

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Barbora Ondříčková**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**Zdravotnický významné gram pozitivní koky**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

PLZEŇ 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne: 30. 3. 2017

.....

vlastnoruční podpis

Ráda bych tímto poděkovala MUDr. Janě Amlerové za odborné vedení bakalářské práce, poskytování cenných rad, věcných připomínek, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Ondříčková Barbora

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Zdravotnický významné gram pozitivní koky

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 12

Počet příloh: 7

Počet titulů použité literatury: 44

Klíčová slova: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, patogenita, diagnostika

### **Souhrn:**

Bakalářská práce se zabývá zdravotnický významnými gram pozitivními koky rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. Je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část shrnuje informace o významných druzích stafylokoků, streptokoků a enterokoků. Zabývá se jejich charakteristikou a popisuje jejich patogenitu a mikrobiologickou diagnostiku. Praktická část je zaměřená na výskyt jednotlivých druhů gram pozitivních koků ve Fakultní nemocnici v Plzni v listopadu 2016.

## **Annotation**

Surname and name: Ondříčková Barbora

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Medically important Gram-positive cocci

Consultant: MUDr. Jana Amlerová

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 12

Number of appendices: 7

Number of literature items used: 44

Key words: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, pathogenicity, diagnostics

### Summary:

The bachelor thesis deals with medically significant gram positive cocci genus *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*. The work is divided into theoretical and practical parts. The theoretical one summarizes information about important species from *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus* family. It deals with their characteristics and describes their pathogenicity and microbiological diagnostics. Practical part is focused on the distribution of individual gram positive cocci species at the University Hospital of Pilsen in November 2016.

## OBSAH

OBSAH .....	9
ÚVOD .....	11
TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	13
1.1 Charakteristika .....	13
1.2 Koaguláza pozitivní stafylokoky .....	14
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.2.1.1 Charakteristika.....	14
1.2.1.2 Patogenita .....	14
1.3 Laboratorní diagnostika .....	16
1.4 Koaguláza negativní stafylokoky.....	17
1.4.1 Charakteristika.....	17
1.4.2 Patogenita .....	18
1.4.3 Laboratorní diagnostika.....	19
2 Rod <i>Streptococcus</i> .....	20
2.1 Charakteristika .....	20
2.2 Zdravotnicky významné druhy .....	20
2.2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	20
2.2.1.1 Charakteristika.....	21
2.2.1.2 Patogenita .....	21
2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	22
2.2.2.1 Charakteristika.....	23
2.2.2.2 Patogenita .....	23
2.2.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	24
2.2.3.1 Charakteristika.....	24
2.2.3.2 Patogenita .....	24
2.2.4 Streptokoky Milleri group .....	25
2.3 Laboratorní diagnostika .....	25
3 Rod <i>Enterococcus</i> .....	27
3.1 Charakteristika .....	27
3.2 Patogenita.....	27
3.3 Laboratorní diagnostika .....	28
4 Rezistence vůči antibiotikům .....	29

4.1	MRSA Methilcilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
4.2	VRSA Vancomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
4.3	VRE Vancomycin-rezistentní <i>Enterococcus sp.</i> .....	30
4.4	Indukované rezistence ke klindamycinu.....	30
PRAKTICKÁ ČÁST.....		32
5	Cíle práce .....	33
6	Vyšetřovaný soubor .....	34
6.1	Krev .....	34
6.2	Likvor.....	34
7	Metodika .....	35
7.1	Hemokultivace .....	35
7.1.1	Pozitivní výsledek hemokultivace.....	35
7.1.2	Rozdílnost výsledků hemokultivace (zdánlivá pozitivita) .....	35
7.2	Likvor.....	36
7.3	Identifikace bakterií .....	36
7.4	Identifikace gram pozitivních koků .....	37
7.4.1	Metody.....	37
7.4.2	Postup identifikace .....	37
7.4.3	Identifikace stafylokoků .....	37
7.4.4	Identifikace streptokoků .....	38
7.4.5	Identifikace enterokoků .....	38
7.5	Stanovení citlivosti .....	38
7.5.1	Disková difúzní metoda.....	38
7.5.2	Minimální inhibiční koncentrace (MIC) .....	39
8	Výsledky .....	40
9	DISKUZE.....	43
ZÁVĚR.....		45
CITOVANÁ LITERATURA.....		46
SEZNAM TABULEK		
SEZNAM PŘÍLOH		
PŘÍLOHY		

## ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá stafylokoky, streptokoky a enterokoky, které lze považovat za zdravotnický významné. Jsou to gram pozitivní koky, které způsobují mnohá onemocnění. Mezi ta nejzávažnější patří sepse, meningitida nebo toxický šok. Některé tyto koky jsou přirozenou součástí mikroflóry lidského těla, ať už se jedná o kůži, sliznici nebo střevo. Jejich patogenita se projevuje až při snížené obranyschopnosti lidského organismu. Mnohé gram pozitivní koky jsou příčinou nozokomiálních nákaz hospitalizovaných pacientů. To způsobuje problém především u dlouhodobě hospitalizovaných a vážně nemocných pacientů, jejichž stav se může nově vzniklou nákazou zhoršit.

Velkým problémem gram pozitivních koků se poslední dobou stává zvyšující se počet kmenů rezistentních vůči antibiotikům čili zvýšení odolnosti bakterií vůči léčbě. Příčinou zvyšující se rezistence je užívání širokospektrých antibiotik nebo nadměrné a často zbytečné užívání antibiotik.

Ve své práci popisují nejčastěji se vyskytující stafylokoky, streptokoky a enterokoky, věnují se jejich charakteristice, patogenitě a laboratorní diagnostice. Dále se věnují výskytu některých významných druhů na několika odděleních ve Fakultní nemocnici (FN) v Plzni.

Téma bakalářské práce jsem si vybrala z důvodu vlastní zkušenosti se *Staphylococcus aureus*. Jelikož má vlastní zkušenost s touto bakterií byla několikanásobná, chtěla jsem se o této a dalších bakteriích dozvědět více.



## **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 Rod *Staphylococcus*

V roce 1880 Louis Pasteur a Alexander Ogston jako první pozorovali v mikroskopu stafylokoky, které popsali jako shluky trsů a řetízků kulatých organismů.

(1)

Mezi nejvýznamnější stafylokoky patří např. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus intermedius*.

## 1.1 Charakteristika

Stafylokoky jsou gram pozitivní bakterie, které jsou nepohyblivé a vyskytují se na kůži a sliznici lidí a zvířat. (2) Stafylokoky se řadí k nejodolnějším nesporelujícím bakteriím, které tvoří jen omezeně pouzdro. (1) Velmi dobře se přizpůsobují různým extrémním životním podmínkám, díky tomu jsou všudypřítomné. (2)

Jejich velikost je přibližně 1  $\mu\text{m}$ . Mohou se vyskytovat jednotlivě, v párech, v tetradách nebo v krátkých řetízcích, které tvoří maximálně čtyři buňky. Ve shlucích tvoří hrozen, tak zvaný staphyle, vznikající dělením bakterie. (1) (3)

Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, mají tedy schopnost žít v aerobním i anaerobním prostředí. Lépe se jim daří v aerobních podmínkách čili za přítomnosti kyslíku. (3) Stafylokoky jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní a dobře rostou v 10% roztoku NaCl. (1). Většina druhů také potřebuje ke svému růstu zdroj organického dusíku. (3)

Podle Petráše (2010) existuje 43 druhů stafylokoků, devět z nich obsahuje dva poddruhy a jeden tři poddruhy. Přehled druhů *Staphylococcus* sp. je v příloze č. 1. Stafylokoky se dělí do dvou skupin podle schopnosti koagulovat plazmu, koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. Koagulaci plazmy způsobuje enzym koaguláza, který je přítomen u koaguláza pozitivních ve formě volné nebo vázané – viz dále. (1) (4)

Stafylokoky získávají rezistenci k různým druhům antibiotik a často se vyskytují jako původci nozokomiálních nemocí. (5)

## 1.2 Koaguláza pozitivní stafylokoky

### 1.2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* se vyskytuje jako potenciálně patogenní stafylokok u lidí, zvířat a hmyzu. (6) Při poruše odolnosti organismu se začne chovat patogenním způsobem a může vyvolat onemocnění. Onemocnění se projevuje od hnisavých zánětů kůže až po závažné záněty vnitřních orgánů, které mohou vést až k sepsi a ke smrti. (1)

#### 1.2.1.1 Charakteristika

Buněčnou stěnu *Staphylococcus aureus* tvoří peptidoglykan, kyselina teichoová a protein A. K adhezi bakterie na povrch sliznice pomáhá skupinově specifický polysacharid A, který je tvořen ribitolovými podjednotkami kyseliny teichoové. (1) Z genetického hlediska probíhá u *Staphylococcus aureus* přenos genů mezi kmeny pomocí tak zvané transdukce. (1) Během transdukce se přenáší genetická informace z jedné bakteriální buňky do druhé pomocí virové částice bakteriofágu. (7) Stejným způsobem probíhá výměna genů, které kódují rezistenci na antibiotika. Tyto geny jsou umístěny v plazmidech. (1)

*Staphylococcus aureus* produkuje čtyři hemolyziny – alfa, beta, gama a delta. Alfa-hemolyzin způsobuje úplnou hemolýzu především králičích erytrocytů. Beta-hemolyzin působí na ovčí erytrocyty. Projeví se změnou barvy krevního agaru kolem kolonie. Lýza je způsobená až sekundárními vlivy, jako je například teplota, kdy se půda s kolonií stafylokoků vloží do ledničky. Alfa-hemolyzin a beta-hemolyzin na sebe působí antagonisticky. Delta-hemolyzin působí synergicky na beta-hemolyzin a působí především na lidské krvinky. Na krevním agaru může být delta-hemolyzin inhibován lipoproteiny. (1) (8)

#### 1.2.1.2 Patogenita

Třetina populace je nosičem *Staphylococcus aureus* bez projevujících se příznaků. Zároveň je *S. aureus* považován za jednoho z neúspěšnějších lidských patogenů (1). Obsahuje řadu faktorů virulence, které způsobují infekce různého typu od banálních kožních afekcí až po těžké infekce orgánů nebo sepse. Jiné toxiny mohou způsobit i intoxikaci z potravin (1).

Faktory virulence *S. aureus* se dělí na povrchové a extracelulární. Mezi povrchové faktory se řadí peptidoglykan, protein A, pouzdro a vázaná koaguláza (1).

