdunensis* je jeden z mála KNS, který je schopen vyvolat infekci i u jinak zdravých osob. V praxi je označován za signifikantního původce kožních onemocnění. Projevy tohoto onemocnění mohou být podobné projevům onemocnění způsobené *S. aureus* (Beneš, 2009).

2 Teoretická část

2.1 Rod *Staphylococcus*

Poprvé byly stafylokoky popsány v roce 1880 nezávisle na sobě Louistem Pasteurem a Sirem Alexandrem Ogstonem. Právě skotský chirurg a amatérský mikrobiolog Sir Alexandr Ogston zavedl název *Staphylococcus*. Ogston prokázal, že stafylokoky jsou původci hnisavých infekcí u člověka (Beneš, 2009; Greenwood 1999).

Stafylokoky jsou morfologicky grampozitivní koky. Jsou uspořádány různě, mohou být jednotlivě, v párech, v tetrádách, v krátkých řetízích o maximálně čtyřech buňkách, nejčastěji však v nepravidelných shlucích připomínající hrozen (odtud odvozen název *staphylé* řecky hrozen). Stafylokoky netvoří spóry, pouzdro netvoří nebo jen velmi omezeně a jsou nepohyblivé. Stafylokoky jsou poměrně odolné vůči vlivům vnějšího

prostředí. Až na určité výjimky jsou fakultativně anaerobní. Mimo kmeny skupiny *S. sciuri* jsou stafylokoky oxidáza negativní (Votava et al., 2003).

Stafylokoky mají pozitivní katalázový test, ten slouží k odlišení od streptokoků a enterokoků. Právě se streptokoky a enterokoky mají se stafylokoky někdy podobnou makroskopickou morfologií. Streptokoky a enterokoky jsou kataláza negativní, zatímco stafylokoky pozitivní. Katalázu netvoří pouze dva stafylokoky, *S. saccharolyticus* a *Staphylococcus aureus ssp. anaerobius*. Kataláza je enzym, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a plynný kyslík. Pozitivní reakce se projevuje bubláním uvolněného kyslíku (Bennerman et al., 2007).

Stafylokoky patří mezi poměrně kultivačně nenáročné mikroorganismy. Dobře rostou i na běžných kultivačních půdách. Pro jejich izolaci je vhodný krevní agar s 5 % beraní krví, trypton sójový agar TSA a BHI agar s přidávkem mozkosrdcové infuze. K zachytu z kontaminovaných vzorků je vhodné použít selektivní půdu, např. krevní agar s 10 % NaCl (Beneš, 2009; Votava et al., 2003).

V praxi se tradičně stafylokoky dělí na dvě základní skupiny podle toho, zda mají enzym, který jim umožňuje koagulovat plazmu, a to na stafylokoky koaguláza pozitivní a stafylokoky koaguláza negativní.

Další možnost, jak odlišit stafylokoky je průkaz produkce specifického enzymu hyaluronidázy. Test je pozitivní pouze u kmenů *S. aureus* a *S. hyicus*. Ostatní stafylokoky mají tento test negativní, protože neprodukují enzym hyaluronidázu. (Petráš, 2011).

2.1.1 Stafylokoky koaguláza pozitivní

Nejnámějším koaguláza pozitivním stafylokokem je *Staphylococcus aureus*, jedná se o jediný důležitý koaguláza pozitivní druh v humánní patologii. Ostatní koaguláza pozitivní jsou identifikovány u zvířat a u lidí je nacházíme jen ve výjimečných případech např. v souvislosti s kousnutím od psa (Votava et al., 2003).

Staphylococcus aureus je jedním z nevýznamnějších patogenů. Existují dva poddruhy tohoto stafylokoka, a to *Staphylococcus aureus subsp. aureus* a *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* (Votava et al. 2003).

2.1.2 Stafylokoky koaguláza negativní

Koaguláza negativní stafylokoky jsou hlavní součástí mikroflóry kůže a sliznic člověka. Mohou se však uplatnit jako oportunní patogeny. Způsobují infekce močových cest a infekce spojené s implantací cizorodých materiálů jako jsou ortopedické a cévní protézy, cévní katetry a jiné implantáty. Dříve se koaguláza negativní stafylokoky druhově neidentifikovaly, ale vzhledem k jejich narůstajícímu významu jako oportunních patogenů se dourčení do druhu u významných izolátů již provádí (Beneš, 2009).

Mezi nejčastěji se vyskytující druhy patří *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus lugdunensis*. U člověka se vyskytují až dvě třetiny všech popsaných KNS a jejich zastoupení je velice nerovnoměrné (Votava et al. 2003).

Počet KNS se neustále mění vzhledem k neustálému objevování nových, dosud nepopsaných druhů. Mezi objeviteli se vyskytuje i několik českých vědců, jako např. profesor Václav Hájek, který popsal koaguláza negativní druhy *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus muscae* a *Staphylococcus saprophyticus* spp. *bovis* (Votava et al., 2003).

V roce 2013 čeští mikrobiologové objevili nový druh stafylokoka, *Staphylococcus petrasii*. Tento stafylokok je typickým koaguláza negativním stafylokokem, fenotypově je podobný druhům *S. warneri* eventuálně *S. hominis* nebo *S. lugdunensis* (Patůček et al., 2013).

2.1.2.1 Patogenita

Mezi nejčastější infekce způsobené KNS, jsou ty spjaté s implantovanými či zavedenými pomůckami. Nejdůležitější jsou infekce krevního řečiště, které se projevují jako bakterémie. Nejčastěji se KNS dostanou do krve pomocí infikovaných intravenózních katétrů. Ne každá kolonizace katétrů se musí projevit příznaky, avšak na druhé straně může dojít ke katérové sepsi s příznaky šoku. Další příčinou bakterémie je endokarditida. Nejčastěji jde o postižení umělých srdečních chlopní. Nidus infekce je většinou v místě přišití implantátu, který se pak uvolní. Infekce likvorových spojek se projeví zhoršenou funkcí shuntů nebo meningitidou (Votava et al., 2003).

2.1.2.2 *Kultivace*

Na běžných kultivačních půdách (krevní agar) rostou KNS různě, některé rostou v poměrně velkých koloniích, jiné zase v drobných. Kolonie jsou ve většině případů pigmentovány, a to nejčastěji bíle nebo bílošedě. *S. epidermidis* má zbarvené kolonie do porcelánově bílé (Votava et al 2003).

Řada kmenů KNS tvoří hemolyzin, který je blízký hemolynu delta *S.aureus*. Mezi tyto kmeny patří i *Staphylococcus lugdunensis* (Frank et al.,2008).

2.1.2.3 *Mikroskopická identifikace*

Nejběžnější metodou používanou v bakteriologii je barvení dle Grama. Díky tomuto barvení rozdělujeme bakterie na dvě základní skupiny.

Bakterie grampozitivní (G+)

Bakterie gramnegativní (G-)

Rozdělení mikrobů dle Grama je velmi důležité, protože odráží řadu jejich morfologických a fyziologických vlastností a také souvisí s jejich citlivostmi na antibiotika.

Podstatou rozdílu v barvitelnosti dle Grama je rozdílná stavba bakteriální stěny. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu postavenou poměrně jednoduše. Tvoří jí mohutná peptidoglykanová vrstva, která je protkána řetězcí kyseliny teichoové. Tato struktura je přirovnávána k pevnému korzetu, který během Gramova barvení upevní komplex krystalové violeti s jodem tak pevně, že buňka zůstane i přes odbarvování modrá.

Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu stavěnou složitěji, a to i přesto, že je tenčí. Skládá se ze zevní membrány, která je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů a pod touto zevní membránou je uložena tenká vrstva peptidoglykanu. Prostor mezi zevní membránou a cytoplazmou se nazývá periplasmatický prostor. Ten obsahuje bílkoviny, které slouží jako enzymy. Některé z těchto enzymů mají schopnost inaktivovat antibiotika (Votava et al., 2005).

Během barvení vzniká komplex krystalové violeti a jódu, který se u gramnegativních bakterií snadno vyplavuje působením alkoholu nebo acetonu, naproti tomu u grampozitivních bakterií určitou dobu tento komplex vyplavení odolává. Gramnegativní bakterie je třeba dobarvit kontrastním barvivem, např. fuchsinem. Toto

relativně slabě červené barvivo ovlivní tmavomodrý tón grampozitivních bakterií jen nepatrně (Votava et al., 2005).

