



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Význam rychlé diagnostiky MRSA
u pacientů a v nozokomiálním prostředí
Nemocnice Strakonice, a.s.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/
ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Andrea Kubičková

Vedoucí práce: PharmDr. Šimečková Eva

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem: Význam rychlé diagnostiky MRSA u pacientů a v nozokomiálním prostředí Nemocnice Strakonice, a.s. 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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 28. 4. 2019

.....

Andrea Kubičková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce prim. PharmDr. Evě Šimečkové za trpělivost, ochotu a vedení mé bakalářské práce, dále RNDr. Janě Fleischmannové Ph.D. za cenné rady při zpracování celé práce. V neposlední řadě bych ráda také poděkovala celému týmu oddělení ÚKMAS, Nemocnice Strakonice, a.s. a rovněž pak i celé své rodině za podporu po celou dobu studia.

Význam rychlé diagnostiky MRSA u pacientů a v nozokomiálním prostředí Nemocnice Strakonice, a.s.

Abstrakt

Kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA) patří mezi nebezpečné původce nozokomiálních infekcí. Mortalita spojená s bakteriemií se udává 20-40%. Léčba nozokomiálních infekcí je komplikovaná a finančně náročná. Ke snížení rizika pro pacienty přispívá zavedení protiepidemických opatření, která umožňují účinné vyhledávání nosičů MRSA a zabraňují šíření rezistentních klonů v rámci nemocnice, stejně jako rychlá a spolehlivá diagnostika MRSA infekcí.

Tato práce má za cíl popsat výskyt MRSA v Nemocnici Strakonice a.s. v letech 2012-2018 a ověřit využitelnost PBP2a rychlého imunochromatografického testu pro rychlou diagnostiku MRSA.

Celková incidence MRSA v období 2012-2018 byla vypočítána na 3,27/1000 pacientů. Nejvyšší incidence MRSA za celé sledované období byla roce 2018 (4,2/1000 pacientů). Vyšší incidence byla zjištěna u osob starších 60-ti let a spíše u mužů. Nejvyšší počet nových případů MRSA byl zaznamenán na chirurgickém a interním oddělení. 29-51 % záchytů MRSA pocházelo z cíleného screeningu. Nejčastějším klinickým materiálem byly výtěry z ran a defektů.

V roce 2018 bylo imunochromatografickou metodou PBP2a Culture Colony Test testováno 74 izolátů *S. aureus* z klinicky závažného materiálu (hemokultury, tekuté materiály, tracheální aspiráty). Detekováno bylo 8 pozitivních vzorků a 66 negativních. Získané výsledky byly ve všech případech shodně potvrzeny diskovou difúzní metodou.

Výsledky analýzy byly známy do 6 minut od identifikace kmene a aktivně sděleny ošetřujícímu lékaři, což vedlo k signifikantnímu urychlení nasazení cílené antibiotické terapie. Alere™ PBP2a SA Culture Colony Test pro rychlou diferenciaci mezi MRSA

a citlivými kmeny vykazoval 100% citlivost a specificitu. Tento test je vhodné zařadit do rutinního mikrobiologického vyšetřování na ÚKMAS, Nemocnice Strakonice, a.s.

Klíčová slova

Staphylococcus aureus; MRSA; HA-MRSA; CA-MRSA; PBP2a protein; antibiotická rezistence; infekce spojené se zdravotnickou péčí

The importance of rapid diagnostic of MRSA patients and in the nosocomial environment of the Nemocnice Strakonice, a.s.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) belong among the dangerous agents of nosocomial infections. Bacteremia-related mortality is reported 20-40%. Treatment of nosocomial infections is complicated and financially demanding. To reduce the risk for the patients, the introduction of anti-epidemic measures contributes for the effective searching of MRSA carriers and preventing the spread of resistant clones within the hospital, as well as rapid and reliable diagnosis of MRSA infections.

The aim of this bachelor thesis is to describe the occurrence of MRSA strains in the Hospital Strakonice a.s. in 2012-2018 and to verify the usefulness of the Alere™ PBP2a SA Culture Colony Test for rapid MRSA diagnosis. The overall incidence of MRSA strains in the period of 2012-2018 was 3,27/1000 patients. The highest incidence of MRSA strains in reporting period was reported in 2018 (4,2/1000 patients). The higher incidence was detected in patients over 60 years of age and mainly in male patients. The wards where the highest number of new MRSA cases were recorded were surgical and internal ones, respectively. With the help of targeted screening from 29 up to 51 % new MRSA cases were revealed. The most common specimens were wound specimens (deep as well as superficial).

In 2018, 74 isolated *Staphylococcus aureus* strains from clinically relevant materials such as blood and other body fluid specimens and tracheal aspirates were tested with the help of Alere™ PBP2a SA Culture Colony Test. 8 isolates were detected positive for PBP2a protein and 66 were negative. Obtained results were in all cases confirmed by the disc diffusion technique with the same results.

The results of analysis were known within 6 minutes after the identification of *Staphylococcus aureus* strain and could have been actively reported to the physician. This lead to the significant speed-up of early initiation of appropriate targeted antibiotic therapy.

Alere [™] PBP2a SA Culture Colony Test for rapid distinction between MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus* strains reported 100% sensitivity as well as specificity. This test should be included in routine microbiological examination at ÚKMAS, Nemocnice Strakonice, a.s.

Key words

Staphylococcus aureus; MRSA; HA-MRSA; CA-MRSA; PBP2a protein; antibiotic resistance; healthcare-associated infections

Obsah

1. Úvod	10
2. Literární přehled	11
2.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	11
2.1.1 Taxonomie	12
2.1.2 Morfologie	12
2.1.3 Biochemické vlastnosti a metabolismus	12
2.1.4 Rozdělení	13
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2.1 Epidemiologie	13
2.2.2 Faktory virulence	14
2.2.3 Onemocnění a léčba	16
2.3 Rezistence k antibiotikům	17
2.3.1 Beta-laktamáza – penicilináza	17
2.3.2 Modifikace PBP2	18
2.3.3 BORSA	18
2.4 Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.4.1 CA-MRSA	20
2.4.2 HA-MRSA	21
2.4.3 Současná epidemiologická situace v Evropě a České republice	21
2.5 Protiepidemická opatření v nemocničních zařízeních	23
2.5.1 Cílená ATB terapie	23
2.5.2 Surveillance MRSA	24
2.5.3 Opatření při výskytu MRSA	25
2.6 Možnosti identifikace MRSA	25
2.6.1 Selektivně diagnostické půdy	26

2.6.2	Disk s cefoxitinem	26
2.6.3	Detekce proteinu PBP2a	27
2.6.4	Detekce <i>mecA/mecC</i> genu	28
3.	Cíle práce a hypotézy	29
4.	Metodika.....	30
4.1	Materiál a metody	30
4.1.1	Zpracování materiálu	30
4.1.2	Kultivace	31
4.1.3	Identifikace	31
4.1.4	Stanovení citlivosti	34
4.1.5	Výběr a zpracování dat	35
5.	Výsledky.....	37
5.1	Detekce PBP2a proteinu ve vybraných vzorcích v roce 2018	37
5.2	Nové případy MRSA v nemocnici Strakonice 2012-2018	40
5.2.1	Rozdělení dle věku a pohlaví.....	41
5.2.2	Rozdělení dle oddělení.....	43
5.2.3	Rozdělení dle materiálu	45
5.2.4	Hemokultury	47
6.	Diskuse	49
7.	Závěr.....	53
8.	Seznam literatury	54
9.	Seznam příloh.....	67
10.	Seznam zkratk.....	70

1. Úvod

Antibiotická rezistence je celosvětovým problémem. Již krátce po zavedení antibiotik do běžné medicínské praxe některé bakteriální druhy začaly vykazovat odolnost k určitým antibiotikům. Jedním z prvních byl *Staphylococcus aureus*, jehož rezistence se nejprve vztahovala pouze na penicilin. Po zavedení methicilinu ale začaly některé kmeny vykazovat rezistenci i k tomuto antibiotiku. Těmto kmenům se začalo říkat methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Schopnost rezistence získaly horizontálním přenosem genů a mutací vlastních genů. Tyto kmeny nejsou virulentnější než kmeny citlivé, ale mohou způsobit závažné, život ohrožující infekce. Mortalita spojená s bakteriemií se udává 20-40%.

Staphylococcus aureus patří mezi běžně se vyskytující bakterie na kůži nebo sliznici třetiny celosvětové populace bez klinických známek infekce. Za určitých podmínek tyto kmeny mohou způsobit širokou škálu onemocnění (většinou pyogenního charakteru), kterými jsou ohroženi především hospitalizovaní pacienti, osoby s oslabenou imunitou, narkomani či lidé pokročilého věku. Hospitalizace je důležitým rizikovým faktorem nákazy nozokomiálními kmeny, které díky selekčnímu tlaku antibiotik získaly výhodu nad citlivými kmeny. V posledních letech se začaly objevovat komunitní kmeny MRSA, jež se vyskytují u zdravých osob bez předchozí hospitalizace. Komunitní kmeny se liší od nemocničních svými epidemiologickými a klinickými rysy, rozdíl se ale stále víc stírají. Infekce MRSA kmeny prodlužuje hospitalizaci, navyšuje mortalitu a morbiditu, čímž negativně ovlivňuje finanční náklady spojené s léčbou. Cílem je tedy monitorovat výskyt na národní i celosvětové úrovni. V České republice je od roku 2008 výskyt invazivních infekcí způsobené rezistentními kmeny *S. aureus* na konstantní úrovni 12-15%.

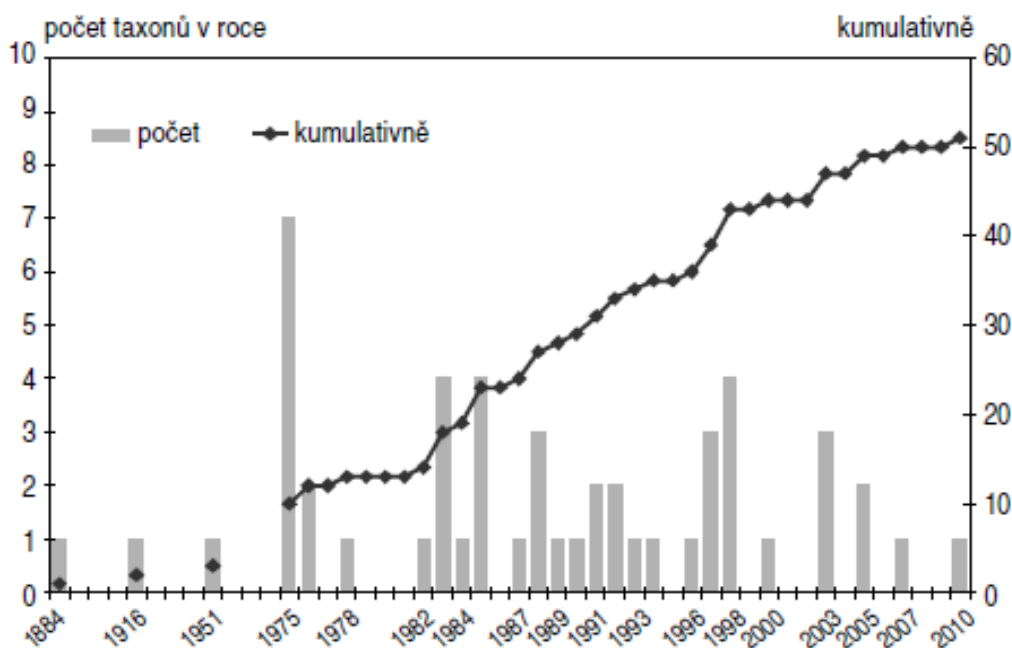
2. Literární přehled

2.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky patří mezi jedny z nejdéle studovaných bakterií, jejich první popis pochází již z konce 19. století (1880), kdy nezávisle na sobě francouzský přírodovědec L. Pasteur a skotský chirurg A. Ogson, pozorovali koky v hnisajících ranách (Petráš, 2004).

O další dva roky později roku 1882 byl poprvé použit název *Staphylococcus*. Stafylokoky získali svůj název podle odvozených latinských slov – *staphylé* znamená v překladu hrozen a *coccus* zrno či bobule. (Petráš, 2004).

V první polovině 20. století byly popsány tři zástupci rodu *Staphylococcus*. Ten poslední byl 1951, v následujících letech přibýly další druhy (Petráš, 2010). V současné době je popsáno přes 64 taxonů stafylokoků získaných z různých materiálů. Nejnovější druh je *Staphylococcus edaphicus*, jenž je popsán českými taxonomy z prostředí v Antarktidě (Petráš a Kekláková, 2018).



Obr. 1: Graf počtu nově popsáných druhů a poddruhů rodu *Staphylococcus* (Petráš, 2010)

2.1.1 Taxonomie

Rod *Staphylococcus* je řazen v systematické bakteriologii dle Bergeyeho manuálu následovně:

Říše: *Eubacteria*

Oddělení: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Bacillales*

Čeleď: *Staphylococcaceae*

Rod: *Staphylococcus*

(Boone et al., 2012)

2.1.2 Morfologie

Do rodu *Staphylococcus* se řadí grampozitivní nesporeující a nepohyblivé koky o velikosti přibližně 0,5-1,5 μm (Bednář, 1996). Stafylokoky se dělí nepravidelně v různých rovinách buňky, proto je pro ně typické uspořádání ve tvaru hroznů, ale mohou se nacházet také v párech, čtveřicích či krátkých řetězcích (Greenwood, Slack, Peutherer, 1999).

Na pevných kultivačních půdách tvoří stafylokoky kulaté, hladké, vyvýšené a lesknoucí se kolonie, které mohou být obklopeny zónou hemolýzy (Toltzis, 2018).

2.1.3 Biochemické vlastnosti a metabolismus

Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní kataláza pozitivní bakterie. Zkvašují manitol, štěpí močovinu, cukry (trehalózu a sacharózu) a redukují nitráty. Při zkvašování velké řady cukrů tvoří kyseliny, nikoliv však plyn. Bakterie z rodu *Staphylococcus* jsou poměrně odolné k vlivům zevního prostředí. Jsou schopné odolávat teplotám do 60 °C po dobu až 30 minut, dále pak vysychání, kdy za přítomnosti proteinů přežívají

až několik týdnů např. v zaschlém hnisu. Snáší dobře vyšší koncentrace NaCl. Tyto vlastnosti zřejmě umožňují přechodné (transrezidentní) nebo i trvalé (rezidentní) osídlení určitých kožních oblastí některými stafylokoky (Beneš 2009).

2.1.4 Rozdělení

V laboratorní praxi dělíme stafylokoky na koaguláza pozitivní a negativní na základě jejich schopnosti produkovat enzym plazmakoagulázu. Ta vytváří enzymaticky aktivní komplex se specifickým protrombinem, který mění solubilní fibrinogen na pevný fibrin (Votava, 2003). Mezi koaguláza pozitivní řadíme 12 druhů především *S. aureus*, dále pak např. *S. intermedius*, *S. hyicus* (Petráš, 2018). Ke koaguláza negativním stafylokokům patří více než 30 taxonů, z nichž je celá řada součástí běžné mikrobioty u člověka a může za určitých podmínek vyvolat infekce (Petráš, 2010).

2.2 *Staphylococcus aureus*

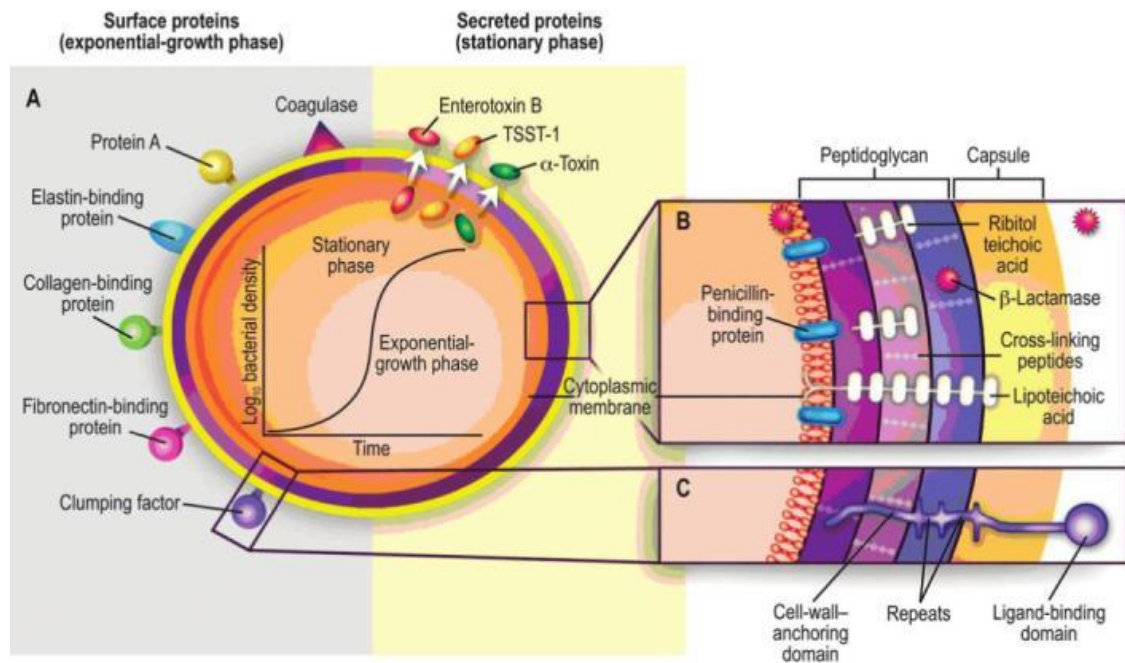
S. aureus je klinicky nejvýznamnějším zástupcem koaguláza pozitivních stafylokoků. Byl popsán v roce 1884 německým bakteriologem F. Rosenbachem. Své druhové jméno *aureus* (lat. zlatý) získal díky produkci pigmentu, který dává jeho koloniím zlatavý vzhled (Petráš, 2004).