Peptidoglykan má podobné účinky jako endotoxin gram negativních bakterií, vyvolává uvolnění cytokinů z makrofágů a aktivaci komplementu. (1) Protein A je hlavní bílkovinou buněčné stěny. Skládá se z pěti vazebných domén. Každá z těchto domén je schopná vázat Fc-fragment různých imunoglobulinů, nejčastěji váže imunoglobulin IgG. Touto reakcí chrání stafylokoky před opsonizací, nedochází tudíž k navození fagocytózy imunitními buňkami, a účinkem komplementu. (9) (5) Vázaná koaguláza neboli tzv. clumping factor váže fibrinogen a mění jej na fibrin. (1)

Extracelulární faktory virulence se dělí na toxiny a enzymy. Mezi enzymy se řadí koaguláza, hyaluronidáza, kataláza, nukleázy, lipázy, fibrinolysin a penicilináza. Mezi stafylokokové toxiny patří hemolyziny, enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliativní toxiny. (1)

Volná koaguláza reaguje s plazmatickým faktorem. Produktem reakce je stafylofibrin. Ten katalyzuje změnu fibrinogenu na fibrin, který ohraničuje ložisko infekce a stafylokokové záněty proto probíhají ve formě abscesů. (1) Další enzym kataláza štěpí peroxid vodíku. Enzym hyaluronidáza štěpí mezibuněčnou kyselinu hyaluronovou a způsobuje šíření stafylokoků ve tkáni. Lipázy účinkují v mazových žlázách a v podkoží. Nukleázy napadají jádra leukocytů. Fibrinolysin neboli stafylokináza rozpouští sraženiny fibrinu. Penicilináza inaktivuje beta-laktamová antibiotika. (1)

Stafylokokové toxiny poškozující povrchovou membránu buňky jsou čtyři hemolyziny (alfa, beta, gama a delta) a leukocidin. Z hemolyzinů jsou nejdůležitější první dva. Alfa-hemolyzin, nazývaný také alfa toxin, odpovídá za poškození tkáně, působí dermonekroticky a letálně. (1) Beta-hemolyzin se podílí na tvorbě abscesů. Gama-hemolyzin se uplatňuje u nemocných se stafylokokovou osteomyelitidou. Delta-hemolyzin je tvořen téměř všemi kmeny *S. aureus*. (1)

Pantonův-Valentinův leukocidin vytváří póry v membráně makrofágů a neutrofilů. Vytvoření pórů vede k lýze buněk. (1) Tímto způsobem se chrání stafylokoky před působením leukocytů a uplatňuje se patogeneze vážných až život ohrožujících infekcí. (1) (10)

Stafylokokové enterotoxiny jsou termostabilní molekuly, které odolávají i varu a trávícím enzymům. Bylo prokázáno, že *S. aureus* může produkovat 8 imunologicky odlišných enterotoxinů, nejvýznamnější jsou A–E. Vyvolávají otravy z potravin

projevující se průjmem a zvracením. (11) Enterotoxiny patří mezi tzv. superantigeny, mohou způsobit syndrom toxického šoku. (1) (11)

Toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) je také superantigenem. Způsobuje syndrom toxického šoku, který je charakteristický souborem příznaků, jako např. horečka, vyrážka, zvracení, průjem, bolesti svalů apod. (12)

Epidermolytické toxiny způsobují stafylokokový syndrom opárené kůže, který se projevuje olupováním velkých ploch pokožky. (1)

*S. aureus* je častým původcem hnisavých ran. Jedná se o povrchová zranění, operační rány nebo popáleniny. Ke vzniku hnisavých ran napomáhají cizí tělesa, která zůstanou v ráně. Z infikovaných míst se stafylokok dostane do mizních uzlin a z nich do krevního oběhu, což může vést k sepsi. (1)

Mezi další onemocnění, která způsobuje *S. aureus*, patří respirační onemocnění, jako je sinusitida, pneumonie, bronchopneumonie. Dále také způsobuje hnisavá onemocnění kůže tak zvané pyodermie a zánět kostní dřeně. (1)

Závažným stafylokokovým onemocněním je akutní stafylokoková endokarditida. Jedná se o zánětlivé onemocnění chlopni, které je nebezpečné. Na chlopních se tvoří tromby složené z mezibuněčné hmoty a stafylokoků. Tyto tromby se mohou uvolnit a v podobě embolu putují krevním řečištěm. Mohou být zaneseny do vzdálených orgánů a tam způsobit sekundární ložisko infekce. (13)

### 1.3 Laboratorní diagnostika

Diagnostika je založena na přímém průkazu, zejména kultivaci a mikroskopii. Základním klinickým materiálem je hnis z ložisek infekce. Dalšími vzorky jsou krev na hemokultivaci, sputum, aspiráty, exsudáty a moč. (1) (8)

Preparát pro mikroskopii se po fixaci obarví dle Grama. Hotový preparát se prohlíží imerzním objektivem světelného mikroskopu v celkovém zvětšení 1000x. V preparátu jsou vidět shluky modrofialových gram pozitivních koků. (14)

Kultivační průkaz stafylokoků je poměrně snadný, rostou na běžných neselektivních kultivačních půdách, jako je krevní agar. Vzorek se nanese na krevní agar a nechá se 24 hodin inkubovat v termostatu při teplotě 35–37 °C. Na neselektivních půdách vyrostou kolonie stafylokoků za 24 hodin do velikosti 1 až 3 mm. Tvoří

neprůhledné, na povrchu hladké kolonie s rovným okrajem, které jsou vždy pigmentované. (1) (8)

K zachycení stafylokoků v kontaminovaných vzorcích se doporučuje použít selektivní půdu. Jako selektivní půda se používá krevní agar s přídavkem 10% NaCl, Columbia agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou, agar s mannitolem a solí nebo agar s fenylethylalkoholem. Všechny kultivační selektivní půdy potlačují růst gram negativní flóry. (1) (8)

K identifikaci MRSA kmenů slouží speciální chromogenní půdy obohacené o vhodná antibiotika. (1) (8)

Koaguláza pozitivní stafylokoky se diagnostikují pomocí testu založeného na koagulaci králičí plazmy. Ke screeningu zkoumaných kolonií se využívá průkaz vázané koagulázy, tak zvaného clumping-faktoru. Na sklíčku se z narostlé kolonie připraví v kapce destilované vody homogenní suspenze, ke které se přidá kapka králičí nebo prasečí plazmy. Pokud vznikne do 10 sekund aglutinace, test je pozitivní. Pokud je test negativní, testuje se volná koaguláza zkumavkovým testem. (1) (8)

K identifikaci *S. aureus* se používá metoda založená na latexové aglutinaci, při které se detekuje přítomnost proteinu A a kapsulárních polysacharidů. Tato metoda je citlivější a specifitější než koagulázový test. K diagnostice se také používá dekapsulační test, kterým se prokazuje přítomnost hyaluronidázy. Jedná se o jednoduchý test sloužící k identifikaci za pomoci vzájemného působení testovaného kmene a kmene *Streptococcus equi*. Pokud testovaný stafylokok produkuje hyaluronidázu, ztrácí *S. equi* v jeho blízkosti pouzdro. To se projevuje půlkruhovitým bezhlenovitým růstem v okolním mukózním nárůstu *S. equi* (dekapsulace). Odečítá se po 18 – 24 hodinách kultivace. (1) (8)

## **1.4 Koaguláza negativní stafylokoky**

Mezi nejvýznamnější druhy patří *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus haemolyticus*.

### **1.4.1 Charakteristika**

Koaguláza negativní stafylokoky neobsahují povrchový protein. Jsou součástí přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka. V jiných lokalizacích a při snížené

obranyschopnosti, např. při infekcích krevního řečiště, se projevují jako patogeny. (1)  
V současné době je popsáno 46 druhů koaguláza negativních stafylokoků. (15)

#### 1.4.2 Patogenita

Koaguláza negativní stafylokoky jsou oportunní patogeny. (3) K infekci jsou náchylnější narkomani, kteří užívají drogy intravenózně, imunokompromitované osoby, novorozenci a osoby s implantovanými pomůckami. (1)

Osidlují a rostou na cizorodých površích v těle pacienta. (1) Více než 50 % všech infekcí katétrů způsobují koaguláza negativní stafylokoky. Tyto infekce jsou velkým problémem u kriticky nemocných pacientů, kteří mají dlouho zavedeny katétry, na kterých se tvoří biofilm. (16) U intravenózního katétru jsou tři možnosti, jak jej lze infikovat, a to z povrchu kůže, kontaminací vstupu do katétru a při bakteriémi. (1) K dalšímu způsobu kontaminace dochází při lékařském zákroku, a to z povrchu těla pacienta nebo z rukou lékaře. (3)

K dalším onemocněním, která koaguláza negativní stafylokoky způsobují, patří nozokomiální infekce, infekce cévního řečiště, operačních ran, kloubních protéz, endokarditidy a poměrně vážné osidlování umělých chlopní, meningitidy a sepse. *Staphylococcus saprophyticus* způsobuje záněty močových cest zejména u mladých žen, u starších osob pak tam, kde je dlouhodobě zaveden katétr. (1) (3) (17)

Mezi faktory virulence u *Staphylococcus epidermidis* patří peptidoglykan a receptor pro transferin. Jako adheziny slouží kapsulární polysacharid-adhezin, kyselina teichoová, povrchové proteiny, fibrinogen vázající protein a autolyzin. *S. saprophyticus* povrchovými strukturami adhezuje na epitel močových cest. (1)

Dalších faktor virulence koaguláza negativních stafylokoků je schopnost tvorby biofilmu, který vzniká díky jejich schopnosti adherovat na cizorodé povrchy. Adherované stafylokoky začínou vytvářet kolonie a slizový extracelulární matrix. Sliz působí degranulačně na neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. Tím je potlačena jejich schopnost fagocytózy a schopnost zabít bakterie. Biofilm tvoří prostředí, které chrání bakterie vůči vyšším teplotám, vysychání, působení antibakteriálních látek a dezinfekčních prostředků. (18)

### 1.4.3 Laboratorní diagnostika

Mikroskopem nelze od sebe odlišit jednotlivé koaguláza negativní stafylokoky. (1)  
Průkaz koaguláza negativních stafylokoků pomocí kultivace je snadný. Kultivují se na běžných kultivačních půdách, jako je krevní agar. Vyhodnocení pozitivního výsledku je složitější. Většina koaguláza negativních stafylokoků tvoří bílé kolonie. Izolovaný kmen z hemokultury může být původcem sepse nebo může jít o patogen z kontaminované kůže. Proto se krev na hemokulturu odebírá po vydezinfikování místa vpichu jódovým preparátem. (1) (8)

Identifikace druhů koaguláza negativních stafylokoků je založena na citlivosti k novobiocinu a různých biochemických znacích, mezi které patří štěpení sacharózy, xylózy, močoviny, ornitinu, tvorba acetoinu. Důležité je také sledování rezistence na antibiotika. (1) (8)

K identifikaci koaguláza negativních stafylokoků se používají fenotypové testy, které jsou dostupné v podobě komerčních setů. Vyhodnocení se uskutečňuje pomocí počítačového programu. (15) Dalším způsobem identifikace koaguláza negativních stafylokoků je systém ORIDES (orientační identifikace stafylokoků). ORIDES je schéma, podle kterého se identifikuje 20 nejčastějších druhů koaguláza negativních stafylokoků. Schéma je založené na charakteristických fenotypových vlastnostech. Stafylokoky se nejprve rozdělí do dvou skupin podle toho, zda jsou rezistentní k novobiocinu či nikoliv. U rezistentních se dále zjišťuje produkce oxidázy a u citlivých na novobiocin produkce ureázy. Podle toho, zda produkují či neprodukují oxidázu nebo ureázu, se rozdělí do skupin. Následně se stafylokoky určují pomocí komerčního kitu. (15)

Velkým přínosem v identifikaci jsou také moderní metody jako např. hmotnostní spektrometrie. (8)



## 2 Rod *Streptococcus*

Mezi nejvýznamnější streptokoky patří *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus pneumoniae*.