Mikroskopicky nelze jednotlivé KNS od sebe odlišit (Votava et al.,2005).

2.1.2.4 Druhová identifikace

Druhová identifikace KNS je založena na fenotypové, genotypové identifikaci, sérotypizaci a molekulárních metodách. V menších laboratořích se nejčastěji využívá fenotypová identifikace, především podle různých biochemických znaků. Mezi tyto znaky se řadí např. oxidáza, kataláza, štěpení močoviny, mannitolu, sacharózy, xylosy a ornithinu a tvorba acetoinu, glukosidasy a pyrrolidonylarylamidasy. Kombinace těchto znaků a další testů se využívají v komerčních soupravách pro přesnou identifikaci stafylokoků. Dnes se využívají i rychlé a moderní metody jako je hmotnostní spektrometrie a identifikace pomocí analýzy DNA, tyto metody se však využívají především ve větších laboratořích (Votava et al.,2003).

2.1.3 Molekulární metody

V klinické mikrobiologii se stává běžným jevem používání molekulárních metod. Je používána například real-time PCR nebo vysokopropusté sekvenovací DNA systémy. Velké úsilí je zaměřeno především na včasnou identifikaci patogenních KNS u závažných infekcí hospitalizovaných pacientů. Rozmanitost sekvenace 16S rRNA genů stafylokoků umožňuje identifikaci na úrovni druhů. Gen 16S rRNA je vysoce konzervativní gen ve kterém se nahromadili změny u druhů v průběhu evoluce. Sekvenace genu 16S rRNA z neznámého organismu se porovná s databází (např. GenBank) a díky tomu se získá přesná identifikace (Clarridge, 2004).

2.1.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF

Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Tato metoda může zkoumat profil bílkovin na základě relativní molekulové hmotnosti z bakteriálních extraktů nebo z neporušené bakterie. Identifikace MALDI-TOF (matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight) obsahuje čtyři kroky: nanesení izolovaného kmene, realizace hmotnostního spektra, srovnání s databází a dosahování výsledků. Identifikace se provádí z izolované kolonie, která je nanesena na do terčíku na testovací destičce. Na nanesenou bakterii se kápne matrice, která krystalizuje při pokojové teplotě. Tato matrice plní dva úkoly, a to uvolňování intracelulárních proteinů porušením buněčné

membrány a dále usnadňuje odpařování a ionizaci bílkovin pulzním laserovým paprskem. Ionizované bílkoviny putují vakuovou komorou a jsou detekovány v závislosti na hmotnosti a času letu. Identifikaci je využíván software, který porovná identifikovaná spektra bakterie se všemi hmotnostními spektry v komerční databázi. Metoda je rychlá a sofistikovaná, avšak i tato metoda MALDI TOF má svá úskalí. Jako nanášení vzorku před analýzou a výkonost identifikace některých bakterií. Stafylokoky jsou však touto metodou identifikovány výborně (Garcia et al.,2012; Havliš, 1999).

2.2 *Staphylococcus lugdunensis*

Staphylococcus lugdunensis je koaguláza negativní stafylokok. Poprvé byl popsán v roce 1988 v Lyonu, odtud také pochází jeho jméno – Lyon latinsky *Lugdunum* (Freney et al.,1988).

Jako ostatní koaguláza negativní stafylokoky může i *Staphylococcus lugdunensis* být komenzálem na kůži, avšak *S. lugdunensis* je považován za důležitého oportunního patogena. Byl prokázán jako patogen, který způsobuje různé infekce, nejčastěji kožní, je schopen způsobit i infekce krevního řečiště, kostí a kloubů, měkkých tkání a centrálního nervového systému. Může být pak přenášen mezi hospitalizovanými pacienty a způsobovat infekce u pacientů s poruchou integrity kůže, s permanentními katetry apod. Ačkoliv je *S. lugdunensis* obvykle popsán u osob s nemocí nebo s imunosupresivní léčbou, může způsobit i závažné infekce u jinak zdravých osob (Frank et al., 2008).

2.2.1 *Mikrobiologické vlastnosti*

S. lugdunensis je grampozitivní, kataláza pozitivní kok. Velikost koků je 0,8 – 1,0 μm a vyskytují se buď jednotlivě nebo v párech, tvoří klastry nebo krátké řetězce. *S. lugdunensis* je fakultativně anaerobní. Dobře roste za přítomnosti 10 % nebo 15 % chloridu sodného. Inkubace trvá 24–96 hodin. Morfologie kolonií, hemolýza a pigmentace mohou být u různých kmenů odlišné (Frank et al.,2008).

2.2.2 *Kolonie*

Kolonie jsou variabilní jak v oblasti morfologie, tak i pigmentace. Jsou obvykle 1-4 mm velké. Po 3–5 denní inkubaci mohou být kolonie zbarvené do zlatožluta, nebo mohou zůstat krémově zbarvené, nebo dokonce bez pigmentace (Frank et al.,2008).

2.2.3 *Hemolýza*

S. lugdunensis může tvořit hemolýzu na krevním agaru s obsahem králíčích erytrocytů a slabou hemolýzu po dvou a více dnech na krevním agaru obsahujícím ovčí erytrocyty (Freney et al.,1988).

2.2.4 *Faktory virulence*

2.2.4.1 *Toxiny*

Přesto, že byly hlášeny nálezy *S. lugdunensis* u syndromu toxického šoku, snahy o identifikaci jeho toxinů byly neúspěšné (Frank et al., 2008).

2.2.4.2 Agr lokus

Stafylokokový agr (přídavný genový regulátor) je quorum sensing systémem, který se chová jako globální regulátor faktorů virulence, zejména vylučování exoproteinů, včetně enterotoxinů, hemolysinu a četné hostitelské proteiny modifikující enzymy (Yeh et al., 2015).

2.2.4.3 Slush lokus

Synergický hemolysin obsahuje kódování tří otevřených čtecích rámců peptidů 43 aminokyselin vysoké podobnosti, tyto rámce nazýváme Slush-A, Slush-B, Slush-C, které jsou totožné se sekvenovanými hemolytickými peptidovými fragmenty. Transkripční regulace slush lokusu může být pod kontrolou agr lokusu (Frank et al., 2008).

2.2.4.4 Odolnost vůči lysozymu

Lysozym je nezbytnou enzymatickou složkou lidského vrozeného imunitního systému. Chrání proti mikrobiálním infekcím. *S. lugdunensis* je odolný do 400hg/ml lysozymu. Některé jiné patogenní stafylokoky, včetně *S. aureus*, mají odolnost na vysoké koncentrace lysozymu, zatímco nepatogenní stafylokoky jsou citlivé nebo vykazují hypersenzitivní reakce. Odolnost k lysozymu je u *S. aureus* zprostředkována expresí na membránu vázaného peptidoglykanu O-acetyltransferázy (OatA), který O-acetyluje buněčnou stěnu kyseliny N-acetylmuramové, což zabraňuje vazbě lysozymu. *S. lugdunensis* se zmocní OatA homologu ve svém genomu a O-acetylovaného peptidoglykanu ve své buněčné stěně, což ukazuje, že mechanismu lysozymové rezistence je u *S. lugdunensis* pravděpodobně stejný jako u *S. aureus* (Bera et al., 2006).

2.2.4.5 Proteiny

2.2.4.5.1 vWf vázající protein

Tento protein se specificky váže na von Willebrandův faktor. Von Willebrandův faktor je glykoprotein krevní plazmy produkovaný krevními destičkami a endotelovými buňkami, které se podílejí na mnoha aspektech koagulace (Nilsson et al., 2004).

2.2.4.5.2 Fibrinogen vázající protein

Fibrinogen vázající protein, zvaný Fbl, byl prokázán u *S. lugdunensis*. Stafylokokové vázání fibrinogenu, což je prekurzor fibrinu, je dobře známo a zdokumentováno. Tento fibrinogen vázající protein usnadňuje vazbu fibrinogenu hostitele (Mitchell et al., 2004).