2.2.1 Epidemiologie

S. aureus běžně kolonizuje lidskou kůži a je přítomen na sliznici dutiny ústní a nosu u přibližně 25-30 % dospělých bez jakéhokoliv narušení hostitelského organismu (Harvey et al., 2006). K onemocnění dochází především při oslabení imunitního systému organismu nebo při infekci vysokou dávkou virulentního kmene. Významným rizikovým faktorem může být úraz, chirurgický zákrok či přítomnost cizorodého materiálu jako jsou implantáty, katétry, protetický materiál. Další důležitou predispozicí pro vnik infekce je snížení imunity pacienta (např. diabetes, onkologické onemocnění), jinou významnou příčinou může být věk pacienta ať už pro nezralost imunity u nedonošenců nebo naopak polymorbidita seniorů (Matouskova a Janout, 2008). Infekce může vzniknout endogenně nebo exogenně, kdy zdrojem může být kolonizovaná osoba, kontaminovaná potravina či předmět (např. sdílené ručníky, holicí strojky, aj.)(Harvey et al., 2006).

2.2.2 Faktory virulence

Patogenita *S. aureus* je dána celou řadou faktorů virulence. Lze je rozdělit jednoduše do dvou skupin: povrchové a extracelulární, jak je znázorněno na obr. 2.



Obr. 2: Faktory virulence kmene *S. aureus* (Gordon a Lowy, 2008)

2.2.2.1 Povrchové faktory

Některé kmeny zlatého stafylokoka tvoří polysacharidové pouzdro, které je chrání před interakcí s fágy, fagocyty, imunoglobuliny a komplementem. Peptidoglykan jako základní komponenta buněčné stěny všech grampozitivních bakterií podporuje produkci cytokinů a výrazně ovlivňuje nespecifickou imunitní odpověď organismu. V kůži vyvolává lokální zánětlivou reakci (Bednář, 1996). Dále se na povrchu bakteriální stěny nacházejí proteiny, přispívající ke kolonizaci sliznic a kůže (adheziny, kys. teichoová, polysacharid A). Podporují ji tím, že umožňují adhezi bakterií k mezibuněčné hmotě (např. fibrinogenu, fibronektinu, kolagenu či vitronektinu) nebo povrchu hostitelských buněk. Jiné povrchové antigeny mohou působit antifagocytárně např. protein A (Votava, 2003).

2.2.2.2 Extracelulární faktory

Mezi extracelulární faktory virulence patří především exoenzymy a cytotoxiny, které poškozují membrány buněk nebo mohou působit jako superantigeny. Superantigeny se váží na komplex MHC II na antigen prezentující buňce a zároveň na T- buněčný receptor T- lymfocytů, čímž vyvolávají tak nespecifickou polyklonální aktivaci až 20% všech T-lymfocytů, což má za následek velmi bouřlivou reakci imunitního systému vedoucí k toxickému šoku (Votava, 2003). Stručný přehled vybraných exoenzymů a toxinů je znázorněn v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled vybraných exoenzymů a toxinů (Andrysík, 2004; Argudín et al., 2010; Bukowski et al, 2010; Daum, 2018; Dinges et al. 2010; Liu, 2015; Oliveira et al., 2018)

exoenzymy	účinek
hyaluronidáza	štěpí kys. hyaluronovou ve vazivech
lipáza	hydrolyzuje lipidy
beta-laktamáza	štěpí beta-laktamový kruh ATB
stafylokináza	rozpouští fibrinové sraženiny
toxiny	
hemolyziny (α - δ)	poškozují membrány buněk, především erytrocytů zdroj železa a růstových faktorů
Panton-Valentinův leukocidin (PVL)	tvoří póry v membráně fagocytů
superantigeny	
exfoliatiny A, B	hydrolyzují komponenty buněčných spojů v epidermis (způsobují oddělení epidermis od dermis)
enterotoxiny A-E, G-I	působí proti neutrofilům, složkám komplementu C5 a IgA, vyvolávají enterotoxikózy, někdy syndrom toxického šoku (STŠ)
toxic shock syndrome toxin (TSST-1)	uvolňuje prozánětlivé cytokiny, způsobuje STŠ

2.2.3 Onemocnění a léčba

S. aureus způsobuje celou řadu onemocnění různé závažnosti od lokalizovaných infekcí kůže, přes infekce měkkých tkání až po potenciálně život ohrožující systémové infekce při průniku bakterií do hlubších struktur a do krevního řečiště (Beneš, 2018). Pokud dojde k bakteriémii, může být infekce hematogenně zanesena do různých míst napadeného organismu, kde vznikají metastatická pyogenní ložiska. Tímto způsobem může dojít k sekundární pneumonii, osteomyelitidě, endokarditidě, pyelonefritidě atd. (Bednář, 1996).

Většina povrchových pyogenních infekcí způsobených *S. aureus* nevyžaduje celkovou antibiotickou (ATB) léčbu. Hojí se spontánně nebo postačí chirurgický zákrok, popřípadě aplikace lokálních ATB. Závažnější lokalizované infekce a hluboká ložiska ale vyžadují vždy kromě chirurgického zákroku i celkovou antibiotickou terapii. Lékem volby jsou aminopeniciliny s inhibítorem beta-laktamáz, např. oxacilin nebo amoxicilin/klavulanát (Beneš 2009).

Systémové infekce (sepsy, endokarditidy, atd.) musí být vždy léčeny pomocí vysokých dávek baktericidních antibiotik. Lékem volby je v tomto případě parenterální oxacilin, při rezistenci vankomycin (Jindrák et al., 2014). Pokud se jedná o infekci, kde hrají výraznou roli bakteriální toxiny, je vhodné použít ATB inhibující proteosyntézu – jako je linezolid či klindamycin. Nutná je i podpůrná léčba (Kluytmans a Struelens, 2009). Přehled onemocnění a možnosti léčby jsou stručně shrnuty v tabulce 2.

Tab. 2: Přehled používaných ATB (Jindrák et al., 2014; Rayner a Munckhof, 2005; Tong et al., 2015).

typ infekce	onemocnění	ATB terapie
lokalizované infekce		
<u>nekomplikované pyodermie</u>	impetigo, furunkl, karbunkl, panaricium, pemfigus neonatorum	lokální ATB
<u>závažnější a komplikované infekce kůže a měkkých tkání</u>	absces, celulitida, fascitida, pyomyositida, rané infekce	oxacilin, klindamycin, kotrimoxazol

systemové infekce		
<u>infekce krevního řečiště</u>	endokarditida, tromboflebitida, sepsy	oxacilin +gentamicin
<u>respirační infekce</u>	nekrotizující pneumonie	linezolid
<u>infekce kostí a kloubů</u>	osteomyelitida, spodylodiscitida, septická artritida	oxacilin, klindamycin
<u>infekce spojené s produkcí toxinů</u>	syndrom toxického šoku, syndrom opařené kůže, enterotoxikóza	oxacilin + klindamycin

S. aureus je častý původce primární bakteriémie nozokomiálního původu. Za rizikové se považuje osídlení cévních katétrů. Sekundární bakteriémie je většinou spojována s defekty a chirurgickými zákroky. Zdroj však nemusí být nalezen, protože se může jednat o velice malou ranku např. tříska (Jindrák et al., 2014).

2.3 Rezistence k antibiotikům

Získaná rezistence k antibiotikům je celosvětovým problémem. Bakterie dříve citlivé k antimikrobiálním látkám se stávají rezistentní, a to především tam, kde se antibiotika nejvíce používají - zejména v nemocnicích.

Rezistencí k antibiotikům stoupá úmrtnost, prodlužuje se pobyt pacientů v nemocnicích a tím zvyšují náklady na zdravotní péči (Bergerová, 2006).

2.3.1 Beta-laktamáza – penicilináza

S. aureus byl původně citlivý k penicilinu, ale po jeho zavedení do léčebné praxe se během několika let u většiny kmenů vyvinula rezistence, založené na tvorbě enzymu beta-laktamázy tzv. penicilinázy. Tento enzym hydrolyzuje betalaktamový kruh penicilinů. Penicilináza je kódována genem *blaZ*, jenž je umístěn na plazmidu často s dalšími geny antimikrobiální rezistence. Penicilináza je blokována inhibitory beta-laktamáz, které jsou součástí potencovaných aminopenicilinů (Ampicilin/sulbactam, amoxicilin/klavulanát). Rezistentní k jejímu účinku jsou syntetické protistafylokokové peniciliny např. oxacilin (Lowy, 2003).

2.3.2 *Modifikace PBP2*

Z klinického hlediska je mnohem významnější rezistence kmenů *S. aureus* k betalaktamovým ATB, jenž je způsobena produkcí modifikovaného proteinu PBP2a, případně PBP2c (Penicilin vázající protein 2a/c). PBP2 je transpeptidáza, která se účastní výstavby buněčné stěny stafylokoka. Penicilin inhibuje její účinek, a tím dochází k rozpadu bakteriální buňky. Modifikované proteiny PBP2a/c jsou stejně enzymaticky aktivní jako PBP2, ale mají nízkou afinitu k beta-laktamovým ATB kromě nové třídy cefalosporinů 5. generace s aktivitou proti MRSA kmenům (Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) např. ceftarolin, ceftobiprol (EUCAST, 2019b; Pinho, 2001). Právě u methicilin rezistentních kmenů *S. aureus* byl v roce 1981 popsán mechanismus této rezistence, kdy byl objeven modifikovaný PBP2a (Hartman a Tomasz, 1981).

Stafylokoková chromozomální kazeta *SCCmec* je unikátní mobilní genetický element pro rod *Staphylococcus*. Tento element podmiňuje existenci methicilin rezistentních stafylokoků (Hanssen et al., 2006). Dosud bylo popsáno osm různých typů *SCCmec* (typ I-VIII) a řada podtypů (Malachowa a DeLeo, 2010). *SCCmec* kazeta nebyla původní součástí chromozomu druhu *S. aureus*. Kazeta byla získána horizontálním přenosem od koaguláza negativních stafylokoků (Lebeaux, 2012). Součástí této kazety je gen *mecA*, kódující modifikovanou bílkovinu PBP2a - penicilin vázající protein 2a (Pinho, 2001).

U některých kmenů MRSA se ale gen *mecA* nedařilo prokázat, což vedlo k objevu jeho homologu *mecALGA251*, který byl později přejmenován na *mecC*. Prevalence *mecC* kmenů je odhadována na 0,54-2,8 % všech MRSA izolátů (Paterson et al., 2014). V České republice bylo od roku 2007 - 2016 izolováno 15 kmenů MRSA nesoucí gen *mecC* (Mališová et al., 2018).

2.3.3 *BORSA*

U stafylokoků je možné sledovat i jiný mechanismus rezistence k methicilinu než u MRSA kmenů. Jedním z nich jsou kmeny označované jako Hraničně oxacilin rezistentní *S. aureus* (z anglického názvu Borderline oxacilin resistant *S. aureus*) neboli BORSA. Vykazují nízkou, hraniční rezistenci vůči oxacilinu a na rozdíl

od MRSA kmenů nemají modifikovaný PBP2a kódovaný *mecA* nebo *mecC* gen. Kmeny BORSA nelze klasifikovat jako methicilin rezistentní nebo methicilin citlivé. Jejich rezistence je typicky spojena s hyperprodukcí beta-laktamáz nebo v některých případech s bodovými mutacemi v PBP genech (Hryniewicz et al., 2017).

2.4 Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

První kmen *S. aureus* rezistentní k methicilinu byl popsán v Anglii již v roce 1961, pouhý rok po začátku používání methicilinu, prvního ze semisyntetických protistafylokových penicilinů (Jevons, 1961). Poté, během 60. let, se rezistence stávala stále větším problémem v některých evropských zemích a později i v USA. První případ rezistence k methicilinu v USA byl zaznamenán v roce 1968 (Moellering, 2011). V současnosti se kmeny MRSA rozšířily celosvětově a často jsou kromě penicilinů a většiny cefalosporinů rezistentní i k řadě dalších skupin ATB. K léčbě závažných MRSA infekcí se tak většinou používá vankomycin. Následkem toho byly koncem 20. století detekovány první kmeny MRSA se sníženou citlivostí k vankomycinu neboli VISA (Hiramatsu, 1997). V roce 2002 v Michiganu izolovali kmen *S. aureus* plně rezistentní k vankomycinu (dále VRSA). Za tento typ rezistence je zodpovědný gen *vanA*, jenž stafylokoky převzaly od enterokoků (De Niederhäusern, 2011).

Globální výskyt MRSA je výsledkem rozsáhlého šíření omezeného počtu kmenů ve vysoce rizikovém prostředí nemocnic (Kluytmans a Struelens, 2009). Existuje několik protichůdných názorů o vzniku prvních MRSA klonů. Předpoklad jedné z teorií je, že všechny MRSA klony pocházejí z jednoho kmene *S. aureus*, jenž získal gen *mecA*. Podle nově dostupných studií, které zkoumaly rozdílnost MRSA klonů, bylo zjištěno, že gen způsobující rezistenci byl několikrát převeden do různých genetických linií *S. aureus* (Deurenberg et al., 2007).

Původně se kmeny MRSA vyskytovaly pouze v nemocničních zařízeních. Z tohoto důvodu se označují jako HA - MRSA (hospital associated MRSA). Po roce 1980 byly izolovány případy MRSA infekce u pacientů bez předchozího kontaktu s nozokomiálním prostředím tzv. komunitní kmeny CA-MRSA (community associated MRSA). Komunitní MRSA kmeny se liší svými charakteristickými rysy od nozokomiálních kmenů, viz Tab. 3. (Matouskova a Janout, 2008).

Tab. 3: Charakteristika kmenů HA-MRSA a CA-MRSA (Matouskova a Janout, 2008; Kluytmans a Struelens, 2009, upraveno)

Charakteristické rysy	HA-MRSA	CA-MRSA
pacient	starší osoby základní onemocnění	mladší osoby zdraví jedinci
rizikový faktor (pacient)	pacienti v nemocnici jiná zdravotnická zařízení	sportovci vojáci homosexuálové vězni
onemocnění	bakteriémie pneumonie infekce chirurgických ran infekce močových cest	infekce měkkých tkání a kůže abscesy, celulitida, impetigo, folikulitida nekrotizující pneumonie
ATB rezistence	multirezistence	rezistence k beta-laktamům
typy SCCmec	I, II, III, VI nebo VIII	IV, V nebo VII
PVL	ne (pouze vzácně)	ano

2.4.1 CA-MRSA

Komunitní MRSA kmeny jsou celosvětovým problémem. Jedná se o generaci MRSA izolátů, jenž způsobují infekce u zcela zdravých osob. Na rozdíl od HA-MRSA kmenů jsou obvykle citlivé k non-betalaktamovým ATB a nesou převážně *SCCmec* typu IV, V a VII. Některé izoláty produkují PVL, který vyvolává lýzu leukocytů a nekrózu epitelových buněk. Typicky tyto kmeny způsobují často se opakující infekce měkkých tkání a kůže včetně furunklů, impetiga, abscesů. V některých případech jsou také spojovány se závažnými infekcemi např. sepsí či nekrotizující pneumonií (Pantosti a Venditti, 2009).

Mezi hlavní kritéria epidemiologické klasifikace CA-MRSA řadíme (Matouskova a Janout, 2008):

- v anamnéze pacienta nejsou známy kolonizace MRSA kmeny
- žádné údaje o hospitalizaci, chirurgickém výkonu, dialýze, umístění do pečovatelského zařízení či hospice v posledních letech

- bez přítomnosti cizorodých materiálů např. katétrů nebo lékařské přístroje zavedené přes kůži pacienta
- MRSA diagnostikována u ambulantních pacientů či do 48 hodin po přijetí do nemocnice

V současné době začíná přibývat MRSA kmenů, které nelze řadit mezi CA-MRSA či HA-MRSA. Komunitní kmeny se dostávají do prostředí nemocnic a naopak. Jedná se tzv. MRSA nozokomiální infekce s počátkem v komunitě (HACO-MRSA)(Daum, 2018).