### 2.1 Charakteristika

Streptokoky jsou fakultativně anaerobní gram pozitivní bakterie. Jejich velikost se pohybuje mezi 0,5–1,2  $\mu\text{m}$ . Tvoří dvojice a řetízky, jsou nepohyblivé, nevytvářejí spory a neprodukují katalázu. (19)

Streptokoky se dělí do sérologických skupin A–Z (dle Lancefieldové), a to podle složení polysacharidové substance C v buněčné stěně, která určuje antigenní specifitu. *Streptococcus pneumoniae* a mnoho dalších streptokoků tento antigen nemá. Pouzdro z kyseliny hyaluronové vytvářejí streptokoky s antigeny A, C a G. Polysacharidová pouzdra syntetizují *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus pneumoniae*. (19)

Streptokoky jsou náročné na kultivační podmínky. Většina až na výjimky neroste při 10 °C ani při 45 °C. Také nerostou na půdách obsahujících 6,5 % NaCl nebo 40 % žlučových solí ani při pH vyšším než 9. (19)

Streptokoky jsou citlivé na antibiotikum vankomycin. Mnoho z nich hemolyzuje na krevním agaru. (1) Podle hemolýzy se dělí na alfa-hemolytické, beta-hemolytické a gama-hemolytické. K alfa-hemolytickým neboli viridujícím streptokokům se řadí *S. pneumoniae*. Mezi beta-hemolytické patří *S. pyogenes* a *S. agalactiae*. Gama-hemolytické streptokoky, které nevytvářejí hemolýzu, jsou např. ústní streptokoky. (19)

### 2.2 Zdravotnický významné druhy

#### 2.2.1 *Streptococcus pyogenes*

*S. pyogenes* je mikroorganismus tvořící dvojice a řetízky. Patří k nejvíce patogenním druhům streptokoků. (1) Primárně je patogenní pro člověka, jenž je také zdrojem nákazy. Vyskytuje se na celém světě. Vyvolává onemocnění především dýchacího traktu a kůže, může způsobovat i celková vážná onemocnění. (1) (3)

### 2.2.1.1 Charakteristika

Patří mezi nejdéle známé patogenní mikroorganismy. Velikost *S. pyogenes* se pohybuje v rozmezí 0,6–1,0  $\mu\text{m}$ . Jako většina streptokoků je kataláza i oxidáza negativní a fakultativně anaerobní. Produktem jeho metabolismu je kyselina mléčná. Je obalen pouzdrmem složeným z kyseliny hyaluronové. Buněčná stěna obsahuje polysacharid C, který řadí *S. pyogenes* do skupiny A podle Lancefieldové. Proteiny M a T jsou významné povrchové bílkovinné antigeny. M-protein je vláknitá struktura, která vyčnívá ze stěny bakterie a je hlavním antigenem. (1) (20)

Imunitní ochranu proti streptokokovým nákazám zprostředkovávají protilátky proti M-proteinu. Protilátka IgA brání adhezenci a kolonizaci streptokoků na epitelie a sliznice. Protilátka IgG brání streptokokům pronikat do tkání a množit se v krvi. (1)

### 2.2.1.2 Patogenita

*S. pyogenes* způsobuje hnisavé infekce, invazivní až toxické onemocnění a je příčinou pozdních následků těchto onemocnění. Nejčastějším onemocněním je akutní angina (tonsilofaryngitida). Nejvíce se vyskytuje u dětí školního věku. Jestliže streptokok produkuje pyrogenní exotoxiny, vyvolá onemocnění spálu (scarlatina). Další onemocnění způsobené streptokokem je pyodermie, vysoce nakažlivá kožní infekce, která se nejvíce vyskytuje v létě. Závažná povrchová infekce kůže, vyskytující se převážně u malých dětí, se nazývá impetigo. Projevuje se hnisavými puchýřky. Při narušení pokožky mohou streptokoky proniknout hlouběji a způsobit ohraničený rudě zbarvený zánět, který se nazývá růže (erysipelas). Vyskytuje se především na dolních končetinách. Hnisavá streptokoková infekce se může rozšířit do mízních uzlin a způsobit jejich zánět, lymphangoitis. *S. pyogenes* může také vyvolat pneumonii nebo meningitidu. U komplikovaných streptokokových infekcí hrozí vznik sepse. (1) (20)

Mnoho kmenů tvoří streptokokové pyrogenní exotoxiny, které způsobují syndrom streptokokového toxického šoku. Toxický šok je těžké onemocnění projevující se vysokými teplotami, hypotenzí a kožní vyrážkou. Vyskytuje se jako možná komplikace při streptokokové infekci měkkých tkání. K rizikovým faktorům vzniku toxického šoku u streptokokových onemocnění patří snížená obranyschopnost a porušení kůže. Rizika sebou nesou i chirurgické výkony, porod, virová onemocnění, která naruší celistvost kůže a sliznice. (21)

Streptokoková onemocnění způsobená *S. pyogenes* mohou být komplikována tzv. pozdními následky. Mezi pozdní následky streptokokových infekcí patří revmatická horečka a akutní glomerulonefritida. Onemocnění jsou vyvolána reakcí imunitního systému na některé buňky lidského těla, které mají povrchovou strukturu podobnou streptokokovým bílkovinám. Imunitní systém si spletě lidské buňky se streptokoky a začne je likvidovat. Ke vzniku těchto onemocnění přispívá vliv prostředí a genetická dispozice. (1) (22). Tyto projevy patří mezi zánětlivá autoimunitní onemocnění. Nemoc vzniká nejčastěji dva týdny po prodělané streptokokové tonsilofaryngitidě. Při revmatické horečce je nejvíce náchylné k poškození srdce a zvláště buňky chlopní, jejichž poškození vyústí v chlopenní vady. Rvmatická horečka se také projevuje jako onemocnění kloubů, centrálního nervového systému a kůže. (22) Akutní glomerulonefritida je zánětlivé onemocnění glomerulů, vnikající 2 týdny po prodělané tonsilofaryngitidě nebo 4 týdny po pyodermii. Mezi příznaky akutní glomerulonefritidy patří otoky očních víček, bledost, hypertenze oligurie. (23)

Hlavním faktorem virulence je M-protein, který působí antifagocytárně a adherentně. M-protein pomáhá streptokokům přilnout na sliznici a kůži, pronikat do nitra buněk a tkání a potlačovat alternativní dráhu aktivace komplementu. Kmeny více obohacené M-proteinem odolávají fagocytóze a nitrobuněčnému usmrcení uvnitř leukocytů. Dalším důležitým faktorem virulence je pouzdro z kyseliny hyaluronové, které brání opsonizaci a přístupu fagocytů k opsoninům na povrchu streptokoka. (1) (20)

Hemolyziny jsou nejznámější extracelulární faktory virulence. Patří mezi ně streptolyzin O a streptolyzin S. Streptolyzin O je oxygenlabilní a toxický pro leukocyty, monocyty, erytrocyty a trombocyty a je také kardiotoxický. Průkaz protilátek proti streptolyzinu O (antistreptolyzin O neboli ASLO) se používá k určení diagnózy nedávno prodělané streptokokové infekce a jejích následků. Streptolyzin S je oxygenstabilní, není antigenní a poškozuje buněčné organely. Je zodpovědný za usmrcení leukocytů, které fagocytovaly pyogenní streptokoky. Mezi další enzymy, které napomáhají proniknout streptokokům do tkání, patří streptokináza, enoláza a hyaluronidáza. (1) (20)

### **2.2.2 *Streptococcus agalactiae***

*S. agalactiae* patří k beta-hemolytickým streptokokům skupiny B, do které se řadí podle svého skupinového stěnového polysacharidového antigenu. (3)

### 2.2.2.1 Charakteristika

Velikost *S. agalactiae* se pohybuje v rozmezí 0,6 až 1,2  $\mu\text{m}$ . (16) Pod mikroskopem se neliší od jiných beta-hemolytických streptokoků. V tekutých médiích jeho dlouhé řetízky někdy vypadají, jako by byly složené z dvojic koků. (1)

Řadí se do streptokokové skupiny B podle Lancefieldové. Kromě skupinově specifického antigenu B, nacházejícího se ve stěně, obsahuje *S. agalactiae* i typově specifické polysacharidové antigeny. Podle antigenních vlastností pouzdra a podle povrchových antigenů se rozlišuje 10 antigenních typů. *S. agalactiae* se často vyskytuje v horních cestách dýchacích, zažívacím traktu a vagíně, ovšem bez příznaků a onemocnění. (20).