S. lugdunensis má povrchově asociované proteiny, které umožňují bakteriální lpění na různých hostitelských buňkách a tkáních, i na cizích tělesech, což je rozhodující krok v stafylokokové tvorbě biofilmu. Schopnost *S. lugdunensis* navázat fibrinogen a vWf může přispět k tomu, že je schopen v organismu vyvolat endokarditidu (Frank et al.,2008).

2.2.4.6 Tvorba biofilmu

Některé izoláty *S. lugdunensis* mají potenciál adherovat na inertní povrchy. In vitro pokusy v zahraničních výzkumech, jejich spojení se znalostmi o infekčních onemocněních způsobených *S. lugunensis* a tím, že se v tomto mikroorganismu nachází adhezivní proteiny, je vhodné tvorbu biofilmu stejně jako u ostatních patogenních stafylokoků považovat za jeden z důležitých faktorů virulence. Mechanismy používané stafylokoky pro tvorbu biofilmu jsou detailně popsány hlavně pro *S. aureus* a *S. epidermidis*. Buňky se nejprve připojí k povrchu a začnou vytvářet vrstvy, které se replikují a hromadí, poté následuje produkce složek extracelulární matrix. Tato produkce vede k mezibuněčné adhezi (Speziale et al.,2014).

2.2.4.6.1 Ica locus

Ica lokus je jedna z nejlépe charakterizovaných složek stafylokokového biofilmu. Jedná se o polysacharidový β -1,6-vázaného N-acetylpolyglukosamidového zbytku, označovaného také jako polysacharidový intracelulární adhezín (Frank et al.,2007).

Fenotypové reakce tvorby biofilmu se mění na podmínkách prostředí. Přítomnost exogenních faktorů přímo ovlivňuje fenotyp stafylokokového biofilmu. Např. zvyšující se koncentrace glukózy stimuluje *S. lugdunensis* k tvorbě biofilmu (Frank et al.,2007).

Tab.1 faktory virulence *S.lugdunensis*

faktory virulence	název genu	popis	homolog(y) u jiných druhů
system přídatných genových regulátorů (agr) a RNAIII	<i>agr</i> lokus	guorum sensing systém, který se chová jako globální regulátor faktorů virulence	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. intermedius</i>
SLUSH-A, SLUSH-B, SLUSH-C hemolytické peptidy	<i>slush</i> lokus	hemolytické peptidy s aktivitou jako delta-toxin	<i>S. haemolyticus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>
OatA peptidoglykan O-acetyltransferáza	<i>OatA</i>	membránově vázaný enzym, který zajišťuje rezistenci vůči lysozymární O-acetylaci buněčné stěny N-acetylmuramovou kyselinou a zabraňuje lysozymovému navázání	<i>S.aureus</i>
vWf- vázající protein vWbl	<i>Vwbl</i>	zprostředkovává interkaci z vWf exprimující hostitelské buňky, včetně krevních destiček a endoteliálních buněk, obsahuje RGD motiv	není známa sekvenční podobnost se známými proteiny
fibrinogen vázající protein Fbl	<i>Fbl</i>	usnadňuje vazbu na fibrinogen hostitele, členem Sdr stafylokokových povrchových proteinů	<i>S. aureus</i> clumping faktor A
tvorba biofilmu PNAG/PIA extracelulární syntéza matrix genů	<i>icaABCD</i> lokus	biosyntetické enzymy ve formě β -1,6-spojení N-acetylpolyglukosaminové polysacharodového polymeru běžně se vyskytujícího v extracelulární matrix stafylokokového biofilmu	<i>S.aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>S. caprae</i>
biofilm extracelulární matrix proteinu	Neznámý	součást biofilmu extracelulární matrix	neznámý

(Frank et al, 2008)

2.2.5 Kultivační průkaz

Kultivační průkaz koaguláza negativních stafylokoků nečiní v laboratořích žádný problém, tedy i průkaz *Staphylococcus lugdunensis* není náročný. Podrobná identifikace KNS se provádí hlavně u izolátů z krve a dalších za normálních okolností sterilních míst. Pro identifikaci izolátů z terénních odběrů se ovšem většinou nejedná o odběr ze sterilních míst, ale třeba z abscesu nebo rány.

Jako základní test pro odlišení od koaguláza pozitivních stafylokoků se využívá komerční souprava k průkazu vázané plazmakoagulázy. Dále jsou využívány biochemické testy k identifikaci kmenů, díky těmto testům je většinou možné zařadit kmen do příslušného taxonu (Votava et al., 2003).

2.2.6 Biochemický profil pro identifikaci

S. lugdunensis může být od ostatních KNS odlišen pozitivní reakcí PYR a pozitivní dekarboxylací ornithinu. Mimo *S. lugdunensis* mají pozitivní PYR ještě *S. haemolyticus*, *S. schleiferi* a *S. intermedius*. *S. lugdunensis* je jediný druh stafylokoků, jehož ≥ 90 % izolátů je pozitivních na ornithindekarboxylázu. Je ovšem třeba připomenout, že malý počet kmenů *S. epidermis* také dekarboxylují ornithin. *S. lugdunensis* může být také identifikován podle výroby kyseliny z trehalózy, manózy, maltózy a sacharózy, avšak ne z mannitolu (Bannerman et al., 2007).

2.2.6.1 PYRAtest

PYRA test slouží pro rychlou detekci aktivity pyrrolidonylarylamidázy. Bakteriální pyrrolidonylarylamidáza hydrolizuje β -naftylamid kyseliny pyroglutamové, který je obsažen v detekčním proužku. Hydrolýza je detekována pomocí reakce s látkou, která je obsažena v roztoku činidla pro test PYR, tato reakce se projeví červeným zbarvením (Příbalový leták PYRAtest).

2.2.6.2 Plazmakoaguláza

Koaguláza může být dvou typů, a to buď volná nebo vázaná. Volná koaguláza je extracelulární enzym, který reaguje s plazmatickým faktorem za vzniku stafylofibrinu, ten pak katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Přítomnost volné koagulázy je prokazuje reakcí s králičí plazmou. Tato reakce se projevuje tvorbou chuchvalců, či úplným shluknutím plazmy ve zkumavce. Přítomnost volné koagulázy je typická pro kmeny *S. aureus*, kmeny *S. lugdunensis* volnou koagulázu neprodukuje.

Vázaná koaguláza neboli clumping faktor patří mezi povrchové antigeny. Vázaná koaguláza váže fibrinogen a mění ho na fibrin, tím je vyvoláno shlukování stafylokoků. Přítomnost vázané koagulázy se dá zjistit komerčně vyráběnými sety. Některé kmeny *S. lugdunensis* mohou tuto vázanou koagulázu produkovat, což způsobuje pozitivní výsledek v latexové aglutinaci. Tato pozitivita může v klinické laboratoři vést k chybné identifikaci organismu jako *S. aureus*. Z výsledku zahraničních studií lze usuzovat, že používání clumping faktoru pro identifikaci *S. lugdunensis* nelze považovat za nejspolehlivější metodu přesné identifikace (Frank et al.,2008).

V menších laboratořích je místo testování vázané koagulázy preferován test na průkaz specifického enzymu hyaluronidázy. Nejrychlejší metodou, avšak ne biochemickou, pro přesnou identifikaci je ve velkých laboratořích hmotnostní spektrometr MALDI, který vykazuje velmi přesnou identifikaci stafylokokových kmenů.

2.2.7 Onemocnění

Jak již bylo zmíněno, *S. lugdunensis* je schopen způsobit celou řadu infekčních onemocnění. Nejčastěji bývá spojován s chronickými hnisavými kožními infekcemi. Dále se také nachází jako patogen u endokarditid, infekcí krevního řečiště, mozkových abscesů, pyelonofritid, keratitid. Také je často identifikován jako patogen u nozokomiálních nákaz hospitalizovaných pacientů (Inada et al.,2015; Frank et al.,2008).

Většinou jsou infekce podobné těm, způsobeným *S. aureem*. Infekce způsobené *S. lugdunensis* mohou mít ale závažnější průběh a častěji končí smrtí (Frank et al.,2008).