2.4.2 HA-MRSA

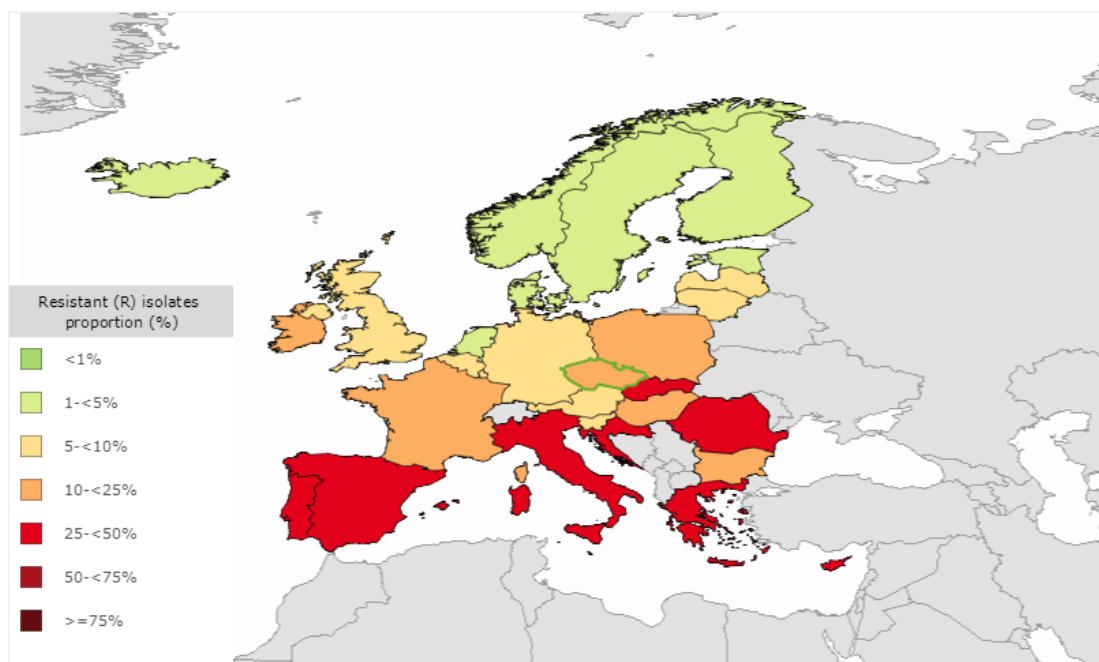
Nozokomiální kmeny MRSA způsobují infekce související s pobytem v nemocnici či jiných zařízeních např. domovech pro seniory. Tento patogen je nejrizikovější pro pacienty zejména na jednotkách intenzivní péče, dialyzačních centrech apod. Mezi rizikové faktory kolonizace HA-MRSA kmeny se řadí: věk pacienta, dlouhodobá hospitalizace, invazivní zákroky, předchozí ATB léčba a přítomnost různých lézí např. popáleniny, dekubity. V nemocnicích je vyšší nebezpečí šíření MRSA kmenů od zdravotníků či od ostatních pacientů. Invazivní infekce HA-MRSA kmeny se častěji objevují u pacientů po operačním zákroku, po zavedení např. katétrů, u dialyzovaných pacientů, po transplantaci orgánů, dále pak u osob s oslabenou imunitou (Kluytmans a Struelens, 2009). Oproti CA-MRSA izolátům jsou nozokomiální kmeny multirezistentní k ATB. Většina těchto kmenů nese kromě *SCCmec* typu I – IV nebo VII, jenž obsahují gen *mecA*, další zdroje rezistence jako jsou plazmidy a traspozony (Malachowa a DeLeo, 2010).

2.4.3 Současná epidemiologická situace v Evropě a České republice

MRSA kmeny se staly vážnou hrozbou pro veřejné zdraví po celém světě. Z tohoto důvodu je globální výskyt sledován různými institucemi. Současný trend výskytu v Evropě sleduje dlouhodobý projekt EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Jedná se o celoevropskou síť, která sjednocuje národní systémy surveillance. Koordinaci těchto systémů zajišťuje ECDC (Evropské centrum pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění (ECDC, 2017). V Evropě je zapojeno

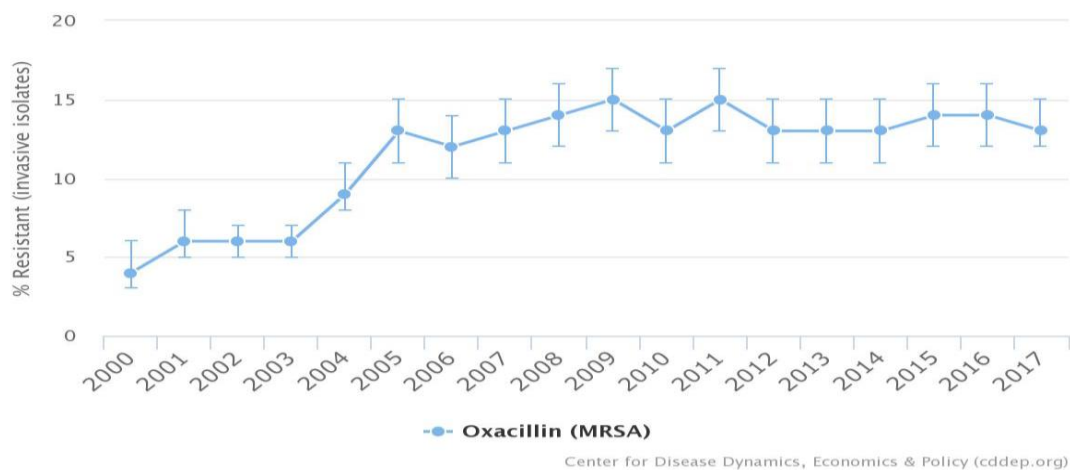
více než 1400 nemocnic z 29 zemí Evropy, včetně České republiky, která se připojila v roce 2000 (Urbášková et al., 2006).

Podle dostupných dat se výskyt MRSA v Evropě postupně snižuje. Nicméně třetina zemí stále hlásí podíl MRSA kmenů invazivních infekcí více než 20%. Snižující tendence v roce 2017 byla zaznamenána ve Velké Británii (6,9%), Německu (9,1%), Portugalsku (39,2%) a Francii (12,9%). Naopak v Chorvatsku (28%) a na Maltě (42,1%) byl zaregistrován mírný nárůst. Data z roku 2017 potvrzují klesající trend nebo alespoň u některých zemí stabilizaci výskytu. Jak je vidět na obr 3., nejnižší počet MRSA infekcí je na severu Evropy, zatímco nejvyšší prevalence je na Maltě a v Rumunsku (ECDC,2017).



Obr. 3: Výskyt MRSA izolátů v Evropě 2017 (EARS-Net, 2017)

Jak je znázorněno na obr 4, v České republice se výskyt MRSA invazivních izolátů od roku 2000 navýšil z původních 4,3% na 14,6% v roce 2009. Od té doby nedošlo k výraznějším změnám do roku 2017 - 13,2% (EARS-Net, 2017).



Obr. 4: Výskyt MRSA invazivních izolátů v ČR (CDDEP, 2017)

2.5 Protiepidemická opatření v nemocničních zařízeních

V nemocničních zařízeních jsou zavedena opatření (dle vyhlášky MZ č. 306/2012 Sb.) sloužící ke sledování MRSA infekcí a k eliminaci šíření infekce mezi pacienty. Zajišťuje je tým pro kontrolu infekcí ve složení jako je epidemiolog (hygienik), klinický mikrobiolog a epidemiologické sestry. Jejich úkolem je především (Bergerová et al., 2006):

- Informovanost a školení zaměstnanců zdravotnického zařízení
- Správné užívání ATB
- Surveillance MRSA
- Preventivní opatření během ošetrovatelské péče (v případě potřeby dekolonizační terapie)

2.5.1 Cílená ATB terapie

Cílené užívání antibiotik hraje významnou roli v prevenci šíření MRSA kmenů. Při nesprávném a nadměrném používání ATB se vytváří ideální prostředí pro MRSA kmeny, jenž mají selekční výhodu nad citlivými kmeny *S. aureus*. Nižší výskyt MRSA lze pozorovat v některých zemích, kde je omezené používání ATB (Köck et al., 2010). Mezi nejvýznamnější selektory MRSA kmenů se považují všechny generace cefalosporinů, makrolidy a fluorochinolony (Bergerová et al., 2006). Je tedy nutné zamezit jejich nadužívání. Mezi nejdůležitější faktory pro snížení šíření ATB rezistence lze zařadit správné dávkování ATB po nezbytně dlouhou dobu a pravidelné sledování

vývoje rezistence a spotřeby ATB v daném zdravotnickém zařízení (Bergerová et al., 2006).

2.5.2 *Surveillance MRSA*

Základním principem, jak zamezit šíření MRSA kmenů, je aktivní surveillance neboli screening. Jedná se o aktivní vyhledávání nosičů MRSA, jak mezi pacienty, tak i exponovaným zdravotnickým personálem. Zdrojem MRSA infekce je nejčastěji pacient či nosič MRSA bez klinickým příznaků (Kluytmans a Struelens, 2009). Důležité je poté zahájit preventivní opatření jako je izolace pacienta a dekontaminační terapie, jenž slouží ke snížení rizika přenosu MRSA izolátů na jiné pacienty a zároveň zabrání vzniku sekundárního onemocnění u samotných nosičů. Nosičství je nejčastěji prokázáno na nosní sliznici a na kůži např. z perinea. U nosičů, kteří byli kolonizováni během pobytu ve zdravotnickém zařízení, lze nalézt kmeny i v chronických ranách a defektech (Marshall et al., 2004).

Ve zdravotnických zařízeních nelze provádět celoplošné sledování. Z tohoto důvodu se ve většině nemocnic zavedl selektivní screening konkrétních skupin pacientů podle tabulky 4. Povinné testování je zavedeno u první skupiny, kde je stupeň rizika nejvyšší (Bergerová et al., 2006), dále u osob se známou kolonizací MRSA kmeny v minulosti, a jedinců, kteří mohli být v kontaktu s nosiči MRSA např. přichází z jiného zdravotnického zařízení (Matouskova a Janout, 2008).

Tab. 4: Míra rizika na jednotlivých odděleních (Bergerová et al., 2006)

riziková skupina	stupeň rizika	oddělení
1	vysoké	oddělení intenzivní péče (vč. ARO), oddělení popálenin a transplantací, kardiochirurgie, neurochirurgie, traumatologie, hemodialýza
2	střední	všeobecná chirurgie, dermatologie, ORL, urologie, neonatologie, gynekologie a porodnictví
3	nízké	interní a dětská lůžková oddělení, neurologie
4	specifické	Oddělení následné péče a pečovatelské domy

Klíčový je výběr správného vyšetřovaného materiálu pro screening. Nejvyšší výtěžnost je dle dostupných studií při vyšetření stěrů z nosu, krku a perinea, kdy lze zachytit až 98,3% nosičů (Kluytmans a Struelens, 2009).

2.5.3 Opatření při výskytu MRSA

Při výskytu MRSA na oddělení je nutné podniknout několik kroků. Každý nový případ je potřeba hlásit nemocničnickému epidemiologovi. Kolonizované pacienty je nutno izolovat a musí být dodržován bariérový režim, aby se předešlo šíření MRSA mezi ostatními pacienty (Bergerová et al., 2006).

Základní principy ošetrovatelské péče jsou (Coia et al., 2006):

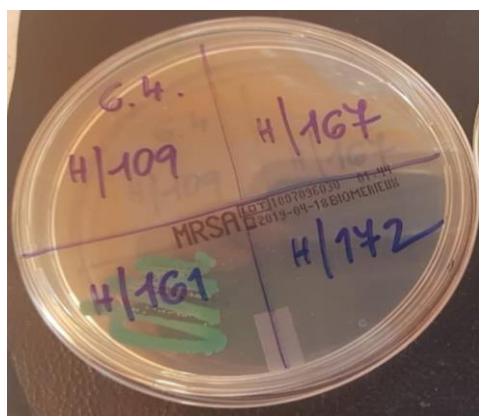
- izolace pacienta nejlépe v samostatném pokoji s vlastním sociálním zařízením
- desinfekce rukou před a po kontaktu s pacientem a při odchodu z izolačního pokoje
- používání jednorázových pomůcek jako jsou rukavice, pláště, roušky – vše je umístěno u izolačního pokoje pacienta
- pacient má vyhrazeny vlastní nástroje a pomůcky např. přístroje
- vhodný úklid během hospitalizace – jasné označení a třídění infekčního odpadu a lůžkovin
- po propuštění pacienta je nutné dezinfikovat celý pokoj a nástroje (kontrola mikrobiologickými stěry z prostředí)

2.6 Možnosti identifikace MRSA

Pro detekci MRSA kmenů v rutinních klinických laboratořích je kladen vysoký důraz na jednoduché, rychlé, přesné a citlivé metody. V současné době je dostupné velké množství metod pro identifikaci MRSA izolátů. Standardně se využívá disková difúzní metoda, která je spolehlivá ale časově náročná. Nedílnou součástí laboratorní diagnostiky je využívání selektivně diagnostických půd (EUCAST, 2017). Další možností pro rychlou detekci MRSA kmenů jsou latexové aglutinační metody a imunochromatografické testy. V posledních letech se standardem stala PCR diagnostika, která detekuje gen *meA*. (Datta et al., 2011). Současným trendem je ve většině laboratořích využití kombinace několika výše zmíněných metod.

2.6.1 *Selektivně diagnostické půdy*

V současné laboratorní praxi je využíváno několik komerčně dodávaných selektivně diagnostickým půd pro detekci MRSA kmenů. Půda obsahuje směs několika ATB vč. cefoxitinu/oxacilinu. Tato směs ATB umožní růst methicilin rezistentních stafylokoků vč. heterorezistentních kmenů a inhibuje běžnou mikrobiotu (Malhotra-Kumar a kol., 2008). Přímá identifikace MRSA kmenů je zajištěna přidavkem chromogenního substrátu, jenž je štěpen glukosidázou produkovanou kmeny *S. aureus* za vzniku barevného komplexu. Vnikají zeleně zbarvené kolonie, které znázorňuje obr 5. (Perry a Freydière, 2007).



Obr. 5: Kolonie MRSA kmene na ChromID MRSA médiu. (zdroj: vlastní)

Z dostupných studií je zřejmé, že média s obsahem cefoxitnu, např. ChromID MRSA (bioMérieux) jsou lepší pro detekci MRSA kmenů než půdy obsahující oxacilin.

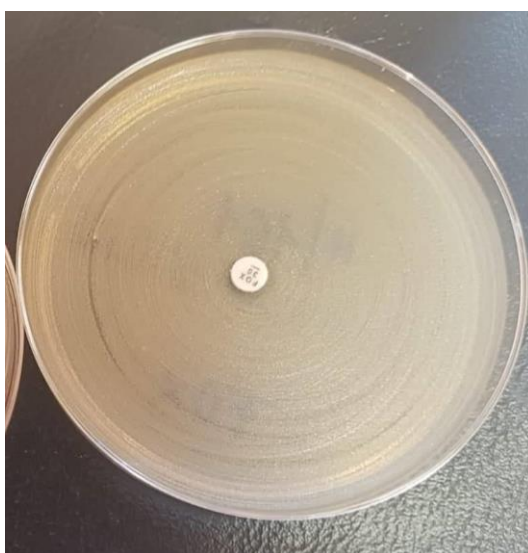
Selektivní diagnostické půdy se staly nedílnou součástí běžné laboratorní diagnostiky. Využívají se hlavně jako screening pacientů, kteří by mohli být ohroženi MRSA kmeny. Vždy je ale nutné vzorky kultivovat i na neselektivní půdě, protože některé MRSA kmeny mohou vykazovat velmi nízkou rezistenci k oxacilinu, tudíž by se mohl na selektivní půdě projevit jako citlivý kmen (Bergerová, 2006).

2.6.2 *Disk s cefoxitinem*

Disková difúzní metoda je jedna z nejvíce využívaných metod k vyšetření citlivosti k antibiotikům v mikrobiologických laboratořích. Využívají se papírové disky napuštěné určitým množstvím antibiotik. Tyto disky jsou poté kladeny na kultivační

půdy, kde po kultivaci vzniká inhibiční zóna, jejíž průměr udává citlivost či rezistenci k danému ATB (Votava, 2010).

EUCAST doporučuje k určení citlivosti ATB methicilinu/oxacilinu u izolátů *S. aureus* disk s obsahem cefoxitinu, který na rozdíl od disku s obsahem oxacilinu výborně koreluje s přítomností genu *mecA* (EUCAST, 2017; Urbášková et al., 2004). Je to velmi spolehlivá metoda určení MRSA kmenů. Tyto kmeny tvoří inhibiční zónu <20mm kolem disku obsahující 30µg cefoxitinu viz obrázek 6. (EUCAST, 2019; Van Landuyt et al., 2004).



Obr. 6: Disková difúzní metoda – disk s cefoxitinem (zdroj: vlastní)

2.6.3 Detekce proteinu PBP2a

Pro detekci MRSA izolátů jsou komerčně dostupné rychlé latex-aglutinační nebo imunochromatografické testy detekující protein PBP2a (antigen) na základě jeho vazby se specifickou monoklonální protilátkou (Pazderková et al., 2012).

V případě latex-aglutinačních testů je protilátka navázána na povrchu latexových částic. Pozitivním výsledkem je viditelná aglutinace. Tyto metody jsou rychlé, jednoduché a dostupné od mnoha komerčních dodavatelů. Výsledek je obvykle známý do 15-20 min. Tyto testy nelze použít u vzorků kultivovaných na půdách obohacených o NaCl (Brown et al., 2005).

Dále je na trhu rychlý imunochromatografický test. PBP2a SA Culture Colony Test (Alere) využívá jako protilátky vysoce citlivé rekombinantní monoklonální fragmenty protilátek (rFabs) schopné vázat protein PBP2a přímo z bakteriální kultury. Testovací strip obsahuje specifickou protilátku imobilizovanou na nitrocelulóзовé membráně. Jakmile vzorek vzlíná po stripu, dochází v případě přítomnosti PBP2a proteinu nejprve k jeho reakci s růžovým konjugátem. Poté je tento komplex zachycen specifickou protilátkou v testovací oblasti, která se projeví přítomností růžové linie (Trienski et al., 2013).

2.6.4 Detekce *mecA/mecC* genu

Za standardní identifikační metodu MRSA kmenů je považován PCR průkaz *mecA* popř. *mecC* genu. Původně byly využívány in-house metody amplifikující *mecA* gen z DNA izolované z čisté kultury *S. aureus*. Dnes jsou k dispozici komerční kity pro různé rt-PCR platformy, které umožňují detekci přímo z klinického materiálu (Rossney et al., 2007). Set IDI-MRSA (Infectio Diagnostic) je vysoce spolehlivý a specifický test pro přímou identifikaci MRSA kmenů z nazálních stěrů bez potřeby předchozí kultivace. Tento test je založený na amplifikaci úseku DNA zahrnujícího část *SCCmec* a přiléhající oblast *orfX* genu, kde se tento mobilní element do chromozomu *S. aureus* integruje. Podobným způsobem detekuje jeden amplikom (*SCCmec-orfX*) set GeneXpert MRSA assay (Cepheid). Vzhledem k finanční a časové náročnosti metody se v rutinních laboratořích běžně nevyužívá (Malhotra-Kumar a kol., 2008).