### 2.2.2.2 Patogenita

*S. agalactiae* je jedním z nejdůležitějších původců novorozeneckých meningitid, sepsí, pneumonií a osteomyelitid. Vyskytuje se ve dvou formách – časně a pozdní infekce. (20)

Ke vzniku časně infekce dochází během porodu při předčasném odtoku plodové vody, aspirací nebo polknutím plodové vody nebo při průchodu porodními cestami. (20) K časným infekcím patří bakteriémie, pneumonie, meningitida a septický šok. U těchto onemocnění je 5% mortalita. Více ohroženi jsou nezralí novorozenci. Příznaky onemocnění se projeví během hodin až dní po narození. (1)

Pozdní infekce jsou vyvolány sérotypem III, který je nejdůležitějším sérotypem pro člověka a ve větší míře se vyskytuje u novorozenců. Dítě se v polovině případů nakazí až po porodu. Zdrojem nákazy může být matka, jiný novorozenec nebo nozokomiální kontaminace. Infekce se projeví koncem prvního měsíce života. Mortalita nakažených dětí je přes 10 %. (1) (20) (24)

U čtvrtiny těhotných žen streptokoky skupiny B kolonizují střevo a vagínu a v polovině případů se při porodu mohou přenést na novorozence, z nichž asi 2 % onemocní. Jako preventivní opatření se všem rodičkám, u kterých byl při prenatálním vyšetření zjištěn výskyt *S. agalactiae*, podávají během porodu antibiotika. Antibiotika se podávají také všem rodičkám, kterým otekla plodová voda více než 12 hodin před porodem, i když se během těhotenství u nich *S. agalactiae* nevyskytoval. (20) (25) (24)

*Streptococcus agalactiae* je původce komplikací v šestinedělí. Způsobuje bakteriémii po císařském řezu, endokarditidu, meningitidu, endometritidu, abscesy

a infekce močových cest. Další onemocnění souvisí s oslabenou imunitou. Mezi ně patří pneumonie, endokarditidy, hnisavé artritidy a infekce ran. (1) Muži a ženy trpící diabetes mellitus, rakovinou nebo alkoholismem, jsou vystaveni většímu riziku onemocnění. (16)

### **2.2.3 *Streptococcus pneumoniae***

*S. pneumoniae*, známý také jako pneumokok, je hlavní původce komunitního zánětu plic. (1)

#### **2.2.3.1 Charakteristika**

*S. pneumoniae* je gram pozitivní opouzdřený kok ovoidního tvaru vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích, v krátkých řetězcích složených ze dvou koků odlišné velikosti od 0,5 do 1,25  $\mu\text{m}$ . (1) Bakteriální pouzdro obklopuje celou dvojici koků. (3) Odvrácené strany dvojice koků jsou špičaté. Tento tvar se nazývá lancetovitý. (1)

Na obohacených a vlhkých půdách pneumokok vyrůstá v hlenovité bezbarvé kolonie nepravidelného tvaru připomínající kapky oleje. Kolonie vyrostlé za přístupu kyslíku jsou obklopeny širokou zónou alfa-hemolýzy. (1)

Nejdůležitější antigen pneumokoka je pouzderý polysacharid. Podle jeho antigenní struktury se rozeznává 90 sérotypů *S. pneumoniae*. Mezi další antigeny patří F-antigen, obsahující kyselinu lipoteichoovou a cholin, a C-polysacharid. S polysacharidem C reaguje důležitá substance akutní fáze zánětu, C-reaktivní protein. (1)

#### **2.2.3.2 Patogenita**

Pneumokoky jsou přítomny v nosohltanu nejméně u 10 % zdravých dospělých. Pneumokokové nákazy patří k nejčastějším v lidské populaci. Mají různé příznaky od lehkých respiračních onemocnění až po pneumonie. (26) Pneumokoková pneumonie vzniká jako následek porušení obranyschopnosti dýchacího traktu. Obranyschopnost může být narušena během celkové anestezie, po podání morfia, při prochlazení, po předchozí virové infekci. Při pneumokokové pneumonii většinou vzniká bakteriémie, krví se mohou pneumokoky zanést do mozkových plen, na srdeční chlopně a do kloubů. Jako obrana proti pneumokokům působí fagocytóza a opsonizace, která tvoří opsonizační protilátky IgG namířené proti specifickým antigenům pouzdra. (1)

*S. pneumoniae* je také nejčastějším původcem akutních sinusitid všech věkových skupin. (27) Dále mezi nemoci způsobené *S. pneumoniae* patří purulentní meningitidy, akutní zánět středního ucha, po virové infekci také např. akutní endokarditida. (1)

Faktory virulence pneumokoka jsou většinou faktory invazivity. Hlavním faktorem virulence je polysacharidové pouzdro chránící před fagocytózou. Dalšími faktory virulence jsou pneumokokový adhezín A, pneumokokový povrchový protein C odpovídající za nosičství a cholin vázající protein A. Průniku do plic a krevního oběhu pomáhají invaziny (hyaluronidáza, neuraminidáza a pneumokokový povrchový protein). (1)

#### 2.2.4 Streptokoky Milleri group

Skupina streptokoků označována jako Milleri group zahrnuje tři druhy: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* a *Streptococcus constellatus*. Existují ve formě alfa i beta-hemolytické. U některých je možné nalézt jeden ze skupinových antigenů F, C, G, nebo A. Vyskytují se v horních dýchacích cestách, gastrointestinálním traktu a ve vagině jako komenzálové. Mohou způsobovat závažné infekce, např. abscesy jater a mozku. (1)

### 2.3 Laboratorní diagnostika

Nejprůkaznější metodou výskytu beta-hemolytických streptokoků v krku je přímý průkaz, tedy naočkování výtěru na krevní agar. Roztěr se doplní stafylokokovou čarou pro zachycení dalších původců angín. Patogen se kultivuje za vyššího tlaku CO<sub>2</sub>. Odečítá se za 18 hodin a za 48 hodin. (1) (8)

Streptokoky skupiny A se určují pomocí latexové aglutinace a PYR-testu. PYR test určuje aktivitu enzymu pyrrolidonyl peptidázy produkovaného *Streptococcus pyogenes*. Pro detekci tohoto enzymu slouží substrát L-pyrrolidonyl-β-naftylamid. Kolonie se otiskne na papírek se substrátem a pokape se příslušným reagens. Pokud je vzorek pozitivní, zčervená. (8) (28)

Streptokoky se také diagnostikují z odebraného výtěru prokázáním antigenu skupiny A. Tento test je spolehlivý při velkém množství streptokoků. (8)

*S. agalactiae* se prokazuje latexovým testem nebo CAMP-testem. Latexovým testem se prokáže přítomnost antigenu B. (1) Princip CAMP-testu je založen na produkci hemolyzinu tzv. CAMP faktoru druhem *S. agalactiae*, který se váže

na erythrocyty. Pokud se setká s beta-hemolyzinem *S. aureus*, dojde k potenciaci hemolýzy a vzniku hemolýzy úplné. Hemolyziny se musí navázat na erythrocyty ve správném pořadí. Na krevním agaru zkříží čára *S. aureus* s čarou beta-hemolytického streptokoka. Tvar vzniklé zóny hemolýzy vytváří obraz motýlích křídel. (29) (30)

Pro screening těhotných a rodiček se *S. agalactiae* kultivuje na selektivně-diagnostických půdách. Například na půdách s přídavkem škrobu vznikají oranžově zabarvené kolonie. (8)

*S. pneumoniae* se prokazuje mikroskopicky přímo z odebraného vzorku po obarvení podle Grama a kultivačně. Při zánětu plic se vyšetřuje krev na hemokulturu. Vyšetřují se 3 hemokultury po 10 ml, které jsou odebrané v půlhodinových intervalech. Krev musí být odebraná asepticky. (1) (8)

*S. pneumoniae* se určuje také optochinovým testem, latexovým testem a testem rozpustnosti ve žluči. Při optochinovém testu pneumokoky okolo disku s optochinem vytvářejí zónu s minimálně 15 mm inhibice. Při testu rozpustnosti ve žluči se kolonie posypou práškovou žlučí nebo pokapou 10% dezoxycholátem sodným. Pokud se jedná o pneumokoky, kolonie se rozpustí. Testem latexové aglutinace se prokazuje např. antigen v likvoru. (1) (8)

### 3 Rod *Enterococcus*

Mezi nejvýznamnější enterokoky patří *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*.

#### 3.1 Charakteristika

Enterokoky jsou gram pozitivní, fakultativně anaerobní, kataláza negativní koky. Jejich tvar je oválný až lehce protáhlý. Jsou uspořádané ve dvojících nebo v krátkých řetězcích. (24)

Enterokoky jsou nenáročné na kultivaci. Rostou v drobných šedobílých koloniích o velikosti 1–3 mm na krevním agaru, v širokém rozmezí teplot 25–45°C, o pH 4,8–11, na půdách obsahujících až 6,5 % chloridu sodného a 40 % žlučových solí. (1)

Enterokoky mají skupinový antigen D, kterým je kyselina glycerol-teichoová navázaná na buněčnou stěnu. (1)

#### 3.2 Patogenita

Enterokoky jsou součástí přirozené střevní mikroflóry a řadí se mezi vážné podmíněné patogeny. Způsobují endogenní i exogenní infekce a často i nozokomiální. Infekce způsobené enterokoky se často vyskytují u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů, kteří mají močový nebo intravaskulární katétr, a také u pacientů léčených širokospektrými antibiotiky, cefalosporiny a aminoglykosidy. (1) (20)

Enterokoky jsou původci infekcí močových cest, způsobují infekce ran a nitrobuněčné záněty. U pacientů se srdečními chorobami a náhradními chlopněmi způsobují endokarditidu s vysokou mortalitou. Dále způsobují bakteriémii, katéetrové enterokokové sepse, infekce žlučových cest a gynekologické záněty a u pacientů s traumatickým nebo nádorovým onemocněním CNS meningitidy. (1) (20)

Enterokoky nemají tak širokou škálu faktorů virulence jako stafylokoky a streptokoky. (16) Netvoří toxin, jako faktory virulence uplatňují secerenované produkty jako je želatináza a substance feromonu. Želatináza hydrolyzuje kolagen a substance feromonu reguluje zánětlivou odpověď. Dále se uplatňují kolonizační faktory a sacharidové adheziny. (1) Virulence má dvě podoby, a to přilnavost ke tkáním s tvorbou biofilmu a rezistenci vůči antibiotikům. Z toho vyplývá, že některé jejich varianty jsou rezistentní vůči antibiotikům, což způsobuje vážný problém především



u hospitalizovaných pacientů. (16) Rezistence enterokoků na vankomycin je spojena s geny *VanA*, *VanB* a *VanC*. Gen *VanC* je gen přirozené rezistence na vankomycin některých druhů enterokoků a není přenosný. Geny *VanA* a *VanB* lze přenést plazmidy. Enterokoky, které byly původně citlivé na antibiotika, mohou přenosem těchto genů získat rezistenci. Enterokoky jsou také rezistentní k cefalosporinům I., II. a III. generace. (24)