2.2.8 Antimikrobiální citlivost

U stanovení mikrobiální citlivosti je důležité dbát na doporučení EUCAST. EUCAST je Evropský výbor pro antimikrobiální citlivost, který za pomoci rozsáhlých a nákladných projektů určuje klinické limity (breakpointy) pro jednotlivá antibiotika.

S.lugdunensis je na rozdíl od *S. aureus* a většiny KNS do značné míry dobře citlivý na antistafylokoková antibiotika. Dobrá citlivost k antibiotikům se nemění ani na základě místa infekce (Frank et al.,2008).

Jako u všech mikrobů i u *S. lugdunensis* se však objevují zmínky o případech rezistence. Zvláštním rysem některých kmenů *S. lugdunensis* je rezistence k vankomycinu nebo teikoplaninu (Chassain et al., 2012).

Většina stafylokoků produkuje penicilinázu, u *S. lugdunensis* je produkce penicilinázy pozorována u méně než 50 % izolátů (Chassain et al., 2012).

U některých kmenů *S. lugdunensis* byla zjištěna rezistence k oxacilinu. Za rezistentní jsou považovány kmeny s hodnotami minimální inhibiční zóny >2 mg/l, přičemž normální hodnota MIC oxacilinu pro KNS je $>0,25$ mg/l, tato rezistence je způsobena přítomností genu *mecA* (Urbášková, 2014).

V zahraničních studiích se objevují zmínky o kmenech *S. lugdunensis*, které jsou rezistentní k meticillinu. Jedná se ovšem o ojedinělé případy (Iravani Mohommad Abadi et al., 2015).

2.3 Odběr vzorku

Pro správně provedené mikrobiologické vyšetření je nezbytné, aby i odběr materiálu byl proveden dostatečně pečlivě a správně. Pokud je odběr proveden nesprávně může být vzorek kontaminován komenzály z vnějších zdrojů. (Greenwood et al., 1999) Vzorky jsou většinou odebírány pomocí komerčně vyráběných jednorázových tamponů. Tampony jsou plastové tyčinky se syntetickou bavlnou ve sterilní zkumavce. Vzhledem k předpokládanému výskytu mikroorganismů se nejčastěji používají tampony s transportní půdou. Takovou půdou je Amiesova nebo Stuartova půda, a to buď s aktivním uhlím nebo bez něj. Díky těmto půdám jsou mikroorganismy schopné přežít až 48 hodin.

Stafylokoky jsou odolné vůči vlivům vnějšího prostředí jako je vyschnutí nebo střídání teplot, proto u nich není problém s odběrem a transportem vzorků (Malíková, 2007).

3 Cíle práce

Cílem práce této práce bylo osvojit si metody používané k diagnostice koaguláza negativních stafylokoků. Dále bylo cílem poukázat na skutečnost, že *Staphylococcus lugdunensis* je významným lidským patogenem a jako takový by neměl být přehlížen.

4 Praktická část

4.1 Metodika

Laboratorní diagnostika *Staphylococcus lugdunensis* byla prováděna v mikrobiologické laboratoři, Stafila, spol. s r.o. Základní je rozlišit KPS od KNS, toto rozlišení bylo provedeno pomocí několika testů, a to PYRAtestu, také se zjišťovala produkce hyaluronidázy a byl proveden test na průkaz přítomnosti vázané koagulázy (PASTOREX STAPH – PLUS) K vlastnímu dourčení kmenu *S. lugdunensis* byl použit komerční test STAPHYtest 24, ke kterému se přidává i rezistence k novobiocinu.

Dále byl v praktické části porovnán výskyt *Staphylococcus lugdunensis* a *Staphylococcus aureus*.

4.2 Odběr a transport vzorků

Pro získání výsledků mé bakalářské práce byly vyšetřeny různé druhy biologického materiálu vyšetřovaného v mikrobiologické laboratoři Stafila, spol s r.o.

V této laboratoři rozlišují materiál dle systémů, toto rozdělení je znatelné už na žádance k vyšetření. Díky tomuto rozdělení se materiál označuje na respirace, rektum, stolici, urologii + gynekologii, PCR a klinický materiál. *S. lugdunensis* byl nejčastěji identifikován z tzv. klinického materiálu, což je většinou hnisavý materiál. Do této kategorie se v laboratoři řadí celá škála materiálu z různých částí těla. Většinou se jedná o výtěr z rány, stěr z kůže, hnis, absces, akné, impetigo, dekubitus, bércový vřed. Dále se sem také řadí např. sekrety ze středouší a výtěry ze zevního zvukovodu.

Biologický materiál, nejčastěji výtěr nebo stěr, byl do laboratoře dopraven na odběrových tamponech. Většina odběrových tamponů byla uložena v transportní půdě. Jako transportní půda byla většinou použita polotuhá průhledná Amiesova půda. Tato půda ovšem nemusí být vždy průhledná, protože může obsahovat aktivní uhlí, to je pak její zbarvení černé. Na identifikaci *S. lugdunensis* nemá přítomnost či nepřítomnost aktivního uhlí vliv.

4.3 Mikroskopie

Preparáty byly obarveny ručně dle Grama. Preparáty byly barveny manuálně. Příprava preparátu probíhala přímo z došlého materiálu. Na podložní sklíčko byl nanesen materiál, preparát se nechal zaschnout a poté se zafixoval. K zafixování bylo

možno zvolit jednu ze dvou metod, a to buď fixaci teplem, kdy se sklíčku 3x protáhlo plamenem nebo fixaci chemickou, která se provádí pomocí methylalkoholu.

postup manuálního barvení:

- převrstvení fixovaného preparátu krystalovou violetí (20 s)
- přelítý Lugolovým roztokem (20 s)
- odbarvení alkoholem – dokud z preparátu neodtéká žádná barva
- oplach vodou
- dobarvení karbolfuchsinem (60 s)
- oplach vodou a sušení

Po obarvení se preparát prohlížel pod mikroskopem imerzním systémem. Stafylokoky jsou viditelné pod mikroskopem modře, jedná se tedy o grampozitivní bakterie. V mikroskopu je můžeme vidět jako koky, které se vyskytují jednotlivě, v párech nebo i v nepravidelných shlucích.

4.4 Kultivace

4.4.1 Krevní agar

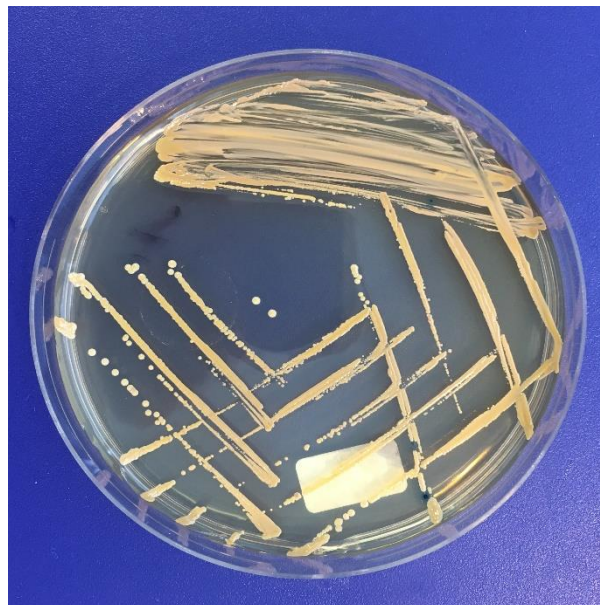
Ke kultivaci byla využita nejčastěji používaná kultivační půda v mikrobiologii, krevní agar. Díky přítomnosti ovčí krve lze pozorovat hemolytické schopnosti některých bakterií. Růst bakterií na této půdě je podporován živinami, které jsou poskytnuty směsí peptonů. Kolonie byly na krevním agaru různé, jsou variabilní jak po stránce morfologie, tak pigmentace, ta může být po 3-5 dnech inkubace zlatožlutá, nebo krémová, nebo se žádná nevyskytuje. Na krevním agaru bylo možno pozorovat i slabou hemolýzu.



Obr. 1 krevní agar

4.4.2 *Chromogenní půdy*

Chromogenní půdy jsou diagnostické půdy, na kterých díky změně zbarvení můžeme pozorovat jednotlivé kolonie a podle barvy určit, o jaký druh mikroba se jedná. Změna barvy je způsobena enzymovou reakcí.