3. Cíle práce a hypotézy

Cíle:

1. Osvojit si mikrobiologické techniky při zpracování klinického materiálu.
2. Statisticky zpracovat data o výskytu MRSA u pacientů v prostředí Nemocnice Strakonice, a.s. od roku 2012 do 2018.
3. Zavedení PBP2a SA Culture Colony testu (Alere) do rutinního vyšetřování v bakteriologické laboratoři Nemocnice Strakonice, a.s.
4. Zhodnocení nozokomiálního prostředí jakožto možného zdroje MRSA kmenů pro pacienty Nemocnice Strakonice, a.s.

Hypotézy:

H1: Předpokládáme, že použitím PBP2a SA Culture Colony testu (Alere) zrychlíme diagnostiku MRSA z klinicky závažných materiálů, což jsou především infekce krevního řečiště.

H2: Předpokládáme, že díky zrychlení identifikace kmene MRSA dochází k rychlejšímu nasazení adekvátní terapie.

4. Metodika

V první části své bakalářské práce jsem se zaměřila na kultivaci a identifikaci MRSA kmenů z vybraných klinicky závažných materiálů tj. hemokultury, tracheální aspiráty a tekuté materiály (punktáty, žluče, atd.), v období od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2018. Laboratorní diagnostika kmenů *S. aureus* byla prováděna v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s., ÚKMAS. Veškerý materiál byl odebrán podle Laboratorní příručky a zpracován podle příslušných Standardních operačních postupů (dále SOP) pro tuto laboratoř.

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Zpracování materiálu

Vybraný biologický materiál byl zpracován dle následující tabulky:

Tab. 5: Zpracování vybraného druhu materiálu.

druh materiálu	odběrová souprava	zpracování
krev – hemokultivace	aerobní/ anaerobní lahvička (BACT/ALERT® 3D)	V případě positivity:
		<u>aerobní</u> – COLSB, URI, 2x preparát
		<u>anaerobní</u> - COLSB, URI, SCH, 2x preparát
tracheální aspirát	zkumavka	COLSB, URI, SCH, HAEM, CAN2, pomnožovací půda, preparát
tekuté materiály	zkumavka, injekční stříkačka	anaerobní lahvička (BACT/ALERT® FN Plus), COLSB, SCH, URI, CNA, HAEM, preparát, (v případě žluče DCA, selenit)

Zkratky půd: COLSB (Oxoid) – krevní agar (5% beraní krve), URI (BioRad) – chromogenní půda (selektce gramnegativních tyčků), SCH agar (Oxoid) – Schadlerův agar (anaerobní kultivace), CNA (bioMérieux) – krevní agar obohacený kys. nalidixovou, CAN2 (bioMérieux) – chromogenní půda pro kvasinky, HAEM (bioMérieux) – čokoládový agar

4.1.2 *Kultivace*

Vzorky byly kultivovány aerobně i anaerobně. Aerobní kultivace probíhala v termostatu Biological Thermostat BT120 (CHIRANA) při 37°C v běžné atmosféře nebo za zvýšené tenze CO₂ (Thermo SCIENTIFIC). Anaerobní kultivace (SCH agar) probíhá v anaerobním boxu (Bug box, Trigon plus) ve směsi plynů (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) také při 37°C.

Krev byla kultivována v komerčně dodávaných lahvičkách (BACT/ALERT® FA Plus, BACT/ALERT® FN Plus) v automatickém analyzátoru BACT/ALERT® 3D od firmy bioMérieux. Jedná se o automatický systém, jehož principem je detekce oxidu uhličitého (produkovaného bakteriemi) pomocí kolorimetrie. CO₂ volně prochází polopropustnou membránou a reaguje tak s vodou. Tím dochází ke snížení pH a senzor zaznamená změnu barvy indikátoru ze zelené na žlutou (Čermák, 2008). Kultivace probíhá 5 dní do konečné negativity. V případě pozitivního výsledku analyzátor zahlásí pozitivitu lahvičky zvukovým signálem.

4.1.3 *Identifikace*

Po 18-24 respektive 48 hodinách byly kultury narostlé na kultivačních půdách hodnoceny VŠ pracovníkem. Jako suspektní *S. aureus* byly označeny kolonie typického vzhledu produkující krémový až zlatožlutý pigment na COLSB, CNA a URI, často se zónou beta hemolýzy na COLSB a CNA. Takovéto kolonie byly dále identifikovány pomocí průkazu vázané plazma koagulázy a metodou MALDI-TOF. U pozitivních hemokultur byla identifikace provedena po 3 hodinách metodou MALDI-TOF.

4.1.3.1 Vázaná koaguláza

K předběžné identifikaci byl použit set Staph Plus Latex Kit (PRO-LAB Diagnostics). Testovací činidlo v tomto setu využívá modrých polystyrenových latexových částic (senzibilizovány fibrinogenem a IgG), Pokud jsou stafylokokové kolonie obsahující clumping faktor či protein A, smíchané s testovacím činidlem dochází k aglutinaci během 20-30 sekund.

Postup

- Na první políčko kartičky kápneme kapku činidla Staph Test Latex Reagent na druhé políčko negativní kontrolu.
- Pomocí bakteriologické kličky naneseeme několik kolonií na první políčko a krouživým pohybem smícháme s reagensí. To samé provedeme i u druhého políčka.

V případě positivity dochází k aglutinaci, která je znázorněna na obr. 6 vlevo.



Obr. 6: Průkaz vázané koagulázy u *S. aureus* (zdroj: vlastní)

4.1.3.2 MALDI-TOF

Identifikace byla potvrzena na přístroji Microflex LT od firmy Bruker Daltonics. Tento přístroj pracuje na principu hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight), jenž využívá měkkou ionizaci. Pomocí pulzního hmotnostního analyzátoru doby letu je tato metoda schopna porovnat unikátní profil bílkovin zkoumané bakterie s referenční databází kontrolních kmenů (Lay, 2000).

Postup:

- Izolovanou kolonii nanese pomocí bambusového párátko na terčík kovové destičky.
- Terčíky zakapeme matricí a necháme zkrystalizovat volně na vzduchu.
- Vložíme do přístroje, který změří hmotnostní spektrum daného kmene.
- Na základě hmotnostního spektra je vzorek pomocí programu MALDI-Biotyper identifikován. Spolehlivost identifikace vyjadřuje skóre (max. číslo 3), které odpovídá míře shody s referenční databází kontrolních kmenů.
- Výstupem z MALDI-TOF je protokol.
- Hodnotí VŠ pracovník.

4.1.3.3 PBP2a SA Culture Colony Test (Alere)

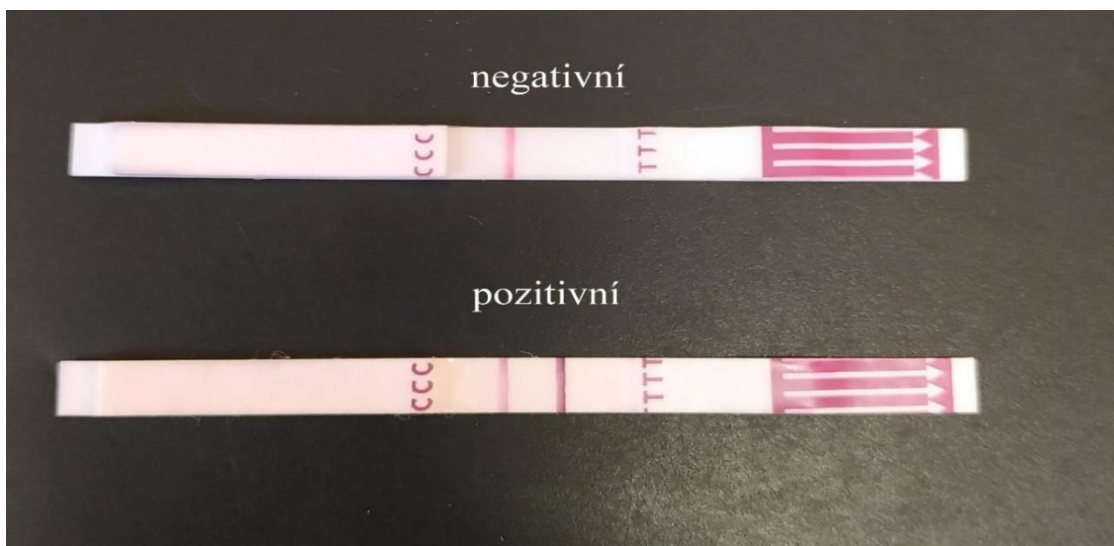
Postup:

- Do zkumavky přidáme dvě kapky činidla 1.
- Pomocí bakteriologické kličky přeneseme několik dobře narostlých kolonií z krevního agaru do zkumavky s činidlem a zamícháme.
- Dále do zkumavky přidáme dvě kapky modrého činidla 2, promícháme.
- Suspenze ve zkumavce by měla být bezbarvá (pokud se barva nemění, přidáme kapku činidla 2).
- Do zkumavky vložíme testovací proužek.
- Po pěti minutách odečteme výsledek testu.

Výsledek (viz obr. 7):

- U pozitivního vzorku je vždy viditelná kontrolní (růžová/fialová) linie spolu s linií kontrolní.
- U negativního vzorku je vždy viditelná pouze kontrolní (růžová/fialová) linie.
- V případě viditelné pouze testovací linie (bez kontrolního proužku) je výsledek neplatný.

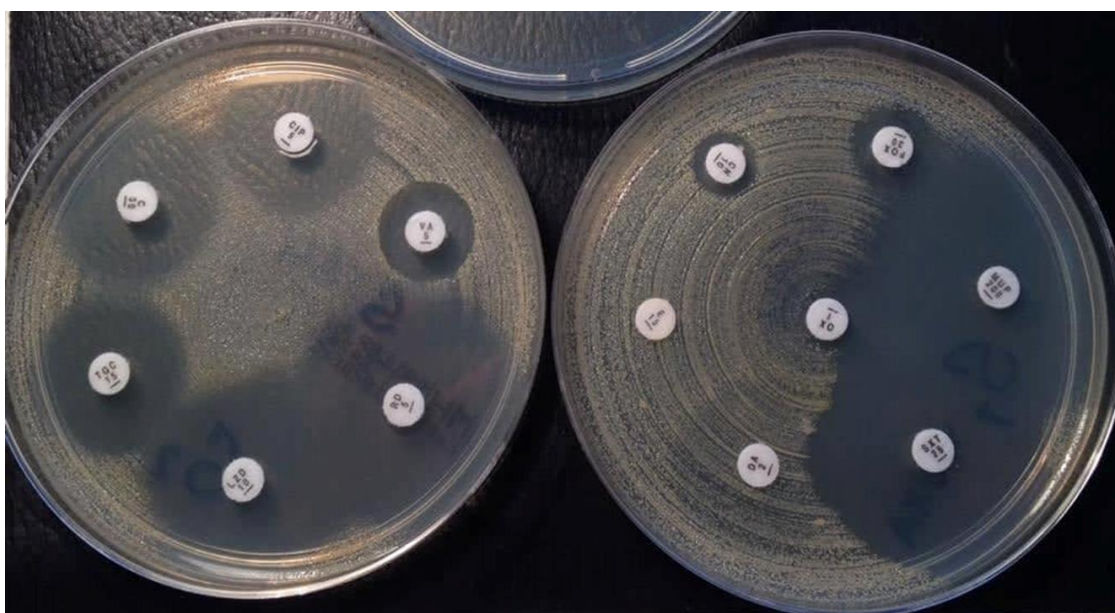
Výrobce je doporučeno provádět u každé šarže pozitivní a negativní kontrolu kmene z České sbírky mikroorganismů (BRNO). Pozitivní kontrola methicilin rezistentním kmenem *S. aureus* ATC # 43300, negativní kontrola citlivým kmenem ATC # 25923.



Obr. 7: Pozitivní a negativní kontrola PBP2a SA Culture Colony Test (zdroj: vlastní)

4.1.4 Stanovení citlivosti

Ke každému identifikovanému izolátu *S. aureus* byla stanovena citlivost k ATB diskovou difúzní metodou, viz obr. 8.



Obr. 8: Disková difúzní metoda. (zdroj: vlastní)

Doporučený postup dle EUCAST:

- Čisté narostlé kolonie pomocí bakteriologické kličky přeneseme do zkumavky se 3-4 ml fyziologickým roztokem a promícháme (připravíme tak zákal

0,5 McF, který měříme na DENSI-LA-METRU II). Tuto suspenzi musíme přenést na MH agar do 15 min.

- Na očkovacím rotačním stolku (Schuett petriturn) sterilním vatovým tampónem rozetřeme suspenzi na MH agar (Mueller-Hintonův agar), po natření necháme agar zaschnout. Mezitím natřeme suspenzi na jednu čtvrtinu plotny ChromID MRSA (bioMérieux), která slouží jako screening MRSA izolátů.
- Do 15 min pomocí dispenzoru ATB disků či sterilní jehlou klademe antibiotika na MH agar.
- Do 15 min vložíme do termostatu a kultivujeme 18-24 hodin při 37°C.
- Citlivost odečítá VŠ pracovník pomocí posuvného měřítka, čímž určí, zda se jedná o citlivý či rezistentní kmen k danému antibiotiku dle EUCAST.
- Hodnoty inhibiční zóny se zapisují do LIS, kde jsou již přednastaveny aktualizované hodnoty breakpointů dle nejnovější verze EUCAST ver. 9 (EUCAST, 2019b).

Jako MRSA je označen kmen rezistentní k cefoxitinu s typickým modrým nárůstem na MRSA plotně.

4.1.5 Výběr a zpracování dat

Dále jsem se zabývala statistickým zpracováním dat výskytu MRSA izolátů v nozokomiálním prostředí nemocnice Strakonice v letech 2012 - 2018. Z laboratorního informačního systému VaxNT Janiga Labs jsem vytvořila tabulky a grafy v programu Excel.

Analýza zahrnuje všechny MRSA kmeny, které byly izolovány z biologického (tj. klinický materiál a vzorky pro screening) či cizorodého materiálu od pacientů hospitalizovaných v nemocnici Strakonice v letech 2012 - 2018. V tomto období byly zahrnuty od každého nového případu (osoby bez předchozího nálezu MRSA) pouze první izoláty.

Do analýzy invazivních kmenů byly zahrnuty všechny izoláty z hemokultur ve sledovaném období. Duplicitní vzorky byly odstraněny.

Rozdělení MRSA izolátů dle materiálu bylo do grafu řazeno tímto způsobem, viz Tab. 6.

Tab. 6: Rozřazení druhu materiálu do skupin.

skupina materiálu	druh materiálu
rány a defekty	výtěr -defekt
	výtěr - dekubit
	výtěr - furunkl
	výtěr - píštěl
	výtěr-chirurgická rána
	výtěr traumatická rána
	výtěr - bércový vřed
	výtěr absces
tekuté materiály	žluč
	hnis - absces
	hnis
cizorodý materiál	centrální venózní katétr
	periferní venózní katétr
DCD	sputum
	bronchoalveolární laváž
	tracheální aspirát
HCD	výtěr - krk (+screening)
	výtěr - nos (+screening)
	výtěr - dutina ústní
hemokultivace	krev
urogenitální trakt	moč (cévkovaná, močená, permanentní katétr)
kůže	stěr - kůže (+screening)
ostatní	výtěr - oko (spojivkový vak, vřed rohovky)
	výtěr - rectum
	výtěr - stření ucho, zvukovod

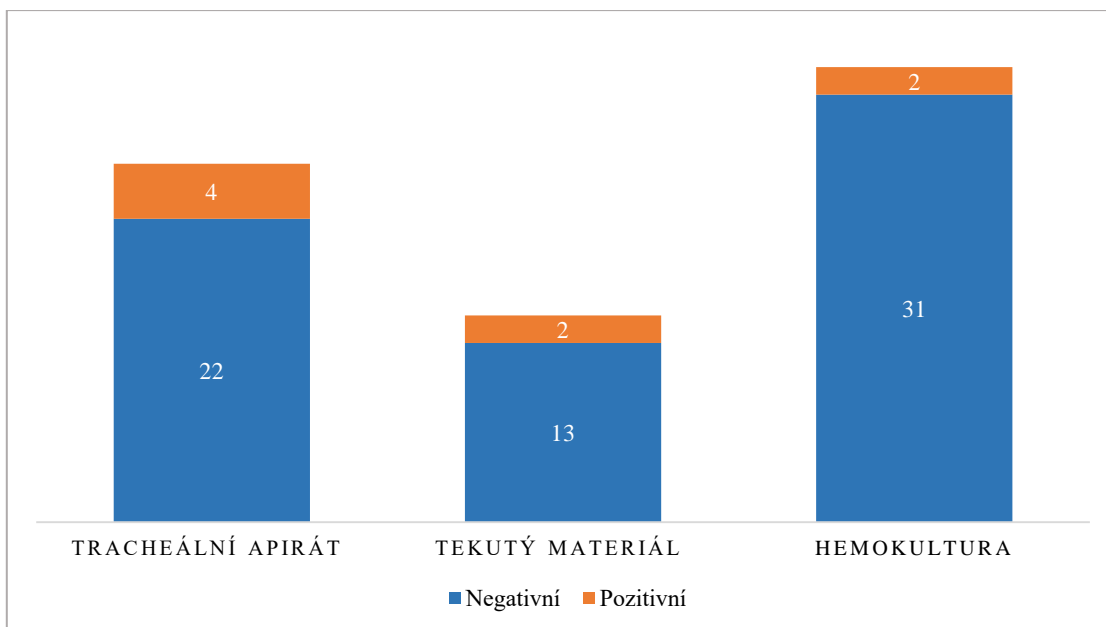
5. Výsledky

5.1 Detekce PBP2a proteinu ve vybraných vzorcích v roce 2018

V roce 2018 bylo z tekutých materiálů (převážně punktáty a hnis), tracheálních aspirátů a hemokultur zachyceno 74 kmenů *S. aureus* (viz Příloha 1). U všech z nich jsem testovala přítomnost PBP2a proteinu testem PBP2a SA Colony Tube Test (Alere). Pozitivních kmenů bylo celkem 8, negativních 66. V tab. 7 a grafu 1 jsou rozděleny vzorky dle materiálu.