### 3.3 Laboratorní diagnostika

Diagnostika je založena na přímém průkazu, mikroskopii a kultivaci. Enterokoky se kultivují na krevním agaru a na agaru pro enterokoky. (8) Jsou kultivačně nenáročné. Na krevním agaru vytvářejí kolonie po 24h kultivaci při 35–37 °C. (19) Slanetzův-Bartleyho agar pro enterokoky je selektivně diagnostická půda obsahující azid sodný, tetrazolium a glukózu. Enterokoky na ní tvoří růžové kolonie. (8) Azid sodný potlačuje růst gram negativních bakterií a tetrazolium enterokoky redukuje na červený formazan, díky kterému jsou kolonie růžové. (19) Na podobné půdě, která obsahuje 40 % žluči a eskulin, rostou v černo-hnědých koloniích majících kolem sebe tmavomodrý dvorec. (8) Další diagnostickou půdou enterokoků je Edwardův agar. (19)

Další diagnostická a identifikační metoda se provádí pomocí latexové aglutinace. Tímto testem se prokáže u zkoumaného kmene přítomnost skupinově specifického antigenu D, díky kterému se dají odlišit enterokoky a streptokoky. (1) (8) Antigen D může být přítomen i u jiných rodů a to *Pediococcus* a *Leuconostoc*. Od těchto bakterií enterokoky lze odlišit PYR-testem čili průkazem pyrázy a LAP-testem tj. průkazem leucinaminopeptidázy. (1) (8)

K bližšímu určení druhu se používají fenotypické testy, například tvorba žlutého pigmentu, a biochemické testy. K biochemickým testům patří štěpení arabinózy a pyruvátu. Těmito testy se dají od sebe odlišit *E. faecalis* a *E. faecium*. *E. faecalis* má pozitivní pyruvát a nekvasí arabinózu a *E. faecium* má negativní pyruvát a kvasí arabinózu. (1) (8)

## 4 Rezistence vůči antibiotikům

Rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům znamená odolnost mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Rozděluje se na primární a sekundární. Primární rezistence je geneticky podmíněná. Sekundární vzniká jako důsledek mutací v průběhu léčby antibiotiky nebo po předchozím podávání antibiotika. (31)

Kvůli narůstající rezistenci bakterií vůči antibiotikům je ohrožena účinnost antibiotik. Antibiotická rezistence stoupá kvůli vyšší spotřebě antibiotik a také pro jejich zbytečná nebo nevhodná používání. (32)

V současné době se zvyšuje význam gram pozitivních bakterií, především stafylokoků a enterokoků, u hospitalizovaných pacientů jakožto původců infekcí. Tento trend je následkem užívání širokospektrých antibiotik například cefalosporinů. Mezi významné rezistentní kmeny patří methilcilin-rezistentní stafylokoky a vankomycin-rezistentní enterokoky. Tyto kmeny mohou být příčinou selhání antibiotické léčby a s tím související vyšší nemocností a úmrtností. (33)

### 4.1 MRSA Methilcilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

MRSA je zkratka pro Methilcilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Toto označení se používá pro kmeny *S. aureus*, které jsou rezistentní vůči antibiotiku methicilinu. MRSA je rezistentní nejen proti methicilinu, ale i proti všem beta-laktamovým antibiotikům. (34)

Syntézu buněčné stěny zprostředkovávají proteiny umístěné v cytoplazmatické membráně. Jedním z proteinů je penicillin binding proteins (PBP2). V přítomnosti beta-laktamových antibiotik protein PBP2 nesyntetizuje správně buněčnou stěnu, ta je v důsledku toho narušená a mikroby se rozpadají. MRSA obsahuje pozměněný protein PBP2a kódovaný genem *mecA*, který je zodpovědný za rezistenci. PBP2a má nízkou afinitu k beta-laktamovým antibiotikům, tudíž se v jeho přítomnosti může buněčná stěna syntetizovat a mikroby nezaniknou. (34)

Zvýšením užíváním širokospektrých antibiotik se stávají některé kmeny rezistentními. Tyto kmeny pak způsobují nozokomiální infekce. MRSA mohou být příčinou systémové infekce se septickými komplikacemi, infekce měkkých tkání, kostí a implantátů. Mohou se také vyskytovat jako komenzálové nebo mohou kolonizovat kůži a sliznici. Při nálezů MRSA nemusí být vždy zahájena antibiotická léčba. (34)

Při zahájení antibiotické léčby se onemocnění způsobená kmeny citlivými k methicilinu (MRSA) v České republice léčí oxacilinem, což je obdoba methicilinu. (34) (35)

#### **4.2 VRSA Vancomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus***

VRSA je zkratka pro vancomycin-rezistentní *S. aureus*. První vancomycin rezistentní *S. aureus* byl objeven v roce 2002. (36)

Některé kmeny MRSA získaly také rezistenci vůči vancomycinu VRSA, a to představuje nové nebezpečí. Tyto kmeny se vyskytují jako důsledek vysoké spotřeby glykopeptidů. (37)

Důvodem rezistence je přítomnost genu *vanA*, který je získán od enterokoků. (1)

#### **4.3 VRE Vancomycin-rezistentní *Enterococcus* sp.**

VRE je zkratka pro Vancomycin-rezistentní *Enterococcus*. Enterokoky neprodukují betalaktamázu, proto není potřeba používat antibiotika blokující betalaktamázu.

Vancomycin rezistentní enterokoky VRE jsou jedny z nejrozšířenějších komenzálů lidí a zvířat, proto je jejich asymptomatická kolonizace střeva běžná. Vancomycin rezistentní enterokoky se díky své schopnosti vyměnit genetický materiál stávají rezervoárem a přenašečem *van* genu vancomycinové rezistence. Determinanty přirozené rezistence jsou kódované na chromozómech. Determinanty získané rezistence jsou umístěné na plasmidech a transpozónech, to umožňuje horizontální výměnu. Získaná rezistence je přenosná na jiné enterokoky. (38)

#### **4.4 Indukované rezistence ke klindamycinu**

Klindamycin se řadí do skupiny  $MLS_B$  antibiotik, mezi něž patří makrolidy, streptograminy skupiny B a linkosamidy. Tato antibiotika působí na gram pozitivní koky. Za rezistenci zodpovídají geny značené jako *erm* geny. *Erm* geny způsobují produkci ribozomální metylázy, která přizpůsobuje místo účinku  $MLS_B$  antibiotik. (39)

Rezistence je buď konstitutivní způsobená genem *ermB*, nebo indukovaná, kterou ovlivňují geny *ermA* a *ermC*. K určení indukované rezistence se používá D-test. Test je difúzní diskový test. Při testování musí být vedle sebe umístěné disky s klindamycinem a erytromycinem, jejichž vzájemná vzdálenost se pohybuje v rozmezí 12–20 milimetrů. Po 20hodinové inkubaci při 35 °C se odečtou inhibiční zóny.

Vyšetřovaný kmen je k antibiotikům rezistentní, pokud jsou jeho inhibiční zóny menší než 22 milimetrů. Pokud se kolem klindamycinu vytvoří deformované inhibiční zóny v oblasti, která sousedí s erytromycinem, jedná se o indukovanou rezistenci k antibiotikům MLS<sub>B</sub>. (39)

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## **5 Cíle práce**

1. Přehled a charakteristika zdravotnicky významných gram pozitivních koků.
2. Základní charakteristiky jejich patogenity a virulence.
3. V praktické části analýza výskytu gram pozitivních koků u klinicky závažných (invazivních) onemocnění izolovaných z krve a mozkomíšního moku za dané období.

## **6 Vyšetřovaný soubor**

Vyšetřovaný soubor obsahoval celkem 1274 vzorků ze všech oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Vzorky byly sbírány a vyšetřovány od 1. do 30. listopadu 2016.

Sledovány byly vzorky klinického materiálu vyšetřované v souvislosti s diagnostikou klinicky velmi závažných stavů – invazivních onemocnění tj. sepsí a meningitid. Jednalo se o krev – hemokultury a mozkomíšní mok.

Novák (2002) uvádí: „Invazivní bakteriální onemocnění vyvolaná uvedenými bakteriemi jsou charakterizována tím, že za několik hodin od počátku onemocnění mohou být kriticky ohroženy základní životní funkce nemocného. Bakterie mohou být nalezeny v krvi nebo v mozkomíšním moku nemocných.“ (40)

### **6.1 Krev**

Vyšetření vzorku krve se provádí hemokultivací. Používá se pro průkaz mikroorganismu v krvi pacienta v případě, kdy diagnóza už je známá nebo napomáhá při diagnostice nejasných hořečnatých stavů.

K hemokultivaci sloužila odběrová souprava složená z 2 až 3 hemokultivačních lahviček s různými kultivačními medii. Pro zachycení mikroorganismů s odlišnými nároky na kultivační prostředí byly použity tři druhy kultivačních pūd v odběrových lahvičkách – aerobní, anaerobní a mykologická. Místo venepunkce bylo vydezinfikováno 70% alkoholem a následně Betadinem. Gumové zátky lahviček se rovněž vydezinfikovaly 70% alkoholem. Následně bylo odebráno 8 až 10 ml krve do každé lahvičky. Krev na hemokultivaci byla odebrána z žíly nebo z katétru.

### **6.2 Likvor**

Likvor neboli mozkomíšní mok se používá pro diagnostiku meningitidy. Při odběru pacient leží na boku. Vzorek se odebírá lumbální punkcí z páteře, přesněji z meziobratlového prostoru mezi 3. a 4. bederním obratlem. Výsledek vyšetření může být také negativně ovlivněn nedodržením preanalytických podmínek nebo předchozí antibiotickou léčbou.

Vzorek likvoru se odebíral do sterilní zkumavky a v indikovaných případech současně i do lahvičky obsahující aerobní pūd pro hemokultivaci.

## 7 Metodika

### 7.1 Hemokultivace

Naočkovaná hemokultura byla po přijetí do laboratoře vložena do automatizovaného kultivačního systému, který slouží zároveň jako termostat ke kultivaci vzorku. Použitý hemokultivační systém byl BACTEC<sup>®</sup>9240 Fluorescenční systém (Becton Dickinson) s hemokultivačními lahvičkami pro aerobní kultivaci BD BACTEC<sup>™</sup> Plus Aerobic/F\* Culture Vials, pro anaerobní kultivaci BACTEC<sup>™</sup> Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials a/nebo pro kultivaci mykologickou BD BACTEC<sup>™</sup> Mycosis-IC/F Culture Vials (Becton Dickinson). Délka kultivace byla 5 dní, u mykologických lahviček 10 dní. Během kultivace byly lahvičky automaticky pravidelně promíchávány a současně se měřila intenzita fluorescenčního záření, kterou vydává senzor umístěn na dně lahvičky. Přístroj detekoval zvýšení množství CO<sub>2</sub> a spotřebu kyslíku během růstu bakterií. Naměřené hodnoty byly porovnávány s předem zadanými hodnotami pozitivitu. Pokud vzorek dosáhl této hodnoty, přístroj ho označil za pozitivní.