Obr. 2 chromogenní půda

4.5 Biochemické testy

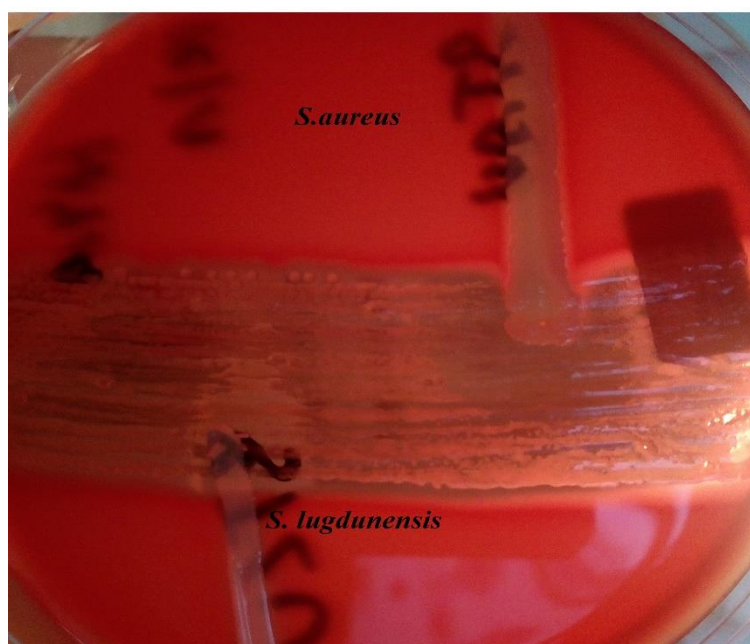
Určení mikrobů pomocí biochemických testů se využívá tehdy, pokud nelze mikroba identifikovat podle morfologie a růstu. Dnes jsou komerčně vyráběny diagnostické soupravy zaměřené na jednotlivé skupiny bakterií (Greenwood, 1999).

4.5.1 Kataláza

Test se prováděl pomocí 3 % roztoku peroxidu vodíku. Na podložní sklíčko byly nanесeny kolonie testovaného kmene, které se zakáply tímto 3 % roztokem H₂O₂. Pozitivní reakce se projevuje bubláním uvolněného kyslíku.

4.5.2 Produkce hyaluronidázy

Pro průkaz hyaluronidázy byl použit dekapsulační test s detekčním kmenem *Streptococcus equi*. K čáře masivně naočkovaného *Streptococcus equi* (široké asi 1,5 cm) byla kolmo udělána čára testovaného stafylokoka.



Obr. 3 HYA u *S. aureus* a *S. lugdunensis*

4.5.3 PYRAtest

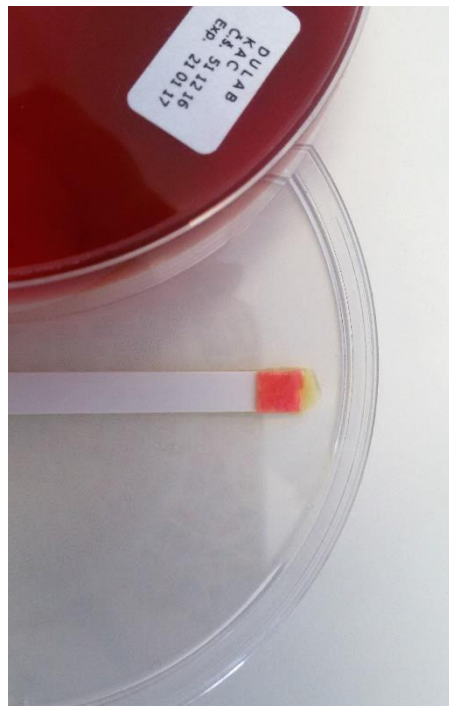
Pro stanovení aktivity byla použita 24 hodinová kultura, zóna na proužku se navlhčila asi 20 mikrolitry destilované vody. Proužkem se setřela kultura z krevního agarů (pokud se by se nejednalo o čistou kulturu setřela by se příslušná kolonie kličkou). Poté se proužek nechal asi 10 minut inkubovat při pokojové teplotě. Po inkubaci se přikápl roztok činidla na zónu proužku. Barevná reakce byla hodnocena po 1-2 minutách. PYRAtest se hodnotí následně:

Tab. 2

Reakce	Barevné vyjádření reakce
Pozitivní	Červená, červenooranžová, oranžová
Negativní	Žlutá

(Příbalový leták PYRAtest)

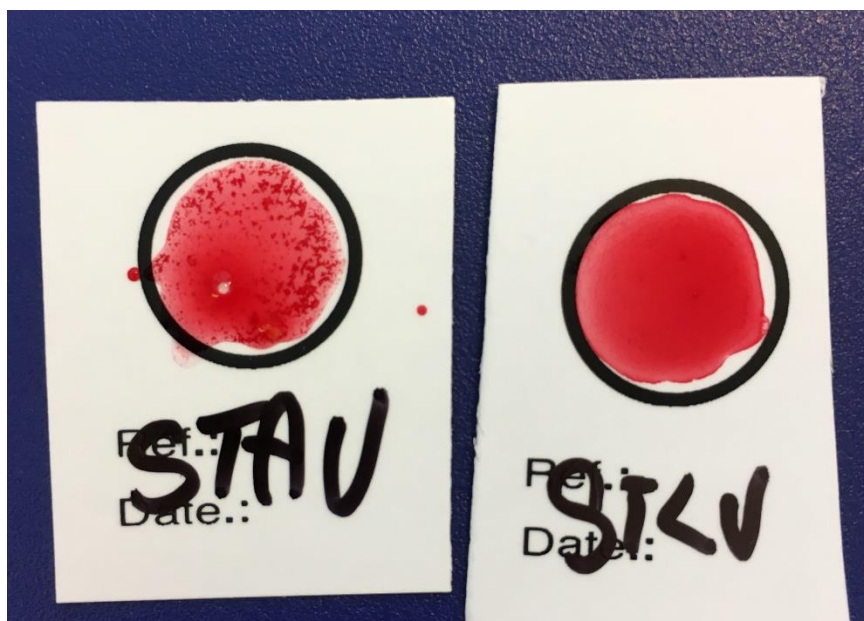
PYRAtest byl u kmenů *S. lugdunensis* pozitivní.



Obr. 4 PYRAtest

4.5.3.1 PASTOREX STAPH-PLUS

Jedná se o rychlý aglutinační test určený pro souběžnou detekci afinity k fibrinogenu (clumping faktor), proteinu A kapsulárních polysacharidů *Staphylococcus aureus* (Příbalový leták PASTOREX STAPH-PLUS).