Tab. 7: Celkový přehled testovaného materiálu.

PBP2a SA Colony Tube Test			
materiál	negativní	pozitivní	celkem
tracheální aspirát	22	4	26
tekutý materiál	13	2	15
hemokultura	31	2	33
celkem	66	8	74



Graf 1: Detekce bílkoviny PBP2a ve všech testovaných skupinách.

U všech kmenů byla zároveň stanovena citlivost k cefoxitinu diskovou difuzní metodou a byl sledován nárůst na MRSA plotně. Všechny kmeny identifikované jako MRSA diskovou difuzní metodou byly pozitivní i v rychlém imunochromatografickém testu,

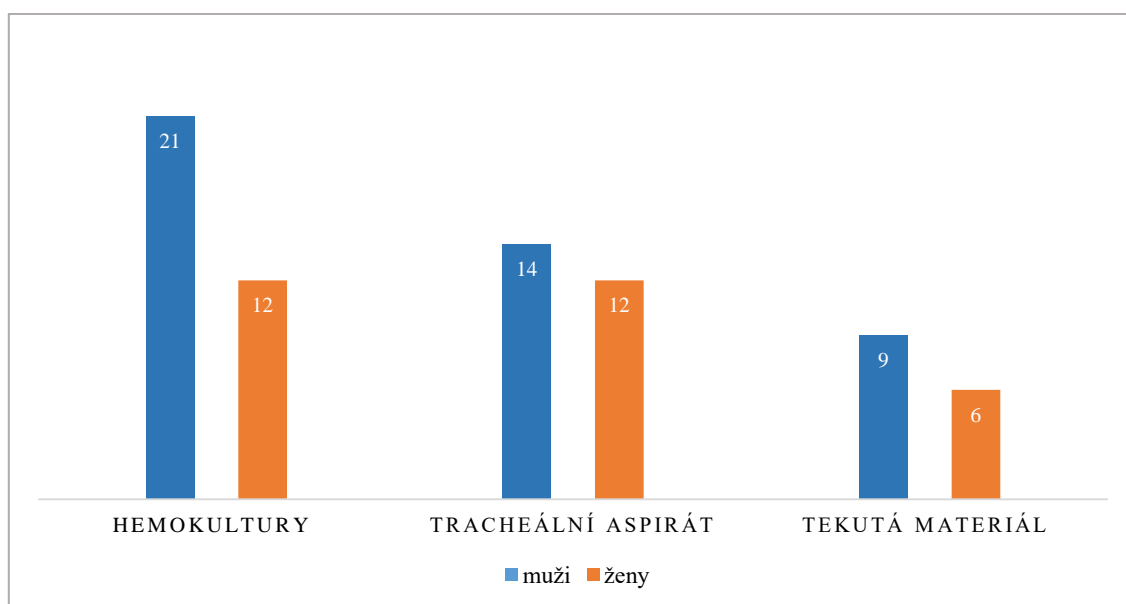
stejně jako všechny kmeny citlivé k cefoxitinu byly negativní v PBP2a SA Colony Tube Testu. Senzitivita a specificita tohoto testu je tedy 100% (viz Tab. 8)

Tab. 8: Senzitivita a specificita.

		Detekce PBP2a	
		N	P
disk CXT	C	66	0
	R	0	8

Celkový počet vzorků 74 byl získán od 65 pacientů, přičemž u 7 pacientů šlo o dva vzorky (tracheální aspirát, hemokultura) u jednoho pacienta byly zastoupeny vzorky ve všech zmíněných skupinách.

V celkovém zastoupení jednotlivých pohlaví i v závislosti na zkoumaném materiálu jak je znázorněno v grafu 2 a tabulce 9, převládali muži nad ženami. Celkový počet mužů byl 44 a žen 30.



Graf 2: Zastoupení mužů a žen pro jednotlivé typy materiálu

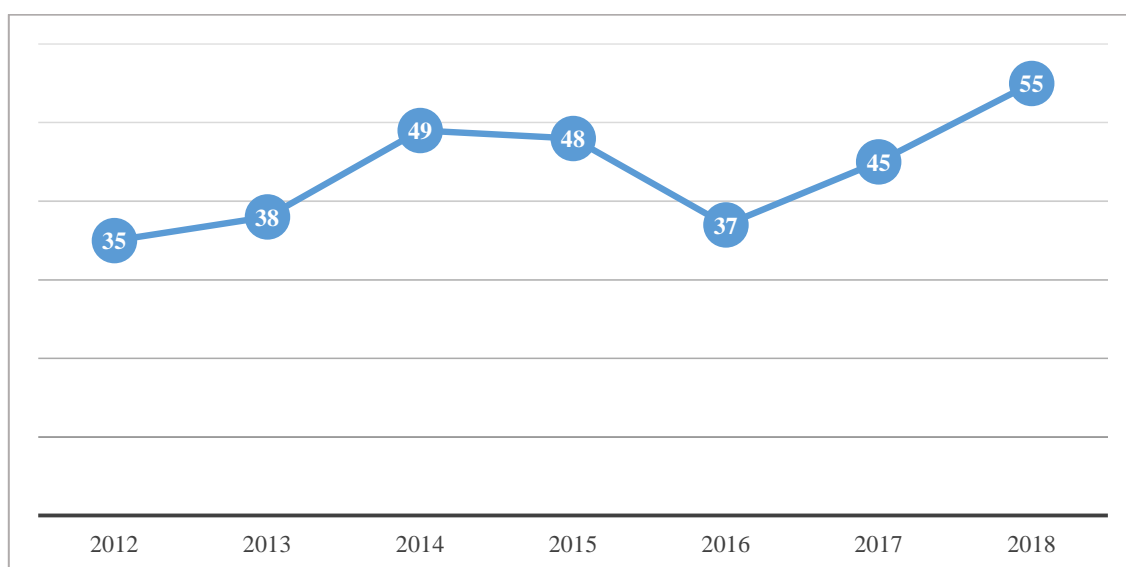
Tab. 9: Přehled mužů a žen v testovaných vzorcích

	muži	ženy	celkem
hemokultura			
počet	21	12	33
procenta	64%	36%	
z toho MRSA (počet)	0	2	2
z toho MRSA (procento)	0%	6%	6%
tracheální aspirát			
počet	14	12	26
procenta	54%	46%	
z toho MRSA (počet)	2	2	4
z toho MRSA (procento)	8%	8%	16%
tekutý materiál			
počet	9	6	15
procenta	60%	40%	
z toho MRSA (počet)	2	0	2
z toho MRSA (procento)	13%	0%	13%

PBP2a protein byl detekován v případě hemokultur u 6% vzorků (MRSA potvrzena u dvou žen). U tracheálních aspirátů bylo procento vyšší (16%) a u tekutého materiálu 13%.

5.2 Nové případy MRSA v nemocnici Strakonice 2012-2018

Podle zpracovaných dat 2012-2018 bylo hospitalizováno v Nemocnici Strakonice, a.s. 94 022 pacientů. Roční počet hospitalizací se výrazně neměnil, nejnižší byl v roce 2018 (13092), nejvyšší v roce 2015 (13782). Počet nových případů MRSA byl za toto období také poměrně konstantní (viz graf 3), celkovou incidenci MRSA jsem vypočítala na 3,27/1000 pacientů. Vzestupný trend bylo možné pozorovat až v posledním roce, kdy byla zjištěna nejvyšší incidence MRSA za celé sledované období (4,2/1000 pacientů) jak je znázorněno v tabulce 10.



Graf 3: Celkový počet nových případů MRSA 2012-2018

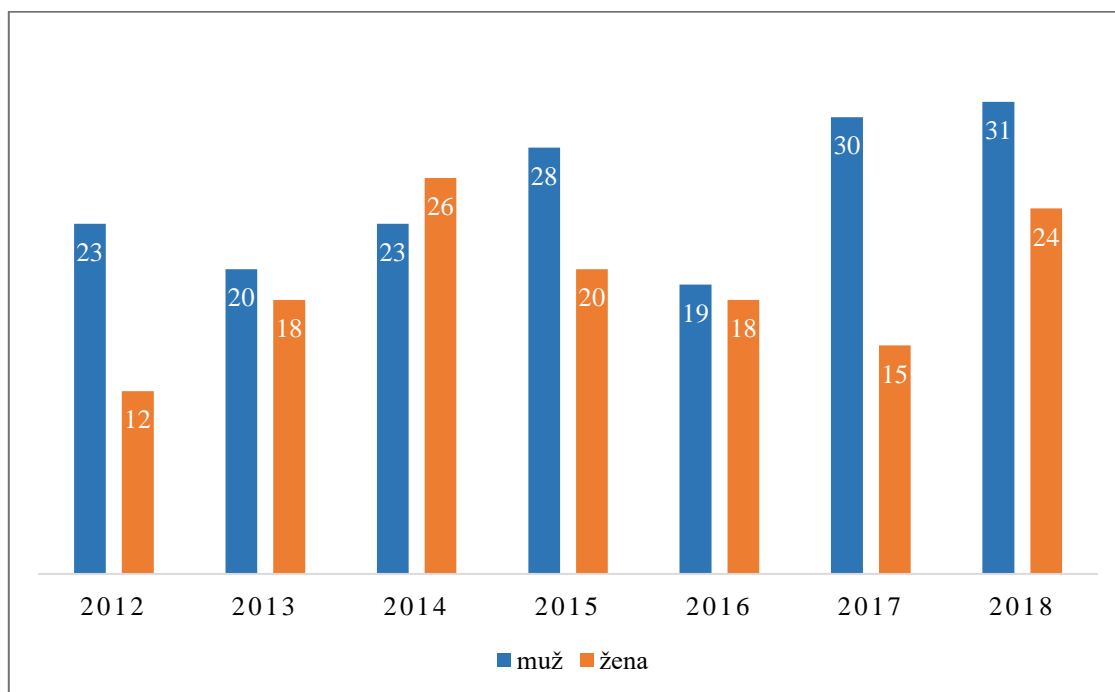
Tab. 10: Incidence případů MRSA 2012-2018

	2012	2013	2014	2015
Celkový počet hospitalizovaných pacientů	13481	13259	13529	13782
Počet nových případů MRSA	35	38	49	48
Počet nových případů MRSA/1000 HP*	2,59	2,86	3,62	3,48
	2016	2017	2018	celkem
Celkový počet hospitalizovaných pacientů	13403	13476	13092	94022
Počet nových případů MRSA	37	45	55	307
Počet nových případů MRSA/1000 HP*	2,76	3,34	4,20	3,27

(1000 HP* - 1000 hospitalizovaných pacientů)

5.2.1 Rozdělení dle věku a pohlaví

Mezi pacienty s MRSA byla v jednotlivých letech jasná převaha mužů. Nejvyšší byla v roce 2017, kdy byl poměr mezi muži a ženami 2:1. Pouze v roce 2014 byla zaznamenána mírná převaha žen. Početní zastoupení obou pohlaví je znázorněno v grafu 4.



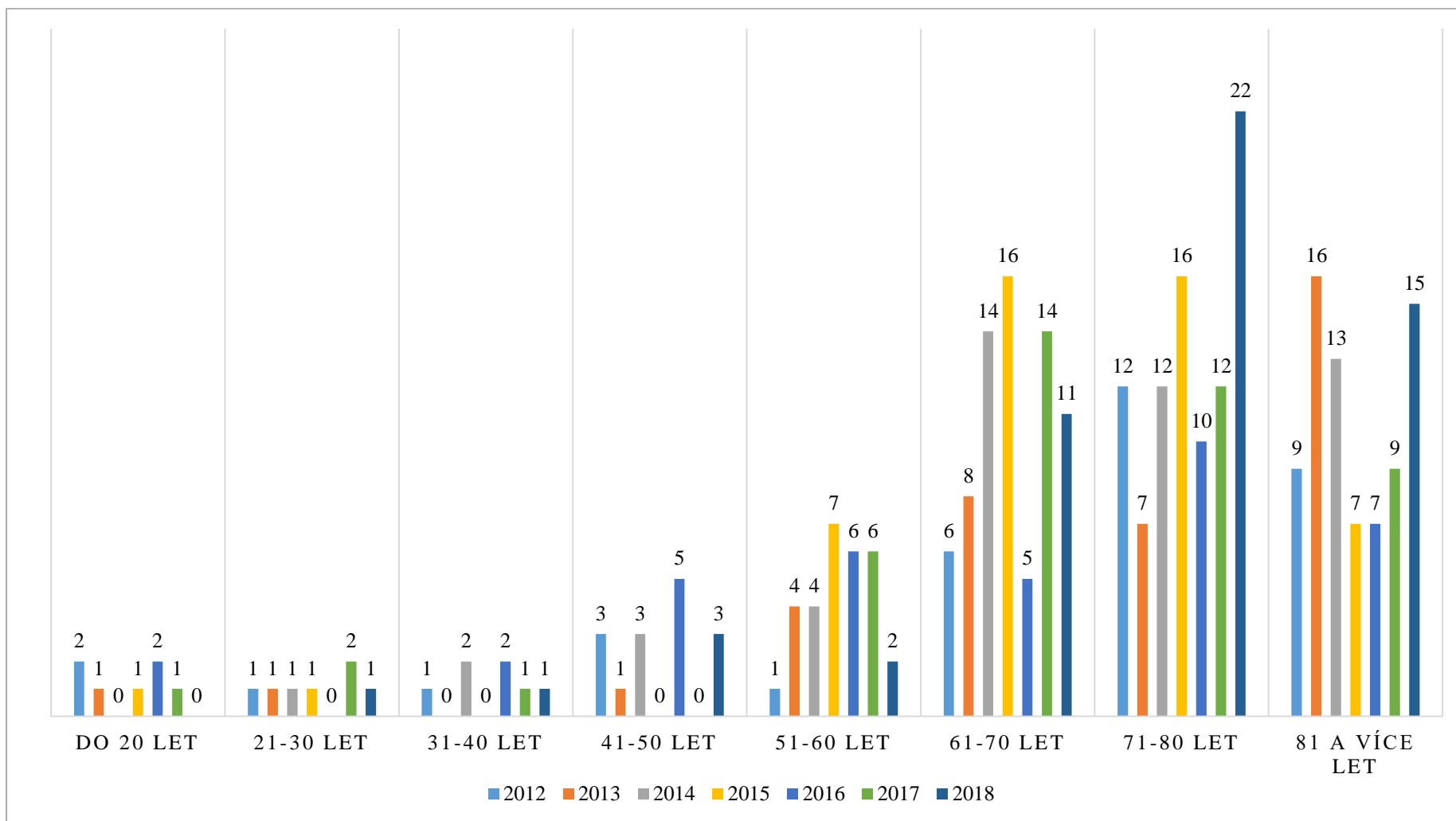
Graf 4: Celkový přehled zastoupení mužů a žen 2012-2018 (první záchyt)

Incidence MRSA narůstala s věkem, skokový nárůst je možné pozorovat mezi skupinami 41-50, 51-60 a 61-70 let. Celkové početní zastoupení v jednotlivých věkových skupinách je zobrazeno v tabulce 11. Nejpočetnější je skupina 71-80 let (91 osob), dále pak skupina 61-70 let (76 osob).

Tab. 11: Celkový počet osob v jednotlivých věkových skupinách 2012-2018.

věk	do 20 let	21-30 let	31-40 let	41-50 let	51-60 let	61-70 let	71-80 let	81 a více
počet	7	7	7	15	30	74	91	76

Ve všech sledovaných letech byla převaha pacientů starších 60-ti let, viz graf 6.