#### 7.1.1 Pozitivní výsledek hemokultivace

Analyzátozem pozitivně označené lahvičky se vyočkovaly na kultivační půdy – krevní agar – Columbia CNA + 5% ovčí krve (DULAB), Endovu půdu (bioMérieux CZ) a event. na Sabouraudův agar –Sabouraud Gentamicin chloramphenicol (bioMérieux CZ). Z každé lahvičky se také vytvořil mikroskopický preparát obarvený podle Grama.

Po zhodnocení mikroskopického preparátu a zjištění kategorie bakterií (gram pozitivní nebo gram negativní, koky nebo tyčinky) se provedl test citlivosti na antibiotika. Následující den lékař zhodnotil kultivaci, test citlivosti na antibiotika a z narostlé kolonie identifikoval mikroorganismus.

#### 7.1.2 Rozdílnost výsledků hemokultivace (zdánlivá pozitivita)

Některé hemokultivační lahvičky analyzátor označil za pozitivní, ale kultivace a vyšetření mikroskopem byly negativní. V tomto případě byly hemokultivační lahvičky znovu vloženy do analyzátoru na dalších 5 dní.



Po kultivaci byly vzorky v hlavičkách naočkovány na pevné kultivační půdy a také byl znovu vyroben mikroskopický preparát. V případě pozitivního nálezu byl mikroorganismus identifikován a stanovila se citlivost na antibiotika.

Hemokultivační lahvičky, které analyzátor označil jako negativní, se zapsaly do laboratorního informačního systému. Lahvičky se následně zlikvidovaly do odpadu.

## 7.2 Likvor

Základním principem vyšetření likvoru je kultivační průkaz na pevných a tekutých médiích. Kultivace probíhá v aerobním prostředí a v prostředí s 5-10% oxidu uhličitého v termostatu při teplotě  $35^{\pm} 2$  °C.

U vyšetření likvoru se vždy dělá mikroskopické i kultivační vyšetření. Mikroskopický preparát se obarví dle Grama.

Vzorek likvoru se centrifugoval 5–10 minut při 4000 otáčkách za minutu, pokud bylo vzorku méně než 1 ml, centrifugace neproběhla. Poté se odsál supernatant a sediment ve zkumavce se použil na kultivační vyšetření a zhotovení mikroskopického preparátu. Na krevní agar, čokoládový agar–Chocolat-Agar Poly Vitex (bioMérieux CZ), Endův agar a do pomnožovací tekuté půdy– BHI bujón Brain Heart Infusion (OXOID CZ) se pipetou nanesly dvě kapky sedimentu a sterilní kličkou se rozočkovaly po celé půdě. Následně se na krevní agar přes naočkované čáry naočkovala čára *Staphylococcus aureus* pro záchyt satelitních bakterií. Poté se naočkované půdy kultivovaly. Kultivace na krevním a čokoládovém agaru probíhala v termostatu za přítomnosti 5–10% oxidu uhličitého při teplotě  $35^{\pm} 2$  °C 24–72 hodin, kultivace na Endově agaru v termostatu při teplotě  $35^{\pm} 2$  °C 24–72 hodin.

Vyrostlé kolonie na kultivačních půdách se zhodnotily makroskopicky, provedla se identifikace mikroorganismů a udělal se test citlivosti na antibiotika.

## 7.3 Identifikace bakterií

Zachycený izolát se identifikoval do rodu a druhu. Stupeň identifikace záležel na konkrétní situaci, jako je typ pacienta, materiál, klinický stav, oddělení, na němž je pacient hospitalizován, a také na odečítajícím lékaři, který se ve svém rozhodnutí opíral o dané situace.

Při identifikaci se pracovalo s kolonií z pevné kultivační půdy, jako je krevní agar a Endova půda. V některých případech se pracovalo i s koloniemi narostlými na selektivních půdách.

## **7.4 Identifikace gram pozitivních koků**

### **7.4.1 Metody**

O metodě identifikace bakterie (v případě mojí práce gram pozitivních koků) rozhodl klinický mikrobiolog na základě druhu materiálu, stavu pacienta, druhu diagnózy a oddělení, na němž byl pacient hospitalizován. Největší prioritu na identifikaci za pomoci všech dostupných metod měly právě izoláty z hemokultur a mozkomíšního moku.

Metody použité k identifikaci bakteriálního kmene:

- a) Makroskopie – hodnotil se vzhled, barva, velikost a tvar kolonií na běžných kultivačních půdách a přítomnost hemolýzy na půdách s krví.
- b) Mikroskopie – při mikroskopii se hodnotilo zbarvení podle Grama a hodnotila se velikost a uspořádání například do shluků, řetízků nebo dvojic.
- c) Růstové požadavky – posuzovala se schopnost růstu za různých kultivačních podmínek, většinou se jednalo o atmosféru a teplotu.
- d) Orientační a pomocné testy – použity byly testy plazma-koaguláza, PYR test, CAMP test, dekapulační test, satelitismus.
- e) Komerční sety – s biochemickými testy pro jednotlivé skupiny mikroorganismů.
- f) Identifikace pomocí aglutinace – test latexové aglutinace.
- g) Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

### **7.4.2 Postup identifikace**

Po makroskopickém zhodnocení kolonií se s identifikací začínalo jednoduchými biochemickými testy nebo hmotnostní spektrometrií. Výsledek identifikace napomohl k zvolení správné sady pro test citlivosti na antibiotika.

### **7.4.3 Identifikace stafylokoků**

*Staphylococcus aureus* se identifikoval pomocí volné plazma-koagulázy, a to sklíčkovou metodou. Další metodou, pomocí které se *S. aureus* identifikoval, byl

aglutinační test, který se použil k prokázání volné a vázané plazmakoagulázy a přítomnosti proteinu A, který je součástí buněčného povrchu *S. aureus*.

K identifikaci ostatních stafylokoků se použila hmotnostní spektrometrie a biochemická identifikace pomocí komerčních setů.

#### **7.4.4 Identifikace streptokoků**

K identifikaci hemolytických streptokoků se použil PYR test, hmotnostní spektrometrie, aglutinace a biochemická identifikace pomocí komerčních setů.

K identifikaci *Streptococcus pyogenesse* použil PYR test, který je založen na detekci aktivity PYRázy.

*Streptococcus pneumoniae* se identifikoval pomocí testu citlivosti na optochin, testu rozpustnosti ve žluči nebo latexaglutinačním testem.

#### **7.4.5 Identifikace enterokoků**

K identifikaci enterokoků se použila Slanetz-Bartleyho kultivační půda, na které enterokoky charakteristicky rostou. Další metody, které byly k identifikaci použity, jsou hmotnostní spektrometrie a biochemická identifikace pomocí komerčních setů.

### **7.5 Stanovení citlivosti**

Pro zjištění citlivosti bakterií na antibiotika byla použita disková difúzní metoda a metoda stanovení MIC.

#### **7.5.1 Disková difúzní metoda**

Metoda je založená na inhibici růstu testované bakterie kolem disku se známým obsahem antibiotika. Disk musí být položen na vhodné kultivační půdě. Velikost vytvořené inhibiční zóny, která se vytvoří kolem disku, se porovnává s experimentálně stanovenou hraniční inhibiční zónou (break point). Hraniční inhibiční zóna odděluje rezistentní a citlivé bakterie.

Citlivost bakterií k antibiotikům diskovou difúzní metodou se dělala ze suspenze bakterie ve fyziologickém roztoku. Koncentrace roztoku odpovídala zákalovému stupni 0,5 dle McFarlanda. Zákal se určil pomocí denzitometru. Roztok se naočkoval pomocí tamponu na Mueller-Hintonův kultivační agar. Poté se na půdu narazily disky s antibiotiky, které doporučil mikrobiolog. Následně se půda 18 hodin kultivovala v inkubátoru. Po inkubaci se odečetly inhibiční zóny pomocí digitálního posuvného

měřítka. Velikost naměřených inhibičních zón se porovnávala s interpretačními kritérii EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), podle nichž se určilo, jestli byl kmen citlivý nebo rezistentní na antibiotika.

### **7.5.2 Minimální inhibiční koncentrace (MIC)**

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný růst bakterií za 24 hodin. Stanovení minimální inhibiční koncentrace se dělá u významných kmenů bakterií v případě, že výsledek diskové difúzní citlivosti není dostatečně přesvědčivý, a také tam, kde není disková difúzní metoda doporučena. To se týká vankomycinu pro stafylokoky a stanovení citlivosti k penicilinu u pneumokoků.

Metoda je založená na inhibici růstu testované bakterie. Bakterie se naočkovala do mikrotitrační destičky do jamek se sestupnou koncentrací antibiotik, která jsou nařaděna geometrickou řadou. První jamka, kde je potlačený růst bakterií, je porovnána s hraniční inhibiční koncentrací doporučenou standardními postupy.

Při stanovení minimální inhibiční koncentrace byla mikrotitrační destička pro tuto metodu naplněna BHI médiem pro MIC gram pozitivní koky, a to pro streptokoky a enterokoky a MIC-Stafy pro stafylokoky. Následně se připravilo 20 ml fyziologického roztoku, který obsahoval několik kolonií vyšetřované bakterie. Koncentrace roztoku odpovídala zákalovému stupni 0,5 dle McFarlanda. Připravený roztok se nalil do misky. Pomocí očkovacího ježka se roztok z misky přenesl do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Do každé jamky se přeneslo po 1  $\mu$ l roztoku. Destička se následně jemně promíchala. Naočkovaná destička se zakryla víčkem a na 18 hodin se vložila do termostatu. Po uplynutí inkubační doby se změnil zákal v jednotlivých jamkách a výsledky byly interpretovány podle interpretačních kritérii EUCAST.

## 8 Výsledky

Z celkového počtu 1274 vyšetřených vzorků bylo 1232 hemokultur a 42 mozkomíšních moků. Z celkového počtu vzorků hemokultur bylo 92 pozitivních a 1140 negativních. Ze všech vzorků likvoru byly pozitivní pouze dva.

Přehled vzorků z jednotlivých oddělení, které byly vyšetřeny, jsou zaznamenány v tabulce číslo 1.

Tabulka 1: Vzorky vyšetřené na přítomnost gram pozitivních koků.