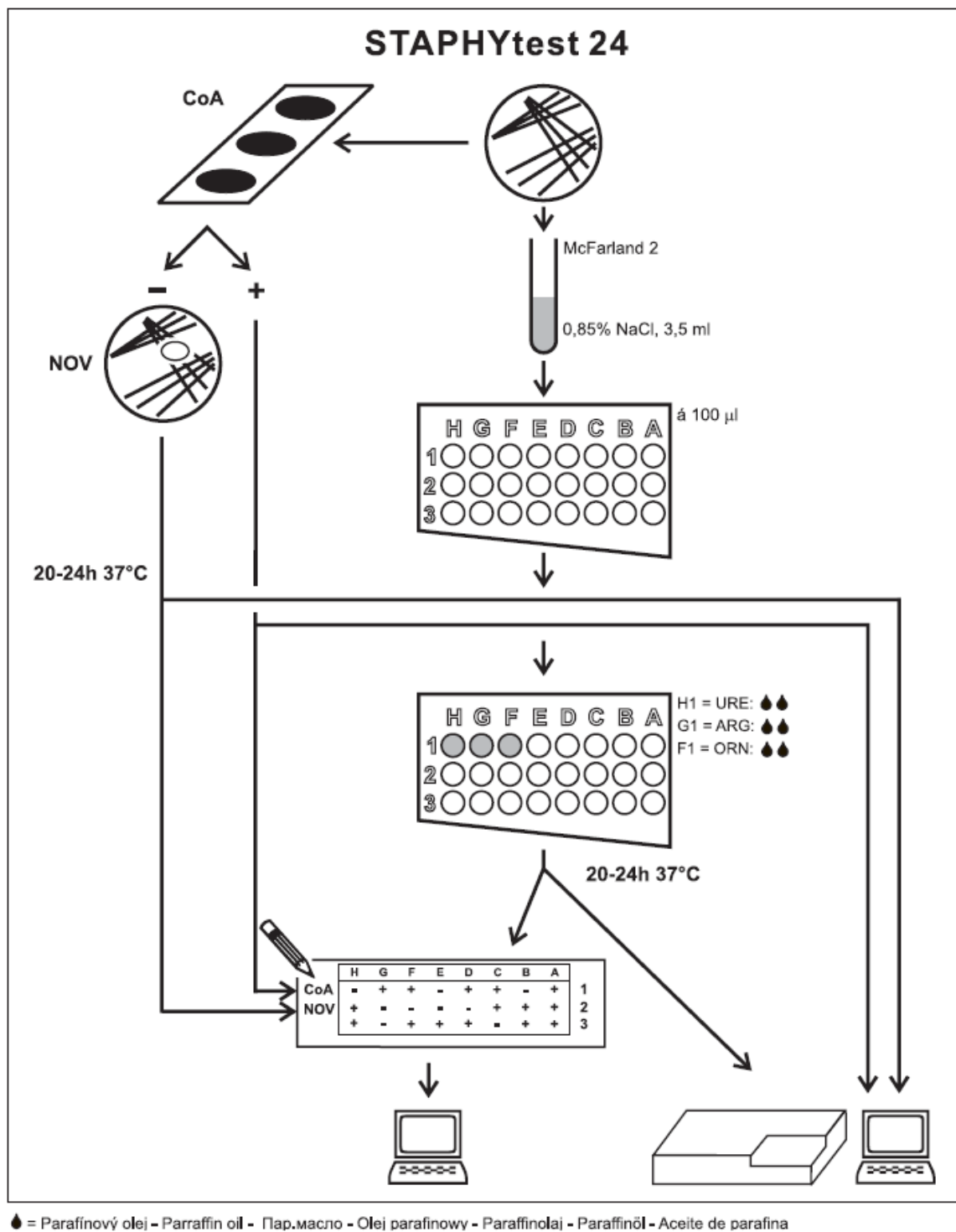


Obr. 5 PASTOREX STAPH-PLUS

4.5.3.2 STAPHYtest 24

Souprava STAPHYtest 24 je určena pro cílenou identifikaci druhů rodu *Staphylococcus* izolovaných z klinického materiálu a pro jejich odlišení od jiných grampozitivních kataláza pozitivních koků. V soupravě se provádí čtyřicet vyšetření pomocí čtyřadvaceti biochemických testů, testy se hodnotí vizuálně nebo přístrojově. Standardními off-line testy soupravy jsou screeningový průkaz koagulázy a růstový průkaz rezistence k novobiocinu. Testy jsou umístěny v jamkách trojstripu dělené mikrotitrační destičky, kdy jeden trojstrip je určen pro identifikaci jednoho kmene.

Z čisté 24 hodinové kultury byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku, která byla pomocí vortexu důkladně homogenizována. Stupeň zákalu odpovídal 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice, neboť slabší nebo silnější suspenze by mohla vést k falešným reakcím. Do každé jamky trojstripu destičky bylo přidáno 100 μ l suspenze. K určeným jamkám (H1, G1 a F1 tj. testy URE, ARG a ORN) bylo přidáno po dvou kapkách parafinového oleje. Rámeček panelu s naočkovanými řadami se vložil do PE sáčku a nechal se inkubovat 20-24 hodin v termostatu při teplotě 37°C. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí identifikačního programu TNW. Při identifikaci bylo nutno nahlížet na kulturu komplexně, v úvahu se musel brát původ izolátu, charakter kolonií, pigmentace, hemolýza. (Příbalový leták STAPHtest 24)



Obr 6 návod k STAPHYtestu 24



Obr. 7 identifikační mikrotitrační destička

MIKROLATEST®
STAPHYtest 24

Datum/Dátum/Date/Дата: 28.4.16
 Zprac./Sprac./Ref./Идент. прован: Erba Lachema
 www.erbalachema.com

Kmen č./Кмең č./Strain No./Но. анализа: 0001
 Poznámky/Notes/Отметки:

Offline tests/tests/тесты	H	G	F	E	D	C	B	A	
CO1A	UR1 -	AR1 -	OR1 -	bg1 +	GL1 -	bg1 -	PHS -	ESL -	1
NO2V	NAG +	AGL -	SUC +	TR2 +	MAN -	MLT +	XYL -	MNS +	2
	LAC -	SOR -	RIB -	FR4 +	CEL -	ARA -	RAF -	XOL -	3
=Profil/Profile/Профиль									

Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты

VP	PYR	OXI					
	+						

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация

06/13

Obr. 8 formulář pro záznam výsledků STAPHYtestu 24

4.5.3.3 *Vyšetření citlivosti k novobiocinu*

Vyšetření citlivosti k novobiocinu se provádí u všech KNS a zahrnuje se do STAPHYtestu 24, kam se zaznamenává výsledek.



Obr. 9 citlivost k novobiocinu

4.6 *Citlivost k antibiotikům*

Pro testování citlivosti k antibiotikům byl použit diskový difúzní test. Tento test je nejčastěji využívanou metodou pro stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům.

Mueller- Hintonovo médium se přetře suspenzí *S. lugdunensis* ve fyziologickém roztoku o známé hustotě. Zákal se měří na denzitometru, který měří zákal (hustotu) na stupně zákalu podle McFarlanda. Pro stanovení citlivosti k antibiotikům se vytváří 0,5 ° McFarlanda. Poté se na médium pokládají disky napuštěné jednotlivými antibiotiky. Po inkubaci je hodnocena velikost inhibiční zóny kolem antibiotického disku, kdy každý disk má přesně určenou hraniční hodnotu inhibiční zóny. Při stanovení citlivosti bylo dbáno na doporučení EUCASTu.

Žádný z identifikovaných kmenů *S. lugdunensis* nebyl rezistentní na meticillin ani na jiná antistafylokoková antibiotika.



Obr.10 Mueller-Hintonova pŕda

4.7 MALDI TOF MS a molekulovŕ metody

V laboratoři Stafila, spol s r.o. není k dispozici pŕstroj MALDI TOF ani jiné pŕstroje pracující na molekulovŕch metodŕch. Pokud je v laboratoři potřeba dourčít kmen pomocí MALDI TOF nebo moderních molekulovŕch metod má laboratoř možnost zaslat vzorek do spolupracující laboratoře.

5 Výsledky

Byl porovnán výskyt *S. lugdunensis* a *S. aureus*, neboť *S. aureus* a *S. lugdunensis* způsobují podobné infekce. Porovnání bylo zaměřeno na tzv. klinický materiál, který je na žádance označen jako ostatní. Klinickým materiálem se v laboratoři Stafila, spol. s r.o. označuje materiál který je z různých částí těla. Většinou se jedná o výtěr z rány, stěr z kůže, hnis, absces, akné, impetigo, dekubitus, bércový vřed. Dále se sem také řadí např. sekrety ze středouší a výtěry ze zevního zvukovodu.

Výskyt kmenů *S. lugdunensis* v klinickém materiálu za rok 2016 nebyl tak výrazný, jak se nejprve předpokládalo, avšak vždy šlo o hnisavé infekce.