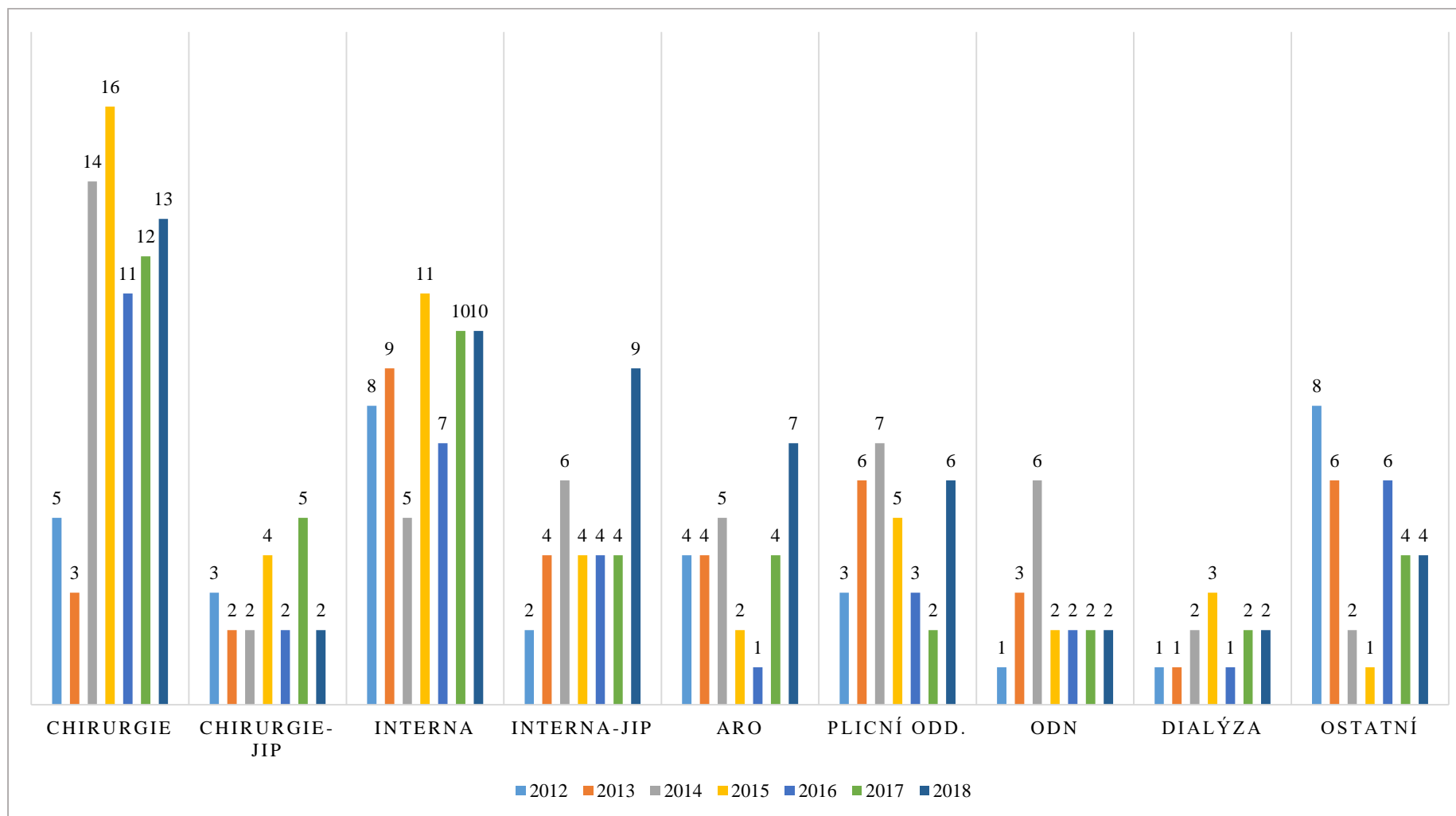
Graf 5. Rozdělení pacientů do věkových skupin (první záchyt)

5.2.2 Rozdělení dle oddělení

Podle tabulky 12 a grafu 6 byl nejvyšší výskyt nových případů MRSA na lůžkovém oddělení chirurgie a interním oddělení. Co se týká jednotek intenzivní péče, tak nejvyšší počet je na INT-JIP, kde bylo zaznamenáno celkem 33 nových případů.

Tab. 12: Počet prvních záchytů MRSA dle oddělení.

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	celkem
CHIRURGIE	5	3	14	16	11	12	13	74
CHIR-JIP	3	2	2	4	2	5	2	20
INTERNA	8	9	5	11	7	10	10	60
INT-JIP	2	4	6	4	4	4	9	33
ARO	4	4	5	2	1	4	7	27
PLICNÍ odd.	3	6	7	5	3	2	6	32
ODN	1	3	6	2	2	2	2	18
DIALÝZA	1	1	2	3	1	2	2	12
OSTATNÍ	8	6	2	1	6	4	4	31



Graf 6: Rozdělení prvního záchytu MRSA dle oddělení.

5.2.3 Rozdělení dle materiálu

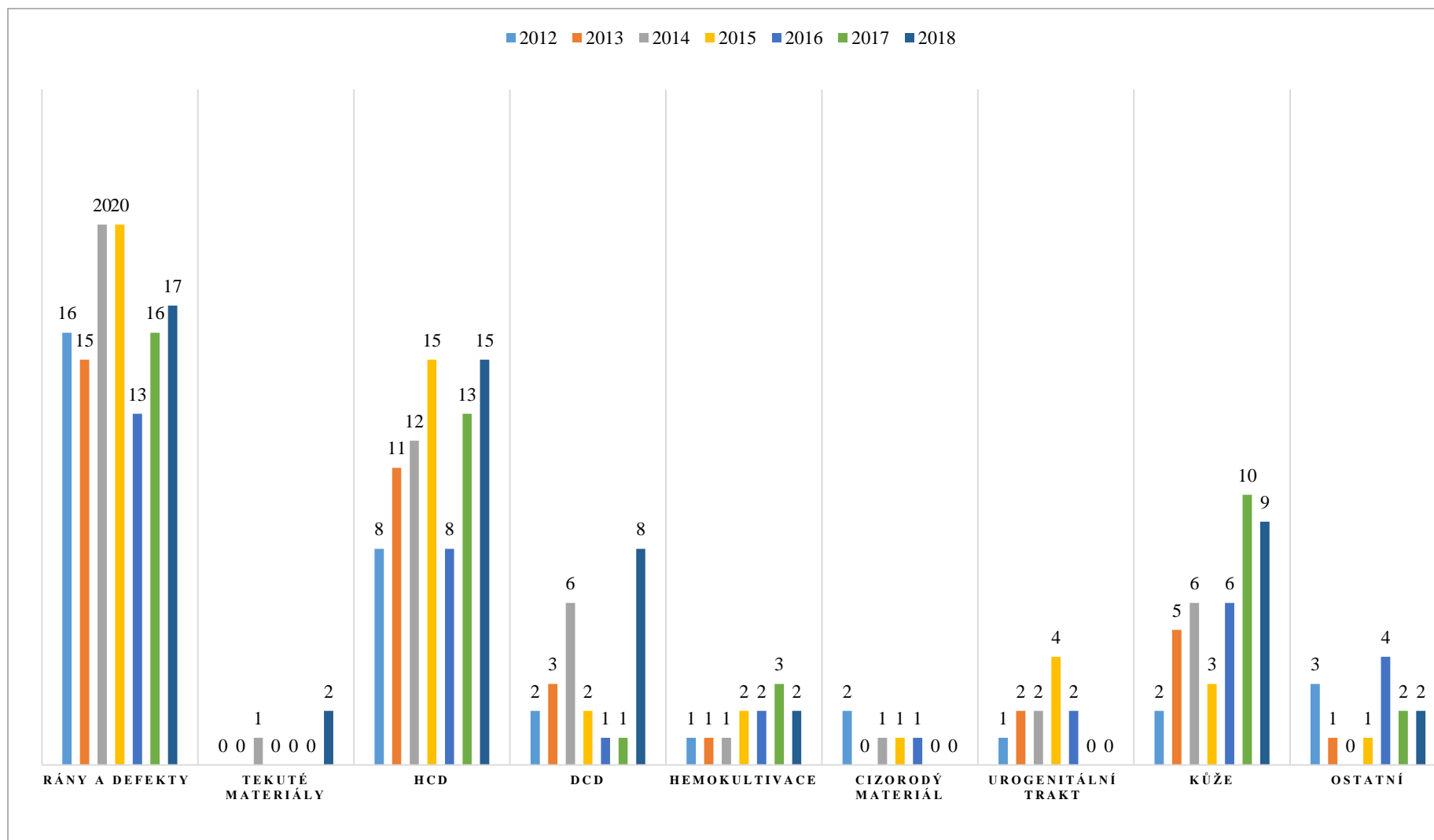
V tabulce 13 je znázorněno rozdělení nových případů MRSA z klinického materiálu a cíleného screeningu (zde jsou zahrnuty výtěry HCD a stěry z kůže – čelo, perineum atd.). Nejvyšší podíl klinického materiálu můžeme pozorovat v roce 2012. Nejnižší naopak v 2017. V roce 2013 byl poměr mezi cíleným screeninem a klinickým materiálem 1:1.

Cílený screening MRSA prováděný v nemocnici Strakonice, a.s. dle doporučených postupů vedl ročně k odhalení kolonizace MRSA u 10 (2012) až 24 (2018) nových pacientů. Jedná se o 29 (2012) až 51 % (2017) počtu nových záchytů MRSA.

Tab. 13: Rozdělení klinických vzorků a cíleného screeningu.

	2012	%	2013	%	2014	%	2015	%
klinický materiál	25	71%	19	50%	29	59%	30	63%
cílený screening	10	29%	19	50%	20	41%	18	38%
celkový počet	35	100%	38	100%	49	100%	48	100%
	2016	%	2017	%	2018	%	celkem	%
klinický materiál	23	62%	22	49%	31	56%	179	58%
cílený screening	14	38%	23	51%	24	44%	128	42%
celkový počet	37	100%	45	100%	55	100%	307	100%

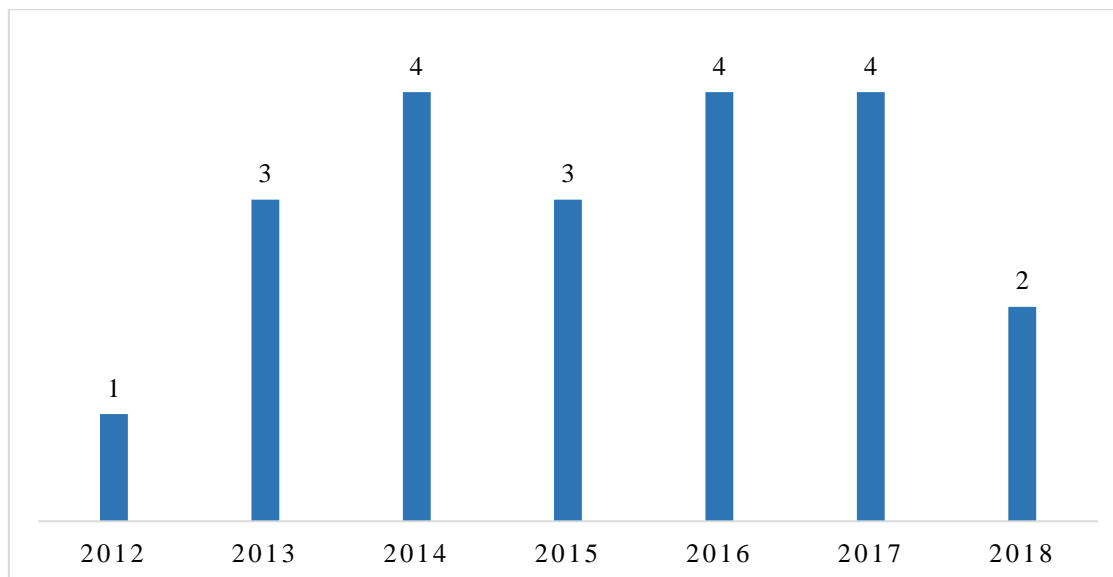
Ve sledovaném období (2012-2018) z klinického materiálu byla jasná převaha výtěrů z ran a defektů (viz. Graf 7). V roce 2014 a 2015 byl tento počet (20) nejvyšší.



Graf 7: Rozdělení prvního záchytu MRSA dle druhu materiálu

5.2.4 Hemokultury

Ve sledovaného souboru (2012-2018) bylo u 21 pacientů prokázána MRSA v hemokultuře (viz graf 8). Nejvyšší počet MRSA z hemokultur byl v roce 2014, 2016 a 2017, kdy byly shodně zachyceny 4 případy. V roce 2012 byl pouze jeden záchyt.

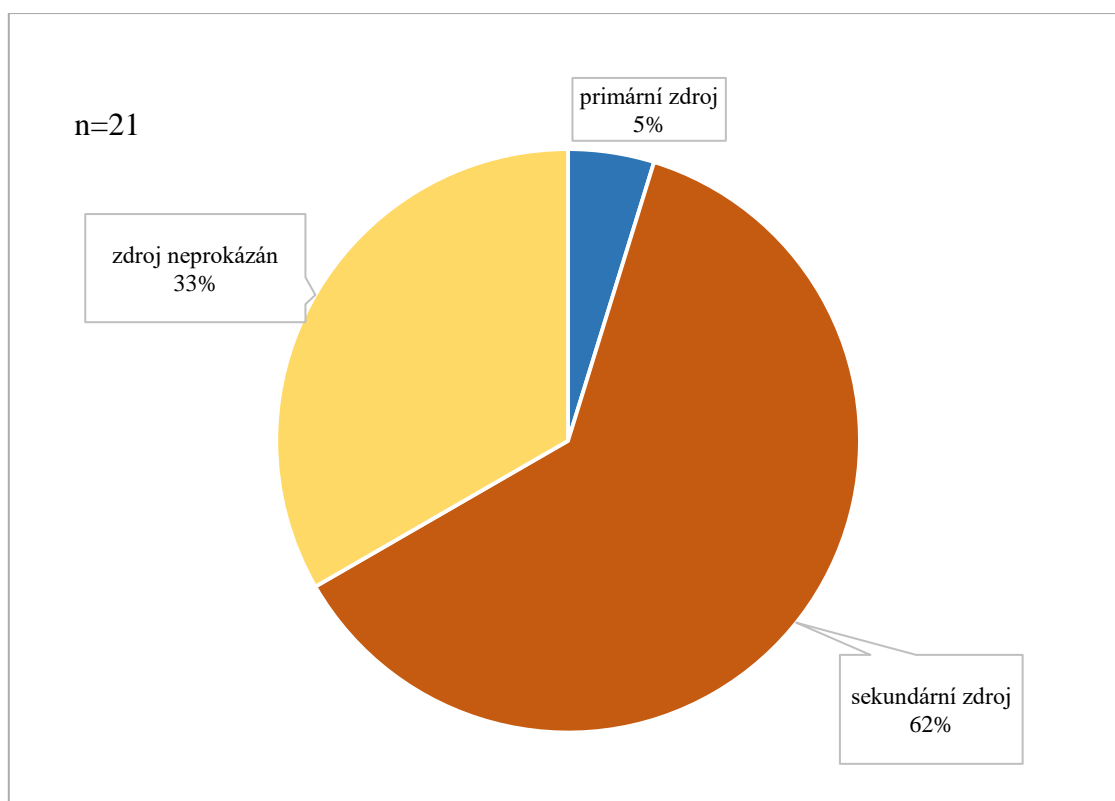


Graf 8: Přehled hemokultur po letech

Primární zdroj bakteriémie (katétr) byl potvrzen pouze u jednoho případu. U 7 hemokultur nebylo možné zdroj určit. Sekundární zdroj byl potvrzen u 33 případů jako defekt či rána, viz tab. 14 a graf 9.

Tab. 14. Zdroj hemokultur 2012-2018

zdroj	počet	%
primární zdroj	1	5%
sekundární zdroj	13	62%
zdroj neprokázán	7	33%
celkem	21	100%



Graf 9: Přehled pozitivních hemokultur dle zdroje 2012-2018.

6. Diskuse

Staphylococcus aureus je jeden z nejčastěji izolovaných kmenů z klinických vzorků. Kolonizuje až 30% populace, u které může za určitých podmínek vyvolat velmi závažné onemocnění s vysokou úmrtností. *S. aureus* je nejčastější příčinou infekcí kůže, měkkých tkání, kostí a kloubů (Tong et al., 2015). *S. aureus* patří mezi nejčastější grampozitivní koky způsobující bakteriémii (EARS-Net, 2018). Bakteriémie způsobená kmeny *S. aureus* je spojována s velkým rizikem infekční endokarditidy a dalších komplikací spojených s hematogenním šířením bakterie, jako je spondylodiscitida, osteomyelitida či septická artritida (Rayner a Munckhof, 2005; Jindrák et al., 2014). Především u hospitalizovaných pacientů je problémem rezistence k oxacilinu.

Výskyt methicillin-rezistentních kmenů *S. aureus* je aktuálně celosvětový problém. Od roku 2000 je Česká republika zapojena do celoevropského projektu EARS-Net, kde je monitorován výskyt MRSA mezi kmeny *S. aureus* izolovanými z klinicky závažných materiálů, jako jsou izoláty z krve (Urbášková, 2004). Evropské státy s nejvyšším výskytem invazivních infekcí způsobených MRSA kmeny jsou Rumunsko, kde v roce 2017 byla zaznamenána hodnota 44,4%, a Malta (42,1%, 2017), i když zde od roku 2006 trend rezistence postupně klesá. Situace v České republice je srovnatelná se sousedními státy jako je Německo či Polsko, kde procentuální zastoupení MRSA kmenů odpovídá 9-15% (EARS-Net, 2017). V roce 2018 v Nemocnici Strakonice, a.s. byla bakteriémie způsobená kmeny *S. aureus* prokázána u 33 pacientů. Z toho u dvou pacientů (6%) byl potvrzen kmen MRSA, což je pod celostátním průměrem v ČR (13,2%) a evropským průměrem (16,9%) udávaným pro rok 2017 (ECDC, 2018). Lékem volby u invazivních onemocnění způsobených *S. aureus* je oxacilin, v případě rezistence vankomycin. Toto ATB se jako úvodní terapie doporučuje u pacientů se zvýšeným rizikem MRSA, např. u pacientů s pozitivním záchytem MRSA v anamnéze nebo s historií hospitalizace na rizikovém oddělení. Terapie vankomycinem je problematická z hlediska jeho nefrotoxicity a nutností monitorovat hladiny ATB v krvi. Podání vankomycinu (v případě citlivého kmene *S. aureus*) není tak efektivní a účinné jako oxacilin (Urbášková, 2004; Beneš, 2018).