Oddělení	Počet vzorků hemokultur	Počet vzorků likvoru
Hematoonkologie (HOO)	196	0
Jednotka intenzivní péče (JIP)	380	7
Dětská klinika (DK)	85	1
Jednotka intenzivní péče DK	31	14
Ostatní	540	20
Celkem hemokultury	1232	42

*Zdroj: Vlastní*

U hemokultur bylo 92 pozitivních (7,5 %). Tyto pozitivní hemokultury byly odebrány od 69 pacientů. U některých pacientů byl proveden z diagnostických důvodů více než jeden odběr (2–5 odběrů).

Stafylokoky byly nalezeny v 72 hemokulturách (78,3 % ze všech pozitivních hemokultur) u 57 pacientů, rozložení jednotlivých druhů je uvedeno v tabulce č. 2. Streptokoky byly nalezeny celkem ve 13 hemokulturách (14,1 % z pozitivních) u 8 pacientů, rozložení do druhů viz tabulka č. 3. Enterokoky se vyskytovaly v 7 hemokulturách (7,6 % z pozitivních) u 4 pacientů, rozložení viz tabulka č. 4.

Byl také hodnocen výskyt pozitivních nálezů na vybraných odděleních FN v Plzni. Oddělení byla vybrána podle vyšší pravděpodobnosti výskytu pacientů se suspektními invazivními infekcemi – Oddělení hematoonkologie, jednotky intenzivní péče, Dětská klinika. Výskyt pozitivních nálezů na těchto odděleních je uveden v tabulkách č. 2, 3, 4.

Tabulka 2: Pozitivní vzorky krve výskytem bakterií z rodu *Staphylococcus* ve sledovaném souboru.

Hemokultury	HOO n/pac	JIP n/pac	DK n/pac	Ostatní n/pac	Celkem n/pac
<i>Staphylococcus aureus</i>	4/2	2/1	–	12/8 z toho MRSA 3/1	18/11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7/4	17/13	3/3	9/8	36/28
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2/2	1/1	–	2/2	5/5
<i>Staphylococcus hominis</i>	2/2	4/4	–	5/5	11/11
<i>Staphylococcus warneri</i>	–	–	–	1/1	1/1
<i>Staphylococcus caprae</i>	–	–	–	1/1	1/1
Celkem	15/10	24/19	3/3	30/25	72/61

n = počet pozitivních vzorků, pac = počet pacientů

Zdroj: Vlastní

Tabulka 3: Pozitivní vzorky krve s výskytem bakterií z rodu *Streptococcus* ve sledovaném souboru.

Hemokultury	HOO n/pac	JIP n/pac	DK n/pac	Ostatní n/pac	Celkem n/pac
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	–	–	1/1	1/1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	–	–	–	1/1	1/1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	2/1	–	–	2/1
<i>Streptococcus oralis</i>	2/1	3/1	–	–	5/2
<i>Streptococcus constellatus</i>	–	2/2	–	2/1	4/3
Celkem	2/1	7/4	–	4/3	13/8

n = počet pozitivních vzorků, pac = počet pacientů

Zdroj: Vlastní

Tabulka 4: Pozitivní vzorky krve s výskytem bakterií z rodu *Enterococcus* ve sledovaném souboru.

Hemokultury	HOO n/pac	JIP n/pac	DK n/pac	Ostatní n/pac	Celkem n/pac
<i>Enterococcus faecalis</i>	1/1	–	–	1/1	2/2
<i>Enterococcus faecium</i>	5/2 z toho VRE 5/2	–	–	–	5/2
Celkem	6/3	–	–	1/1	7/4

n = počet pozitivních vzorků, pac = počet pacientů

Zdroj: Vlastní

Ze 42 vorků likvoru byly pozitivní pouze dva, v obou byl zachycen *Streptococcus agalactiae*. Oba pozitivní vzorky pocházely z Jednotky intenzivní péče na Dětské klinice. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Pozitivní vzorky likvoru s výskytem gram pozitivních koků.

Likvor	HOO	JIP	DK	DK JIP	Ostatní	Celkem
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	–	–	2	–	2

Zdroj: Vlastní

## 9 DISKUZE

Infekční onemocnění způsobená gram pozitivními koky jsou důležitou problematikou ve všech oborech medicíny. Řada publikací se této oblasti věnuje. Výsledky praktické části mojí bakalářské práce odpovídají závěrům řady studií i teoretickým předpokladům.

Zaměřila jsem se na vyšetřování vzorků z oddělení, kde jsou hospitalizováni pacienti s rizikem výskytu invazivních onemocnění (sepsy, infekce krevního řečiště, meningitidy). Mezi tato oddělení patřila hematoonkologie, jednotky intenzivní péče, Dětská klinika a jednotka intenzivní péče Dětské kliniky.

Na těchto odděleních se vyskytují ve větší míře infekce způsobené gram pozitivními koky. Důvodem většího výskytu infekcí je, že zde pobývají pacienti s oslabeným imunitním systémem, a tudíž jsou více náchylní k infekci. Podle Nováka (40) se invazivní bakteriální onemocnění vyskytují s vyšší frekvencí na dětském oddělení. Jsou charakterizována tím, že za několik hodin od počátku onemocnění mohou kriticky ohrožovat základní životní funkce nemocného. Bakterie mohou být nalezeny v krvi nebo v mozkomíšním moku nemocného. Mezi tato onemocnění patří především sepsy a meningitida.

U stafylokokových infekcí se potvrdila nejčastější etiologie koaguláza negativních stafylokoků a z nich pak *S. epidermidis*, zejména na JIP a hematoonkologii. Tyto druhy se převážně vyskytují u infekcí krevního řečiště v souvislosti s katérovou sepsí a s tvorbou biofilmu na cizích tělesech. (41)

Výskyt sepsí *S. aureus* byl rozložen relativně rovnoměrně mezi různá oddělení. U jednoho pacienta byla prokázána sepsy MRSA, což dokládá výskyt těchto rezistentních variant v populaci. Podle údajů výroční zprávy ECDC 2014 (European Centre for Disease Prevention and Control) se v České republice MRSA vyskytuje u invazivních onemocnění v 10–25 % (42)

Streptokoková etiologie sepsí byla prokázána v menším počtu. Tato etiologie představuje spíše komplikace základního streptokokového onemocnění, u 3 pacientů se jednalo o viridující streptokoky, kdy diferenciatně diagnosticky připadá v úvahu jako primární zdroj např. fokální infekce v dutině ústní. (43)



Dva pozitivní likvory se záchytem *S. agalactiae* představovaly meningitidy kojenců. Jednalo se o rizikové novorozence, v prvním případě z rizikové nesledované gravidity, u matky prokázán abusus drog v graviditě (heroin), pozitivní toxikologie na opiáty při porodu a porod mimo nemocnici v 34. – 35. týdnu, ve druhém případě porod císařským řezem pro hrozící hypoxii plodu, hypotrofický novorozenec s porodní váhou 2000 g. Podle Petry Laštovičkové, (Novorozenecká sepe, Sestra 11/2009) je u takovýchto rizikových novorozenců a kojenců riziko poporodní sepse a meningitidy vyšší. (44)

Výskyt enterokoků ve sledovaném souboru odpovídá odborným publikacím. (41) Tyto druhy se vyskytují především u těžce imunokompromitovaných jedinců, v našem případě na hematologickém oddělení. Prokázaly se zde u 2 pacientů též VRE formy *E. faecium*.

Soubor vyšetřovaných vzorků byl poměrně malý, ale i tak dobře představoval zastoupení spektra izolovaných druhů tak, jak je obvyklé v mikrobiologických laboratořích vyšetřujících klinický materiál z lůžkových zařízení.

## ZÁVĚR

Zástupci gram pozitivních koků jsou přirozenou součástí našeho každodenního života. Za běžných okolností způsobují onemocnění jen jejich patogenní druhy. Ovšem při oslabeném imunitním systému, ať už přirozenou cestou nebo díky prodělané jiné nemoci či po operaci, mohou způsobovat závažná onemocnění i druhy patogenní jen potenciálně. Závažná onemocnění se pak mohou projevovat jako sepse, meningitida nebo syndrom toxického šoku. V některých případech mohou tyto infekce končit až fatálně.

Také lze říct, že se zvyšuje význam gram pozitivních bakterií jako původců infekcí u hospitalizovaných pacientů čili nozokomiálních infekcí. Největší potíže způsobují nozokomiální nákazy vyvolané rezistentními druhy bakterií, jako jsou methilcilin-rezistentní stafylokoky nebo vancomycin-rezistentní enterokoky. Tyto druhy vznikají při nadbytečném užívání širokospektrých antibiotik a mohou způsobit selhání běžné antibiotické léčby.

Díky jednomu z mých cílů, a to zjistit výskyt onemocnění způsobených gram pozitivními bakteriemi za určité období, jsem měla možnost se seznámit s mikrobiologickou laboratoří Fakultní nemocnice v Plzni a s metodami, které se zde používají k diagnostice.

Myslím, že by bylo zajímavé delší dobu sledovat výskyt gram pozitivních bakterií na odděleních, kde se nejčastěji nacházejí onemocnění, která bakterie způsobují. Výsledky mezi sebou porovnávat a zjišťovat, jestli se jejich počty v průběhu sledování výrazně mění či nikoliv.

Také si myslím, že by bylo vhodné dbát na správné použití antibiotik, obzvláště širokospektrých, a pokusit se tak zabránit vzniku nových rezistentních kmenů.

## CITOVANÁ LITERATURA

1. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. str. 495. ISBN 80-902896-6-5.
2. HOLÝ, O., J. VLČKOVÁ, I. MATOUŠKOVÁ a M. KOLÁŘ. Prevalence výskytu nosního nosičství kmenů *Staphylococcus aureus* a meticilin rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA) u studentů všeobecného lékařství LF UP v Olomouci. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2015, 64(2), 98-101. ISSN 1210-7913.
3. BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994, 226 s. ISBN 80-901521-4-7.
4. PETRÁŠ, Petr. Čtyři nové druhy v rodu *Staphylococcus* popsané v roce 2010. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2010, 19(11), 334-337. ISSN 1803-6422.
5. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014, 139 s. ISBN 978-80-246-2414-3.
6. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů 2., doplněné a přepracované vydání*. Praha: Grada Publishing, 2014, 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
7. Příspěvatelé WikiSkript. Transdukce. In: *WikiSkripta* [online]. 2008 [cit. 2016-10-28]. ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Transdukce&oldid=286471>.
8. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. 978-80-86850-04-8.
9. Příspěvatelé wikipedie. Protein A. In: *Wikipedia* [online]. 2016 [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_A](https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_A).
10. PETRÁŠ, Petr, Petr JEŽEK, Ivana MACHOVÁ, Petr BÍLINA a Jiří FIALA. Další smrtelný případ pneumonie vyvolaný kmenem *Staphylococcus aureus* s produkcí Pantonova–Valentinova leukocidinu. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2009, 18(1), 15-17. ISSN 1211-7358.
11. GOERING, Richard V., Hanzel M. DOCKRELL, Mark ZUCKERMAN, Ivan M. ROITT a Peter L. CHIODINI. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. Praha: Triton, 2016, 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.
12. KŘÍŽOVÁ, Pavla a Petr PETRÁŠ. Syndrom toxického šoku. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2012 [cit. 2017-01-28]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/syndrom-toxickeho-soku>.