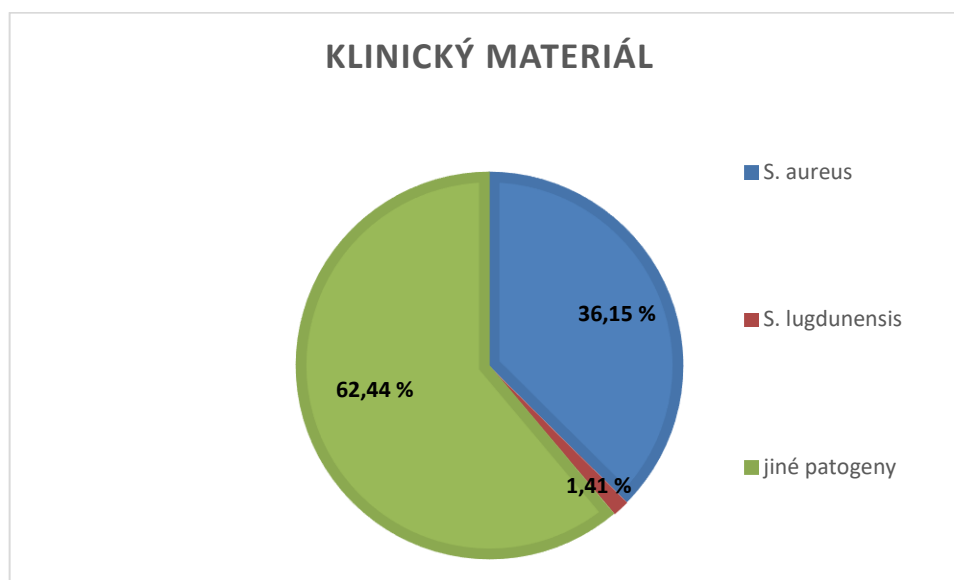
Tab.3

<i>S. lugdunensis</i>	počet	Procentuální zastoupení
stěr z kůže	4	36 %
Akné	1	9 %
Hnis	2	18 %
výtěr z rány	1	9 %
bércový vřed	1	9 %
impetigo	1	9 %
absces	1	9 %



Obr. 11 graf znázorňující výskyt kmenů *S. ludunensis*

V grafu je znázorněno, jak velký byl výskyt kmenů *S. aureus* a *S. lugdunensis* z klinického materiálu. Ostatními patogeny v klinickém materiálu bývají streptokoky, entereobakterie, anearobní kmeny atd. Většina ostatních KNS, jako třeba *Staphylococcus epidermidis*, byli hodnoceni jako kontaminace.



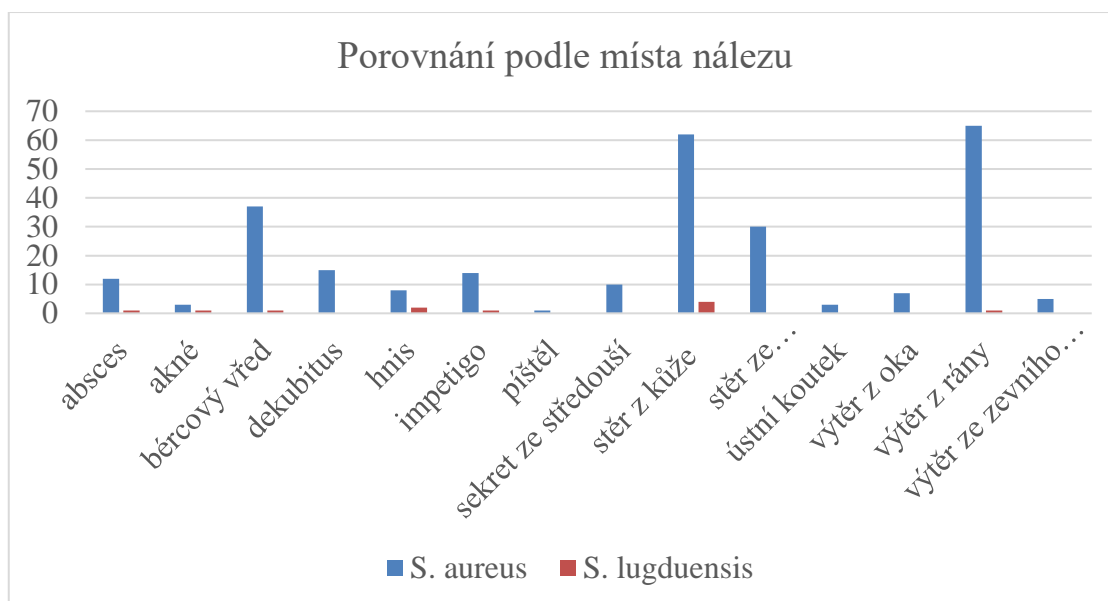
Obr.12 graf znázorňující rozdělení klinického materiálu

S. aureus byl identifikován u 36,15 % klinického materiálu z daného roku a *S. lugdunensis* u 1,41 %.

Tyto dva stafylokoky byli porovnání ještě z hlediska místa, odkud byl materiál odebrán.

Tab.3

Místo odběru	<i>S. aureus</i>	<i>S. lugduensis</i>
Absces	12	1
Akné	3	1
bércový vřed	37	1
Dekubitus	15	0
Hnis	8	2
Impetigo	14	1
Píštěl	1	0
sekret ze středouší	10	0
stěr z kůže	62	4
stěr ze spojiv. vaku	30	0
ústní koutek	3	0
výtěr z oka	7	0
výtěr z rány	65	1
výtěr ze zevního zvukovodu	5	0



Obr. 13 porovnání výskytu *S. aureus* a *S. lugdunensis*

Během roku 2016 byl *S. lugdunensis* identifikován jako patogen i u močových infekcí. Jednalo se o dva případy, v obou případech byla pacientem žena. U jedné z pacientek byl *S. lugdunensis* nalezen i ve vaginálním výtěru.

Zatímco u kmenů *S. aureus* byla v 44 případech prokázána rezistence k meticilinu, u kmenů *S. lugdunensis* nebyla zjištěna žádná rezistence.

6 Diskuze

Cílem práce bylo prokázat, že *Staphylococcus lugdunensis* je patogenem, který by rozhodně neměl být přehlížen. Toto tvrzení se podařilo potvrdit. Během jednoho roku způsobil několik hnisavých infekcí různých lokalizací, ať už se jednalo o kožní infekce, s kterými bývá v posledních letech spojován, tak byl identifikován i u infekcí močových cest.

U infekcí z klinického materiálu způsobil *S. lugdunensis* 1,41 % všech infekcí. Oproti tomu *S. aureus* 36,15 % všech infekcí označených v laboratoři jako infekce z ostatního klinického materiálu.

Přestože se uvádí, že *S. lugdunensis* může většinou způsobit infekce hospitalizovaným pacientům, je evidentní, že je schopen způsobit infekce i u jinak zdravých osob a že se nejedná pouze o podmíněného patogena nozokomiálních nákaz. Neboť materiál zasílaný do laboratoře Stafila, spol. s r.o. v naprosté většině případů pochází od terénních, obvodních lékařů, tudíž od komunitních pacientů, nikoli od hospitalizovaných. Navíc tento materiál se nedá považovat za primárně sterilní, neboť se většinou jedná o výtěry z ran, stěry z kůže apod., nikoliv o hemokultury a jiný materiál odebíraný z primárně sterilních míst.

Během roku 2016 byl *S. lugdunensis* identifikován jako patogen u dvou případů močových infekcí a jedné vaginální infekce.

Identifikované množství *S. lugdunensis* není sice nijak časté, ale jako patogen by neměl být přehlížen, neboť je schopen způsobit infekce velmi podobné infekcím způsobeným kmenem *Staphylococcus aureus*. Pokud byl v laboratoři identifikován u kožních infekcí jednalo se vždy o hnisavou kožní infekci. V některých případech byl nález *Staphylococcus lugdunensis* masivní.

U nálezu *Staphylococcus lugdunensis* se velmi dbá na celkový stav pacienta a tento nález by měl být konzultován s ošetřujícím lékařem. Spolupráce laboratoře s ošetřujícím lékařem je tedy nutná. *S. lugdunensis* je signifikantním původcem kožních infekcí, což bylo touto prací dokázáno. Jak už bylo zmíněno, co do počtu izolátů se *S. aureus* rovnat nemůže, ale co se závažnosti kožních infekcí ano. Výhoda infekcí *S. lugdunensis* je, že tento stafylokok je poměrně dobře citlivý na antibiotickou léčbu, na rozdíl od zmíněného *S. aureus*. Žádný z identifikovaných kmenů *S. lugdunensis* neměl žádnou

závažnou rezistenci na antistafylokoková antibiotika. I přesto bývají infekce způsobené tímto stafylokokem hůře zvládnutelné. V laboratoři bylo během roku zachyceno 44 meticillin resistantních kmenů *S. aureus*, ale ani jeden rezistentní kmen *S. lugdunensis*.