Mortalita spojená se stafylokokovou sepsí se udává 10-30% (van Hal et al., 2012). Z klinického hlediska je nejdůležitější co nejčasnější ověření citlivosti kmene

izolovaného z krve, proto je urychlení stanovení citlivosti u hemokultur věnována velká pozornost. Klasická kultivace spolu se stanovením diskové citlivosti je poměrně časově náročná, vyžaduje u diskové difuzní metody minimálně 16 hodin od identifikace (EUCAST, 2019a). Nově od roku 2019 (březen) EUCAST zavedl pro vybrané kmeny vč. *S. aureus* metodu přímého testování citlivosti z hemokultur po 4, 6 nebo 8 hodinách. Pro *S. aureus* je takto možné testovat citlivost ke gentamicinu, norfloxacinu, klindamicinu a cefoxitinu. Dle EUCAST je možné odečíst citlivost u 55% kmenů *S. aureus* již po 4 hodinách, u 91% po 6 a u 95% po 8 hodinách (EUCAST, 2019c).

Současným trendem ve většině rutinních laboratoří je zrychlení diagnostiky MRSA izolátů a zvýšení přesnosti výsledků nejen u hemokultur. S rozvojem molekulární diagnostiky se pro detekci MRSA stala zlatým standardem metoda PCR. Metodou volby jsou dnes především komerční rt-PCR sety, které umožňují rychlý průkaz *mecA* a *mecC* genu z bakteriálních kultur. Některé kity navíc umožňují detekci přímo z primárního vzorku. Ve studii, kterou provedli v roce 2015 Ellem et al., bylo prokázáno, že využití komerční soupravy BD Max StaphSR assay (BD Diagnostic Systems) zkrátí dobu potřebnou k identifikaci. Její specifita a senzitivita je srovnatelná s diskovou difúzní metodou. Výsledky jsou obvykle k dispozici do 2 hodin po signalizaci pozitivní kultivace krve. Nevýhodou těchto metod ovšem zůstává vysoká cena kitů a finančně náročné vybavení, proto tyto metody nejsou vhodné pro menší laboratoře.

Rychlou a spolehlivou alternativou PCR je detekce PBP2a proteinu pomocí specifických protilátek imunochromatografií, event. latexovou aglutinací. Ve své práci jsem testovala imunochromatografickou soupravou PBP2a SA Culture Colony Test (Alere). Výhodou imunochromatografie je možnost průkazu proteinu PBP2a přímo z bakteriální kultury bez nutnosti vaření a centrifugace vzorku, které vyžadují latex-aglutinační soupravy. Navíc PBP2a SA Culture Colony Test vykazuje lepší výsledky než latex-aglutinační metody (Tasse et al., 2016). PBP2a SA Culture Colony Test byl hodnocen ve studii z roku 2013, která zahrnovala 661 vzorků z různého materiálu. Test vykazoval senzitivitu 98,7% a specifitu 100% v porovnání se standardní diskovou difúzní metodou a byl autory doporučen k použití do běžného laboratorního provozu (Trienski et al., 2013). Podle jiné studie provedené v roce 2016 je tento test lépe využitelný než PCR metody určené k přímé detekci MRSA z krevních kultur

bez předchozí kultivace. Test je zároveň srovnatelný s PCR detekcí MRSA, ale vyžaduje předchozí kultivaci se zohledněním ostatní flóry. Dle této studie je tato metoda výhodná a efektivní pro laboratoře s přístrojem MALDI-TOF, protože nabízí vhodnou alternativu molekulárních metod (Delport et al., 2016).

Veškeré komerčně dostupné testy k identifikaci MRSA izolátů založené na detekci proteinu PBP2a, nejsou schopné spolehlivě detekovat protein PBP2c kódovaný genem *mecC*. Podle aktuální studie z roku 2017, detekoval PBP2a CCT pouze 10 ze 115 testovaných kmenů nesoucích gen *mecC*, což může být dáno pouze 63% homologií obou proteinů nebo nízkou produkcí PBP2c u testovaných kmenů. Senzitivita může být zvýšena, pokud jsou testovány kolonie rostoucí v blízkosti disku s cefoxitinem, který indukuje expresi *mecA* a *mecC* genu (Kolenda et al., 2017). Význam těchto kmenů se zdá být v České republice v současnosti pravděpodobně velmi omezený. Od roku 2007 do 2016 bylo izolováno 15 kmenů MRSA nesoucí gen *mecC* (Mališová et al., 2018).

Ve své práci jsem použila PBP2a SA Culture Colony Test u 74 izolátů *S. aureus*. U všech vzorků se výsledky shodovaly s vyšetřením citlivosti diskovou difuzní metodou s diskem cefoxitinu. Díky tomuto testu došlo k výraznému zkrácení doby odezvy. Výsledky analýzy byly známy do 6 minut týž den co identifikace, a mohly být aktivně sděleny ošetřujícímu lékaři, což vedlo k rychlému nasazení vhodné terapie. Zvláště v případech nejzávažnějších nálezů (infekce krevního řečiště) tato metoda zkrátila dobu odezvy u dvou pacientů se sepsí způsobenou MRSA kmeny, kde bylo možno volit cílenou terapii vankomycinem.

Zdrojem MRSA infekce může být např. kolonizovaný pacient nebo zdravotnický personál. Z tohoto důvodu je důležitou úlohou mikrobiologické laboratoře spolu s dalšími složkami týmu pro kontrolu infekcí monitorovat výskyt MRSA. V Nemocnici Strakonice, a.s. je tým pro kontrolu infekcí složen z epidemiologické sestry, epidemiologické asistentky a mikrobiologa. V souladu s doporučenými postupy (Bergerová et al., 2006) je zavedeno rutinní testování pacientů z oddělení ARO a JIP (CH-JIP, INT-JIP), který se provádí 2x týdně. Jedná se především o výtěry z nosu a stěry z kůže – perineum, dále pak vzorky tracheálního aspirátu (ARO). Cílený screening MRSA prováděný v Nemocnici Strakonice, a.s. vedl ročně k odhalení kolonizace MRSA u 10 (2012) až 24 (2018) nových pacientů. Jedná se o 29 (2012)

až 51 % (2017) počtu nových záchytů MRSA. Z klinických materiálů je MRSA nejčastěji detekována z ran a defektů. Kolonizace MRSA je u chronických defektů a ran častá (Roberts et al., 2005). Izoláty z klinických vzorků jsou hlášeny ošetřujícímu lékaři a epidemiologické sestře, což umožňuje zavést protiepidemická opatření a tím zabránit event. dalšímu rozšíření mezi pacienty či zdravotnickým personálem.

V letech 2012 - 2018 byla v Nemocnici Strakonice, a.s. celková incidence MRSA 3,27/1000 pacientů, přičemž nejvyšší incidence za celé sledované období byla pozorována v roce 2018 (4,2/1000 pacientů). Jedním z možných vysvětlení nárůstu v roce 2018 může být zvyšující se věk pacientů. Podle studie Kupfera et al. (2010) lze věk zařadit mezi rizikové faktory kolonizace či infekce MRSA. Podobně naše data ukazují převahu pacientů nad 60 let. V roce 2018 byl průměrný věk (73 let) nejvyšší za celé sledované období. Mezi pacienty s MRSA byla v jednotlivých letech jasná převaha mužů, což je v souladu s dříve publikovanými studiemi, ve kterých se ukázalo, že mužské pohlaví korelovalo s vyšším rizikem MRSA kolonizace (Callejo-Torre et al., 2015).

Nejvyšší incidence MRSA byla zaznamenána na lůžkovém chirurgickém a interním oddělení. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že tato oddělení disponují nejvyšším počtem lůžek a zároveň na chirurgii je možnost vyššího rizika pooperačních komplikací způsobenými MRSA kmeny. Na jednotkách intenzivní péče je vyšší incidence způsobena rutinním screeningem MRSA, 90% nově identifikovaných případů na JIP pochází ze screeningu.

Riziko MRSA infekce je spojeno s nozokomiálními nákazami. Rizikovým faktorem je např. kanylace. Ve sledovaném období (2012-2018) bylo zaznamenáno 21 pacientů s bakteriemií způsobenou MRSA kmeny. V jediném případě (6%) byla diagnostikována primární bakteriémie. Zdrojem byl centrální žilní katétr. U 13 pacientů (62%) byla bakteriémie sekundární, kde byly zdrojem infekce především z defektů a ran. U zbylých 7 (33%) zůstal zdroj neprokázán.

7. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem si osvojila mikrobiologické techniky při zpracování vybraného klinického materiálu a ověřila jsem využitelnost testu PBP2a SA Culture Colony Test (Alere) pro klinickou laboratoř středně velké nemocnice (Nemocnice Strakonice, a.s.).

V souladu se vstupními hypotézami této práce PBP2a SA Culture Colony Test (Alere) poskytoval rychlé a spolehlivé výsledky srovnatelné se stanovením citlivosti k cefoxitinu diskovou difúzní metodou. V porovnání s konvenčními metodami umožnil zkrácení doby odezvy až o 18 hodin. Výsledky analýzy byly známy do 6 min od identifikace a mohly být aktivně sděleny ošetřujícímu lékaři. To vedlo k rychlému nasazení cílené terapie. U dvou pacientek se jednalo o nasazení vankomycinu již 4 hodiny od pozitivivity hemokultur.

Analýza dat o výskytu MRSA v posledních osmi letech ukázala, že incidence MRSA v Nemocnici Strakonice, a.s. je poměrně nízká. Skladba nových pacientů s MRSA odpovídá rizikovým faktorům (vyšší věk, mužské pohlaví) a ukázala důležitost preventivních opatření (vysoký podíl nových záchytů MRSA ze screeningu). Přísné dodržování postupů správné ošetrovatelské praxe a zásad racionální terapie spolu s rychlou a přesnou diagnostikou nozokomiálních patogenů je stěžejní pro minimalizaci šíření rezistentních kmenů.

8. Seznam literatury

1. ANDRYSÍK, T., MACHOVÁ, I., PETRÁŠ, P., 2004. Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav. 13(5), s. 210-212. ISSN 1804 – 8676.
2. ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R., 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2(7):1751–1773. doi:10.3390/toxins2071751
3. BECK., W. D., BERGER-BACHI, B., KAYSER, F. H., 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. *J Bacteriol* 165, 373–378.
4. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. s. 194-202. ISBN 9788023802979.
5. BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. 651 s. ISBN 978-807-2626-441
6. BENEŠ, Jiří, 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0636-3.
7. BERGEROVÁ, T., HEDLOVÁ, D., JINDRÁK, V., URBÁŠKOVÁ, P., CHMELÍK, V., 2006. Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, roč. 15, příloha 1.
8. BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W., GARRITY, G. M., 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology* [online]. 2nd ed. New York: Springer [cit. 2019-04-26]. ISBN 978-0-387-95041-9. DOI: 10.1007/b92997. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=0VqgLiCPFcC&pg=PR4&lpg=PR4&dq=ISBN+9780387950419.&source=bl&ots=kHBdyEr7v&sig=ACfU3U1g1JRwCtYFYMeeSvOsnCuHgsKuQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiF58mpyfPhAhVIPBoKHZxtDSIQ6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=ISBN%20978-0-387-95041-9.&f=false>

9. BROWN, D. F. J., EDWARDS, D. I., HAWKEY, P. M., MORRISON, D., RIDGWAY, G. L., TOWNER, K. J., WREN, M. W. D., 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(6), 1000-1018. DOI: 10.1093/jac/dki372. ISSN 1460-2091. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/jac/article/56/6/1000/752986/Guidelines-for-the-laboratory-diagnosis-and>

10. BUKOWSKI, M., WLADYKA, B., DUBIN, G., 2010. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* [online]. 2(5), 1148-1165 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.3390/toxins2051148. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/5/1148>

11. CALLEJO-TORRE, F., EIROS, J. M., OSSA-ECHEVERRI, S., OLAECHEA, P., PALOMAR, M., ALVAREZ-LERMA F., Envin-Helics GROUP, 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the ICU: risk factors and a predictive model to detect it at ICU admission. *Critical Care*. 19(1), 23-49. DOI: 10.1186/cc14181. ISSN 1364-8535. Dostupné také z: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc14181>

12. COIA, J. E., DUCKWORTH, G. J., EDWARDS, D. I., FARRINGTON, M., FRY, C., HUMPHREYS, H., MALLAGHAN, C., TUCKER, D. R., 2006. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*. 63(1), S1-S44. DOI: 10.1016/j.jhin.2006.01.001. ISSN 01956701. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670106000028>

13. ČERMÁK, P., 2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Vyd. 1. Praha: Maxdorf-Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.
database.aspx

14. DATTA, P., GULATI, N., SINGLA, N., RANI VASDEVA, H., BALA, K., CHANDER, J., GUPTA, V. 2011. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *Journal of Medical Microbiology*. 60(11), 1613-1616. DOI: 10.1099/jmm.0.032219-0. ISSN 0022-

2615. Dostupné také z:
<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.032219-0>
15. DAUM, R. S., 2018. *Staphylococcus aureus. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier. 692-706.e4. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00115-8. ISBN 9780323401814. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323401814001158>
16. DE NIEDERHÄUSERN, S., BONDI, M., MESSI, P., ISEPPI, R., SABIA, C., MANICARDI, G., ANACARSO, I., 2011. Vancomycin-resistance Transferability from VanA Enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*. **62**(5), 1363-1367. DOI: 10.1007/s00284-011-9868-6. ISSN 0343-8651. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00284-011-9868-6>
17. DELPORT, J. A., MOHOROVIC, I., BURN, S., MCCORMICK, J. K., SCHAUS, D., LANNIGAN, R., JOHN, M., 2016. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia using combined three-hour short-incubation matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS identification and Alere Culture Colony PBP2a detection test. *Journal of Medical Microbiology*. **65**(7), 626-631. DOI: 10.1099/jmm.0.000285. ISSN 0022-2615. Dostupné také z:
<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000285>
18. DEURENBERG, R. H., VINK, C., KALENIC, S., FRIEDRICH, A. W., BRUGGEMAN C. A., STOBBERINGH E. E., 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. **13**(3), 222-235. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x. ISSN 1198743X. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14627403>
19. DINGES, M. M., PAUL, M., ORWIN, P., SCHLIEVERT, M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan. **13** (1) 16-34; DOI: 10.1128/CMR.13.1.16
20. EARS-Net Database [online]. Stockholm: European centre for disease prevention and control (ECDC), 2017[cit. 2019-04-13]. Dostupné z:
<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/>

21. ELLEM, J. A., OLMA, T., O'SULLIVAN, M. V. N., BURNHAM C.-A. D., 2015. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *S. aureus* Directly from Positive Blood Cultures by Use of the BD Max StaphSR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(12), 3900-3904. DOI: 10.1128/JCM.02155-15. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.02155-15>
22. EUCAST, 2017. *Návody EUCAST pro detekci mechanismů rezistence a specifické rezistence s klinickým a/nebo epidemiologickým významem* [online]. Ver. 2.0 (červen 2017). Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/EUCAST_mechanismy_rezistence_v2_2017.pdf
23. EUCAST, 2019a. *Disková difuzní metoda pro vyšetření citlivosti k antibiotikům* [online]. Ver. 7.0 (leden 2019). Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Diskova_difuze_Manual_v_7.0.pdf
24. EUCAST, 2019b. *Tabulky breakpointů pro interpretaci MIC a průměrů inhibičních zón* [online]. Ver. 9.0 (leden 2019). Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast>
25. EUCAST, 2019c. *Rychlé vyšetření antimikrobiální citlivosti EUCAST přímo z pozitivních hemokultivačních lahvíček*. [online]. Ver. 1.0 (březen 2019). Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/RAST/Rychle_vysetreni_citlivosti_primo_z_pozitivnich_hemokultivacnich_lahvicek_EUCAST_v.1.0.pdf
26. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2017. *Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union* [online]. [cit. 2019-04-015]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-consumption-eu-2017>
27. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2018. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017* [online].

- Stockholm: ECDC [cit. 2019-04-27]. ISBN 978-92-9498-279-7. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>
28. GOERING, R. V., DOCKRELL, M. H., ZUCKERMAN, M. A., ROITT, I. M., CHIODINI, P. L., 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-928-0.
29. GORDON, R. J., LOWY, F. D., 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 46(S5), S350-S359. DOI: 10.1086/533591. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/533591>
30. GREENWOOD, D., SLACK, R. C., PEUTHERER, J. F., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada. 686 s. ISBN 80-716-9365-0.
31. HABALOVÁ, K., ŽEMLIČKOVÁ, H., 2017. Meticilin-rezistentní stafylokoky: přehled terapie a antibiotická rezistence. *Remedia*. 27: 502–505. ISSN 2336-3541.
32. HANSSEN, A., ERICSON SOLLID, J. U., 2006, SCC mec in staphylococci: genes on the move, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(2), s.8–20, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>
33. HARTMAN, B., TOMASZ, A., 1981. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Vol 19 (číslo 5), 726-735. DOI: 10.1128/AAC.19.5.726. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.19.5.726>
34. HARVEY, R. A. et al., 2006. *Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams, 2. vyd. 432 p. strana 69-70. ISBN 07-817-8215-5.
35. HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F. C. et al., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 40, 135–6.

36. HRYNIEWICZ, M. M., GARBACZ, K., 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected?. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 66(10), 1367-1373 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1099/jmm.0.000585. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000585>
37. JEVONS, M. P., 1961. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *British Medical Journal*, 1(5219), 124–125.
38. JI, Y., (ed), 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. Totowa, N.J.(ed). *Methods in molecular biology*. Clifton, NY. : Humana Press. v. 391. ISBN 978-1-58829-655-9.
39. JINDRÁK, V., HEDLOVÁ, D., URBÁŠKOVÁ, P., 2014. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. 1. Praha: Mladá fronta. 709 s. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2815-8.
40. KLUYTMANS, J., STRUELENS, M., 2009. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ*. 338(1), b364-b364. DOI: 10.1136/bmj.b364. ISSN 0959-8138. Dostupné také z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.b364>
41. KÖCK, R., BECKER, K., COOKSON, B., GEMERT-PIJNEN VAN, J. E., HARBARATH, S., KLUYTMANS, J., MIELKE, M., PETERS, G., SKOV, R. L., STRUELENS, M. J., TACCONELLI, E., WITTE, W., FRIEDRICH, A. W., 2014. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eurosurveillance*. 19(29), 23-49. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.29.20860. ISSN 1560-7917. Dostupné také z: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.29.20860>
42. KÖCK, R., BECKER, K., COOKSON, B., GEMERT-PIJNEN VAN, J. E., HARBARATH, S., KLUYTMANS, J., MIELKE, M., PETERS, G., SKOV, R. L., STRUELENS, M. J., TACCONELLI, E., NAVARRO TORNÉ, A., WITTE, W., FRIEDRICH, A. W., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*. 15(41). DOI:

10.2807/ese.15.41.19688-en. ISSN 1560-7917. Dostupné také z:
<http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.41.19688-en>

43. KOLENDA, C., DUPIEUX, C., DECOUSSER, J-W., et al., 2017. Comparison of Automated Antimicrobial Susceptibility Testing Systems To Detect mecC -Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(12), 3554-3556. DOI: 10.1128/JCM.01150-17. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01150-17>
44. KUPFER, M., L. JATZWALK, S. MONECKE, J. MÖBIUS, 2010. MRSA in a large German University Hospital: Male gender is a significant risk factor for MRSA acquisition. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, 2010, 5(2). DOI: 10.3205/dgkh000154, ISSN 1863-5245. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/47404614_MRSA_in_a_large_German_University_Hospital_Male_gender_is_a_significant_risk_factor_for_MRSA_acquisition
45. LAY, J. O., 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 19(8), 507-516. DOI: 10.1016/S0165-9936(00)00027-3. ISSN 01659936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993600000273>
46. LEBEAUX, D., BARBIER, F., ANEGABAULT, C., BENMAHDI, L., RUPPE, E., FELIX, B., GAILLARD, K., DJOSSOU, F., EPELBOIN, L., DUPONT, C. et al., 2012. Evolution of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in a Remote Population. *Antimicrob Agents Chemother* .56, 315–323. doi: 10.1128/AAC.00547-11. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064532>
47. LIU, D., 2015. Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology* [online]. Elsevier. s. 979-995. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00055-X. ISBN 9780123971692. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012397169200055X>
48. LOWY, F. D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 111:1265–1273

49. MALACHOWA, N., DELEO, F. R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(18), 3057-3071. DOI: 10.1007/s00018-010-0389-4. ISSN 1420-682X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0389-4>
50. MALHOTRA-KUMAR, S., HACCURIA, K., MICHIELS, M., IEVEN, M., POYART, C., HRYNIEWICZ, W., GOOSSENS, H., 2008. Current Trends in Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Glycopeptide-Resistant *Enterococcus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(5), 1577-1587. DOI: 10.1128/JCM.00326-08. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00326-08>
51. MALIŠOVÁ, L., FRIDRICOVÁ, M., JAKUBŮ, V., KEKLÁKOVÁ, J., PETRÁŠ, P., ŽEMLIČKOVÁ, P., 2018. Záchyt mecC pozitivních MRSA (meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) v České republice *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, roč. 27, č. 2, s. 56-57.
52. MARSHALL, C., WESSELINGH, S., MCDONALD, M., SPELMAN, D., 2004. Control of endemic MRSA-what is the evidence? A personal view. *Journal of Hospital Infection*. 56(4), 253-268. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.02.001. ISSN 01956701. Dostupné také z: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(04\)00065-9/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(04)00065-9/fulltext)
53. MATOUSKOVA, I. a JANOUT, V., 2008. Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Papers*. 152(2), 191-202. DOI: 10.5507/bp.2008.030. ISSN 12138118. Dostupné také z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2008.030.html>
54. MOELLERING, R. C., 2011. MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67(1), 4-11. DOI: 10.1093/jac/dkr437. ISSN 0305-7453. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkr437>
55. NIEDERHÄUSERN DE, S., BONDI, M., MESSI, P., ISEPPI, R., SABIA, C., MANICARDI, G., ANACARSO, I., 2011. Vancomycin-resistance Transferability from VanA *Enterococci* to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*. 62(5), 1363-1367.

DOI: 10.1007/s00284-011-9868-6. ISSN 0343-8651. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00284-011-9868-6>

56. PANTOSTI, A., VENDITTI, M., 2009. What is MRSA?. *European Respiratory Journal*. 34(5), 1190-1196. DOI: 10.1183/09031936.00007709. ISSN 0903-1936. Dostupné také z: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00007709>
57. PANTŮČEK, R., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., MACHOVÁ, I., ČERNOHLÁVKOVÁ, J., MAŠLAŇOVÁ, I., GELBÍČOVÁ, T., RŮŽIČKOVÁ, V., DOŠKAŘ, J., 2013. *Staphylococcus petrasii*, nový druh stafylokoka z České republiky. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie* [online]. roč. 22, č. 8, s. 266-269 [cit. 2018-09-21]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/22_2013/08_srpen/266_S.petrasi.pdf
58. PATERSON, G. K., MORGAN, F. J. E., HARRISON, E. M., PEACOCK, S. J., PARKHILL, J., ZADOKS, R. N., HOLMES, M. A., 2014. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(3), 598-602. DOI: 10.1093/jac/dkt417. ISSN 0305-7453. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt417>
59. PAZDERKOVÁ, J., KREJČÍ, J., DLOUHÝ, P., 2012. Padesát let s MRSA: Pokus o zhodnocení postupů používaných k omezení výskytu infekcí vyvolaných kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentními k meticilinu (MRSA). *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 18 (5), s. 132-141.
60. PERRY, J. D., FREYDIÈRE, A., M., 2007. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. 103(6), 2046-2055. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x>
61. PETRÁŠ, P., 2004. Aktuality v taxonomii rodu *Staphylococcus*. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav. roč. 13, č. 7, s. 297-300.

62. PETRÁŠ, P., 2010. Nový „český“ stafylokok, *Staphylococcus microti*. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. [online]. roč. 19 č. 1-2, s. 37-39 [cit. 2019-01-13]. Dostupné také z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/19_2010/01 leden/37_microti.pdf?highlightWords=nov%C3%BD+%C4%8Desk%C3%BD+stafylokok
63. PETRÁŠ, P., KEKLÁKOVÁ, J., 2018. *Staphylococcus edaphicus*, nový druh methicilin-rezistentního stafylokoka z Antarktidy. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. [online]. roč. 27 č. 3-4, s. 74-75 [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/stafylokoky/publikace/S.edaphicus.pdf>
64. PINHO, M. G., FILIPE, S. R., LENCASTRE DE, H., TOMASZ, A., 2001. Complementation of the Essential Peptidoglycan Transpeptidase Function of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) by the Drug Resistance Protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 183(22), 6525-6531. DOI: 10.1128/JB.183.22.6525-6531.2001. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.22.6525-6531.2001>
65. PRŮŠA, R. et al., 2012. Základní mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště a septických stavů. In JINDRÁK, V., *Průvodce laboratorními nálezy*. C6.16., Praha: Raabe. ISBN 978-80-87553-68-8.
66. RAYNER, C., MUNCKHOF W. J., 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal*. 35(s2), S3-S16. DOI: 10.1111/j.1444-0903.2005.00976.x. ISSN 1444-0903. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1444-0903.2005.00976.x>
67. Resistance Map, 2017. *The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy* [online]. Washington. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://resistancemap.cddep.org/>
68. ROBERTS, S. CHAMBERS, S., 2005. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Internal Medicine Journal*. 35(2), 97-105. DOI: 10.1111/j.1444-0903.2005.00983.x. ISSN 1444-0903. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1444-0903.2005.00983.x>

69. ROSSNEY, A. S., HERRA, C. M., FITZGIBBON, M. M., MORGAN, P. M., LAWRENCE, M. J., O'CONNELL, B., 2007. Evaluation of the IDI-MRSA assay on the SmartCycler real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(7), 459-466. DOI: 10.1007/s10096-007-0303-7. ISSN 0934-9723. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-007-0303-7>
70. STEGGER, M., ANDERSEN, P. S., KEARNS, A., PICHON, B., HOLMES, M. A., EDWARDS, G., LAURENT, F., TEALE, C., SKOV, R., LARSEN, A. R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clinical Microbiology Infection*. 4:395-400. ISSN 1198-743
71. TASSE, J., DUPIEUX, C., CAILLON J., et al., 2016. Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 85(4), 419-421. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.008. ISSN 07328893. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889316300840>
72. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance by EUCAST. version 2.0. [online] [citováno 2018-04-30]. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
73. TOLTZIS, P., 2018. *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative Staphylococci. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* [online]. Elsevier. 201706-712.e4 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00116-X. ISBN 9780323401814. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032340181400116X>
74. TONG, S. Y. C., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L. FOWLER, V. L., 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3), 603-661. DOI:

10.1128/CMR.00134-14. ISSN 0893-8512. Dostupné také z:
<http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00134-14>

75. TRIENSKI, T. L., BARRETT, H. L., PASQUALE, T. R., DIPERSIO, J. R., FILE, T. M., 2013. Evaluation and use of a rapid *Staphylococcus aureus* assay by an antimicrobial stewardship program. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 70(21), 1908-1912. DOI: 10.2146/ajhp130118. ISSN 1079-2082. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajhp/article/70/21/1908/5112363>
76. URBÁŠKOVÁ, P., 1998. Rezistence bakterií k antibiotikům vybrané metody. Praha: Trios. ISBN 978-80-86850-04-7.
77. URBÁŠKOVÁ, P., MACKOVÁ, B., MELTER, O., 2004. Disk s cefoxitinem – spolehlivá metoda pro vyhledávání kmenů stafylokoků rezistentních k oxacilinu. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, , 13, (7), s. 296-297.
78. URBÁŠKOVÁ, P., MACKOVÁ, M., JAKUBŮ, V., ŽEMLIČKOVÁ, H., 2006. Surveillance antibiotické rezistence invazivních izolátů *Staphylococcus aureus* v rámci EARSS. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 15(5), 200 – 203.
79. VAN HAL, S. J., JENSEN, S. O., VASKA, V. L., ESPEDIDO B. A., PATERSON, D. L., GOSBELL, I. B., 2012. Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(2), 362-386. DOI: 10.1128/CMR.05022-11. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.05022-11>
80. VAN LANDUYT, H., CAUWELIER, B., GORDTS, B., DESCHEEMAECCKER, P., 2004. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 23(5), 389-392. DOI: 10.1007/s10096-004-1130-8. ISSN 0934-9723. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-004-1130-8>
81. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. s. 128-39. ISBN 80-902896-6-5.

82. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

9. Seznam příloh

Příloha 1: Výsledky měření vybraných klinicky závažných materiálů (zdroj: vlastní)

Hemokultury							
lab. číslo	oddělení	datum příjmu	pohlaví	CXT	detekce PBP2a	ChromID MRSA	poznámky
H0299390	INTJIP	20181009	M	C	N	N	
H0298065	INTMUZ	20180914	M	C	N	N	
H0295145	INTZEN	20180722	M	C	N	N	
H0289863	NEU	20180417	M	C	N	N	
H0284519	INTMUZ	20180119	M	C	N	N	
H0298214	INTMUZ	20180918	M	C	N	N	
H0299767	INTMUZ	20181016	M	C	N	N	
H0293641	INTMUZ	20180625	M	C	N	N	
H0286569	TRNLUZ	20180219	M	C	N	N	
H0290964	CHIR3	20180505	M	C	N	N	
H0291743	CHIR3	20180518	M	C	N	N	
H0283861	INTZEN	20180105	M	C	N	N	
H0284424	INTMUZ	20180117	M	C	N	N	
H0286257	ARO	20180214	M	C	N	N	
H0284681	NEU	20180122	M	C	N	N	
H0300028	INTMUZ	20181022	M	C	N	N	
H0285242	INTMUZ	20180131	M	C	N	N	
H0302668	ARO	20181212	M	C	N	N	
H0295233	CHIR3	20180723	M	C	N	N	
H0289822	NEU	20180416	M	C	N	N	
H0284774	DET	20180123	M	C	N	N	
H0291609	ARO	20180516	Z	C	N	N	
H0299807	NEU	20181017	Z	C	N	N	
H0295496	ARO	20180730	Z	C	N	N	
H0300195	DIALÝZA	20181025	Z	C	N	N	
H0283827	INTZEN	20180105	Z	C	N	N	
H0290164	CHIR 2	20180423	Z	C	N	N	
H0285339	INTZEN	20180201	Z	R	P	P	zdroj: operační rána
H0290042	INTJIP	20180420	Z	R	P	P	zdroj: defekt
H0294665	ARO	20180712	Z	C	N	N	
H0296952	INTZEN	20180825	Z	C	N	N	

H0293500	INTJIP	20180621	Z	C	N	N	
H0291753	INTZEN	20180519	Z	C	N	N	
Tracheální aspiráty							
lab. číslo	oddělení	datum příjmu	pohlaví	CXT	Detekce PBP2a	ChromID MRSA	poznámky
H0286200	ARO	20180213	M	C	N	N	
H0286726	ARO	20180222	M	C	N	N	
H0287587	ARO	20180306	M	C	N	N	
H0295044	ARO	20180719	M	R	P	P	
H0296655	ARO	20180820	M	C	N	N	
H0296813	ARO	20180823	M	C	N	N	
H0297854	ARO	20180911	M	C	N	N	
H0298449	ARO	20180923	M	C	N	N	
H0299535	ARO	20181012	M	C	N	N	
H0299848	ARO	20181018	M	C	N	N	
H0300426	ARO	20181030	M	R	P	P	
H0302795	ARO	20181213	M	C	N	N	
H0302944	ARO	20181217	M	C	N	N	
H0303170	ARO	20181220	M	C	N	N	
H0284579	ARO	20180120	Z	C	N	N	
H0290337	ARO	20180426	Z	C	N	N	
H0290516	ARO	20180430	Z	C	N	N	
H0291377	ARO	20180514	Z	C	N	N	
H0291528	ARO	20180515	Z	C	N	N	
H0291623	ARO	20180517	Z	C	N	N	
H0291710	ARO	20180518	Z	C	N	N	
H0292129	ARO	20180528	Z	R	P	P	
H0292276	ARO	20180529	Z	R	P	P	
H0293599	ARO	20180623	Z	C	N	N	
H0295500	ARO	20180730	Z	C	N	N	
H0299842	ARO	20181018	Z	C	N	N	
Tekuté materiály							
lab. číslo	oddělení	datum příjmu	pohlaví	CXT	Detekce PBP2a	ChromID MRSA	poznámky
H0284001	CHIR 1	20180108	M	C	N	N	absces pánve
H0284545	CHIRAM	20180119	M	C	N	N	absces prstu P ruky

H0287269	CHIRAM	20180301	M	C	N	N	punktát - loket
H0287361	INTAMG	20180301	Z	R	P	P	žluč
H0290373	CHIRJIP	20180426	Z	C	N	N	Pleurální výpotek
H0290750	CHIRSSE	20180502	Z	C	N	N	punktát stp. osteosyntéze
H0290822	NEFROL	20180503	M	C	N	N	peritoneální dialyzát
H0292076	CHIRSSE	20180525	M	C	N	N	Hnis – vřed PDK
H0292834	CHIRSSE	20180607	M	C	N	N	Peritoneální výpotek - apendicitida
H0294022	CHIRAM	20180702	M	C	N	N	Výpotek po kontuzi
H0295239	CHIRAM	20180723	Z	C	N	N	Hnis – panaricium P ruka
H0297311	CHIRAM	20180902	M	R	P	P	Bursa olekranonu
H0299429	CHIRSSE	20181010	M	C	N	N	Hnis – panaricium P ruka
H0299410	CHIR 1	20181010	Z	C	N	N	punktát- masektomie
H0300243	CHIR3	20181026	Z	C	N	N	Exudát z redonu

10. Seznam zkratek

ATB – antibiotika

BORSA - Borderline oxacilin resistant *S. aureus*

CA-MRSA meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* v komunitě

EARS-Net - European Antimicrobial Resistance Surveillance network

ECDC - Evropské centrum pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HA-MRSA meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* v nemocničním zařízení

IgA (IgG, IgM) – imunoglobuliny třídy A, G a M

LIS – laboratorní informační systém

mecA – gen kódující protein PBP2a

mecC – gen kódující protein PBP2c

MHC II – hlavní histokompatibilní systém II

MRSA – Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MSSA – Methicilin citlivý *Staphylococcus aureus*

NaCl – chlorid sodný

PBP – penicilin-vázající protein

PBP2a/c – penicilin-vázající protein 2a/b

PCR – polymerázová řetězová reakce (rt-PCR – real-time)

PVL – Panton-Valentinův leukocidin

SCCmec – Stafylokoková chromozomální kazeta

STAU – *Staphylococcus aureus*

STŠ – syndrom toxického šoku

TSST – toxin syndromu toxického šoku

VRSA – vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Zkratky půd:

CAN2 – chromogenní půda pro kvasinky

CNA – krevní agar obohacený kys. nalidixovou

COLSB – krevní agar

HAEM – čokoládový agar

MH agar - Mueller-Hinton agar

SCH – Schadlerův agar

URI – chromogenní půda