7 Závěr

V bakalářské práci jsou hodnoceny současné možnosti laboratorní diagnostiky koaguláza negativních stafylokoků, především kmenů *S. lugdunensis*. Práce byla prováděna v laboratoři Stafila, spol. s r.o. která má laboratoř mikrobiologie spíše menší velikosti. Tudíž na tomto pracovišti nejsou k dispozici všechny nejmodernější molekulární metody, proto se pro diagnostiku provádí klasická kultivace s identifikací kmene podle fenotypových znaků. Navíc v této laboratoři mají dobrou spolupráci se spolupracujícími laboratořemi, kam je možnost zasílat vzorky např. na vyšetření MALDI TOF MS.

Biochemické dourčení *S. lugdunensis* považují za poměrně přesné, neboť spojení všech prováděných biochemických testů je dostačující. Pro odlišení od *S. aureus* je podstatné provést test HYA, dále PYRAtest, který je u kmenů *S. lugdunensis* pozitivní. U KNS byl dále proveden STAPHYtest24, který obsahuje širokou škálu biochemických testů. Mezi jeden z těchto testů patří i ornithin, který je pro *S. lugdunensis* naprosto typický. K STAPHYtestu 24 se vždy přikládá ještě citlivost k novobiocinu, na ten je *S. lugdunensis* citlivý dobře. Spojení všech těchto testů a znalostí a zkušeností mikrobiologa mohou vést k opravdu přesné identifikaci kmene jako *S. lugdunensis*.

Identifikace pomocí biochemických testů má samozřejmě i některé nevýhody, jako je např. délka vyšetření. Identifikace pomocí MALDI TOF by byla mnohem rychlejší. Vzhledem k tomu, že laboratoř je zaměřena na materiál získaný od terénních obvodních lékařů, tak se nejedná o život ohrožující infekce, a proto tu používání časově náročnějších metod není překážkou. Díky tomu se výsledek vždy odešle i se zjištěnou citlivostí na antibiotika

S. lugdenunsis byl několikrát potvrzen jako patogen, zejména u kožních infekcí. Je patrné, že je vhodné na něj při mikrobiologické diagnostice pomyslet jako na možného patogena. I v menší laboratoři byl *S. lugdunensis* několikrát během roku prokázán jako patogen. Je znám především jako původce nozokomiálních nákaz a nákaz u imunosupresivních pacientů, takže se dá předpokládat jeho větší záchyt v nemocničních laboratořích.

8 Zdroje

1. BANNERMAN, T. L. a S. J. PEACOCK, 2007. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. *Manual of clinical microbiology*. **9**(1), 390 - 411.
2. BENEŠ, Jiří, c2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.
3. BERA, A., R. BISWAS, S. HERBERT a F. GOTZ, 2006. The Presence of Peptidoglycan O-Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity. *Infection and Immunity*. **74**(8), 4598-4604. DOI: 10.1128/IAI.00301-06.
4. BOCHER, S., B. TONNING, R. L. SKOV a J. PRAG, *Staphylococcus lugdunensis, a Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community*. DOI: 10.1128/JCM.01024-08.
5. CLARRIDGE, J. E., III. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:840–862.
6. DE PAULIS, A. N., S. C. PREDARI, C. D. CHAZARRETA a J. E. SANTOIANNI, *Five-Test Simple Scheme for Species-Level Identification of Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci*. DOI: 10.1128/JCM.41.3.1219-1224.2003.
7. FADEL, H. J., R. PATEL, E. A. VETTER a L. M. BADDOUR, *Clinical Significance of a Single Staphylococcus lugdunensis-Positive Blood Culture*. DOI: 10.1128/JCM.02058-10.
8. FRANK, K. L. a R. PATEL, *Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by icaADBC-Positive Staphylococcus lugdunensis Isolates*. DOI: 10.1128/IAI.00640-07.
9. FRANK, K. L., J. L. DEL POZO a R. PATEL, 2008. From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for Staphylococcus lugdunensis. *Clinical microbiology reviews*. (21). DOI: 10.1128/CMR.00036-07.
10. FRENEY, J., Y. BRUN, M. BES, H. MEUGNIER, F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, C. NERVI, and J. FLEURETTE. 1988. *Staphylococcus lugdunensis*

sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 38:168–172.

11. GARCIA, 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.
12. GREENWOOD, David, Richard C. B. SLACK a John Forrest PEUTHERER, 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie.* Vyd. 1., čes. Praha: Grada. ISBN 80-716-9365-0.
13. HAVLIŠ, J. *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF.* *Vesmír* 78, 1999/8.
14. CHASSAIN, B., L. LEMEE, J. DIDI, J.-M. THIBERGE, S. BRISSE, J.-L. PONS a M. PESTEL-CARON, 2012. Multilocus Sequence Typing Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population Structure. *Journal of Clinical Microbiology.* **50**(9), 3003-3009. DOI: 10.1128/JCM.00988-12.
15. INADA, N., N. HARADA, M. NAKASHIMA a J. SHOJI, *Severe Staphylococcus lugdunensis keratitis.* DOI: 10.1007/s15010-014-0669-2.
16. IRAVANI MOHAMMAD ABADI, Mohammad, Rezvan MONIRI, Ahmad KHORSHIDI, Ahmad PIROOZMAND, Seyed Gholam Abbas MOUSAVI, Kamran DASTEHGOLI a Hamed MIRZAEI GHAZI KALAYEH, *Molecular Characteristics of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci in School Students.* DOI: 10.5812/jjm.18591v2.
17. MALÍKOVÁ, Libuše, 2007. *Výskyt koaguláza negativních stafylokoků jako původců nozokomiálních nákaz: Fenotypová a molekulárně biologická charakteristika.* Brno. Diplomová práce.
18. MITCHELL, J., Anne TRISTAN a Timothy J. FOSTER, 2004. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis.* *Microbiology.* **150**(11), 3831-3841. ISSN 1350-0872.
19. NILSSON, M, *A von Willebrand factor-binding protein from Staphylococcus lugdunensis.* DOI: 10.1016/j.femsle.2004.03.024.

20. PATŮČEK, Roman, Ivo SEDLÁČEK, Pavel ŠVEC, Ivana MACHOVÁ, Ivana MAŠLAŇOVÁ, Tereza GELBÍČOVÁ, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jiří DOŠKAŘ, 2013. *Staphylococcus petrasii*, nový druh stafylokoka z České republiky. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. **22**(8), 266-69.
21. PETRÁŠ, Petr, 2010. ORIDES-orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. **19**(12), 373-378.
22. PETRÁŠ, Petr, 2011. *ZJIŠTĚNÍ PRODUKCE HYALURONIDÁZY*.
23. SPEZIALE, Pietro, Giampiero PIETROCOLA, Timothy J. FOSTER a Joan A. GEOGHEGAN, *Protein-based biofilm matrices in Staphylococci*. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00171.
24. URBÁŠKOVÁ, Pavla, 2014. *Testování citlivostí k antibiotikům-tabulky breakpointů EUCAST*. SZÚ Praha.
25. VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-868-5000-5.
26. VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5.
27. YEH, Chun-Fu, Tsui-Ping LIU, Chun-Wen CHENG, Shih-Cheng CHANG, Ming-Hsun LEE, Jang-Jih LU a Jose MELO-CRISTINO, 2015-8-6. Molecular Characteristics of Disease-Causing and Commensal *Staphylococcus lugdunensis* Isolates from 2003 to 2013 at a Tertiary Hospital in Taiwan. *PLOS ONE* . **10**(8), e0134859-DOI: 10.1371/journal.pone.0134859. Příbalový leták PYRAtest od firmy Erba Lachema s.r.o.,
28. Příbalový leták PASTOREX STAPH-PLUS testu od firmy Bio-rad,
29. Příbalový leták STAPHYtest 24 od firmy Erba Lachema s.r.o., 2011

9 Seznam zkratek

DNA	deoxyribonukleová kyselina
HYA	hyauronidáza
KNS	koaguláza negativní stafylokoky
KPS	koaguláza pozitivní stafylokoky
MALDI TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization time-of- flight
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PYR	pyrrolidonylarylamidáza
S.	<i>Staphylococcus</i>