13. FAKAN, František. *Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory*. Praha: Karolinum, 2008, 112s. ISBN 978-80-246-1054-2.
14. FRÉBORTOVÁ, Jitka. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, 82 s. ISBN 978-80-244-2139-1.
15. PETRÁŠ, Petr. ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků – verze 2010. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2010, 19(12), 373-378. ISSN 1803-6422.
16. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL and Michael A. PFALLER. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013, 874 s. ISBN 978-0-323-08692-9.
17. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
18. BARTŮNĚK, Petr, Dana JURÁSKOVÁ, Jana HECZKOVÁ a Daniel NALOS. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, 2016, 752 s. ISBN 978-80-247-4343-1.
19. MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012, 90 s. ISBN 978-80-7395-467-3.
20. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. ISBN 80-246-1270-4.
21. TÁBORSKÁ, Jana. Syndrom toxického šoku. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, 2009, 11(9), 405-409. ISSN 1212-7299.
22. ŠTEFÁNEK, Jiří. Revmatická horečka. In: *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2008 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=revmaticka-horecka>.
23. Příspěvatelé wikiskript. Akutní glomerulonefritida. In: *Wikiskripta* [online]. 2016 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Akutn%C3%AD\\_glomerulonefritida](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Akutn%C3%AD_glomerulonefritida).
24. SLÁDKOVÁ, Pavla a Jana HLAVÁČOVÁ. *Speciální mikrobiologie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, 88 s. ISBN 978-80-7375-558-4.
25. KOUCKÝ, Michal. Výskyt streptokoků v porodních cestách. *Porodnice.cz* [online]. 2014 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://www.porodnice.cz/clanky/vyskyt-streptokoku-v-porodnich-cestach>.
26. GÖPFERTO VÁ, Dana a kol. *100 infekcí (epidemiologie pro praxi)*. Praha: Triton, 2015, 228 s. ISBN 978-80-7387-846-7.
27. PRŮŠA, Richard. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe, 2014, 1740 s. ISBN 978-80-87553-68-8.

28. POKHREL, Pratiksha. PYR ( L-Pyrrolidonyl- $\beta$ -Naphthylamide) Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation, Examples and Limitation. *Microbiology notes* [online]. 2015 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://www.microbiologynotes.com/pyr-l-pyrrolidonyl-%CE%B2-naphthylamide-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-examples-and-limitation/>.
29. Příspěvatelé wikiskripta. CAMP test. In: *Wikiskripta* [online]. 2014 [cit. 2016-12-2]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/CAMP\\_test](http://www.wikiskripta.eu/index.php/CAMP_test).
30. ACHARYA, Tankeshwar. CAMP Test: Principle, Procedure and results. *Microbe online* [online]. 2013 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/camp-test-principle-procedure-results/>.
31. Příspěvatelé wikiskripta. Antibiotika. In: *Wikiskripta* [online]. 2016 [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Antibiotika#Rezistence>.
32. Národní program antibiotické politiky [online]. 2010 [cit. 2016-12-30]. Dostupné z: [http://www.nemocnicepribram.cz/pdf/NAPAP\\_VR.pdf](http://www.nemocnicepribram.cz/pdf/NAPAP_VR.pdf).
33. KOLÁŘ, Milan, Karel URBÁNEK a Pavel DLOUHÝ. *Klinická farmakologie a farmacie*. Olomouc: Solen, 2006, 20(2), 71-74. ISSN 1212-7973.
34. MELTER, Oto. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trias, 2008, 14(5), 178-185. ISSN 1211-264X.
35. Příspěvatelé wikiskripta. MRSA. In: *Wikiskripta* [online]. 2016 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/MRSA>.
36. Příspěvatelé wikiskripta. Staphylococcus. In: *Wikiskripta* [online]. 2016 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Staphylococcus>.
37. BERGEROVÁ, Tamara a kol. Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmene *Staphylococcus aureus* rezistentní k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2006, 15(1). ISSN 1211-7358.
38. HERMANOVSKÁ, O., J. BARDOŇ a P. ČERMÁK. Problematika vankomycin rezistentních enterokoků - podstata rezistence a riziko přenosu ze zvířat na člověka. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trias, 2016, 22(2), 54-60. ISSN 1211-264X.
39. URBÁŠOVÁ, P., V. JAKUBŮV, B. MACKOVÁ a H. ŽEMLIČKOVÁ. Stafylokoky - průkaz indukované rezistence ke klindamycinu (D – test). In: *Státní zdravotní ústav*. [Online] 2014 [Citace: 31. Prosinec 2016.] <http://www.szu.cz/stafylokoky-indukovana-rezistence-ke-klindamycinu>.
40. NOVÁK, Ivan. Invazivní bakteriální onemocnění u dětí. *Pediatric pro praxi*. Olomouc: Solen, 2002, 3(4), 172-174. ISSN 1213-0494.

41. SAS, Igor. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Zdraví medicína* [online]. 2010 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pecce-455567>.
42. ECDC. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. *Annual epidemiological report* [online]. Stockholm, 2014 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-annual-epidemiological-report.pdf>.
43. BROUKAL, Zdeněk a kol. Fokální infekce odontogenního původu – současný pohled. *Zdravotnictví medicína* [online]. 2003 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/fokalni-infekce-odontogenniho-puvodu-soucasny-pohled-155575>.
44. LAŠTOVIČKOVÁ, Petra. Novorozenecká sepse. *Sestra* [online]. 2009 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/novorozenecka-sepse-448168>.

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

NaCl - chlorid sodný

CO<sub>2</sub> - oxid uhličitý

sp. - species (druh)

CNS - centrální nervová soustava

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1:** Vzorky vyšetřené na přítomnost gram pozitivních koků.

**Tabulka 2:** Pozitivní vzorky krve výskytem bakterií z rodu *Staphylococcus* ve sledovaném souboru.

**Tabulka 3:** Pozitivní vzorky krve s výskytem bakterií z rodu *Streptococcus* ve sledovaném souboru.

**Tabulka 4:** Pozitivní vzorky krve s výskytem bakterií z rodu *Enterococcus* ve sledovaném souboru.

**Tabulka 5:** Pozitivní vzorky likvoru s výskytem gram pozitivních koků.

## SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1:** Přehled taxoů v rodu *Staphylococcus* (prosinec 2010).

**Příloha 2:** Mikroskopický preparát grampozitivní koky ve shlucích (stafylokoky), barvení dle Grama, zvětšení 1000x.

**Příloha 3:** Mikroskopický preparát grampozitivní koky v řetízcích (streptokoky), barvení dle Grama, zvětšení 1000x.

**Příloha 4:** *Staphylococcus aureus* - růst na krevním agaru po 24 hod.

**Příloha 5:** *Streptococcus pyogenes* - růst na krevním agaru ve smíšené kultuře po 24 hod.

**Příloha 6:** *Enterococcus faecalis* - růst na krevním agaru po 24 hod.

**Příloha 7:** Povolení sběru informací ve FN Plzeň.



# PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled taxonů v rodu *Staphylococcus* (prosinec 2010)

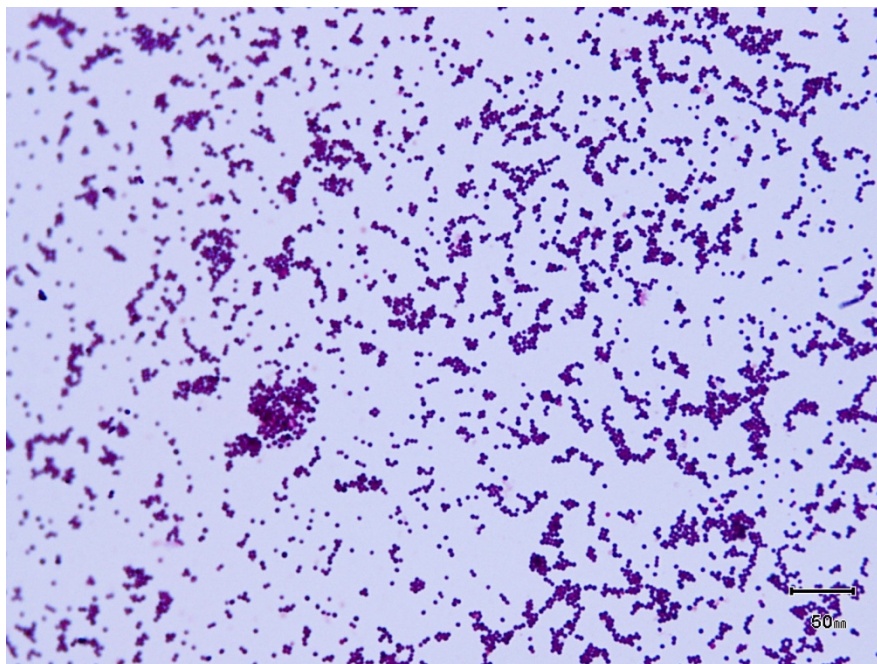
Č.	DRUH / PODDRUH		VÝSKYT			ROK	1. AUTOR
			ČLOVĚK	ZVÍŘE	POTRAVINA		
1	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	K +	člověk	zvíře	potravina, prostředí	1884	Rosenbach
2	<i>S. epidermidis</i>		člověk	zvíře	prostředí	1916	Evans
3	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>		člověk			1951	Shaw
4	<i>S. capitis</i> ssp. <i>capitis</i>		člověk			1975	Kloos
5	<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>		člověk			1975	Schleifer
6	<i>S. haemolyticus</i>		člověk	zvíře	prostředí	1975	Schleifer
7	<i>S. hominis</i> ssp. <i>hominis</i>		člověk			1975	Kloos
8	<i>S. simulans</i>		člověk			1975	Kloos
9	<i>S. warneri</i>		člověk			1975	Kloos
10	<i>S. xylosus</i>		člověk	zvíře		1975	Schleifer
11	<i>S. intermedius</i>	K +	člověk	zvíře		1976	Hájek
12	<i>S. sciuri</i> ssp. <i>sciuri</i>		člověk	zvíře		1976	Kloos
13	<i>S. hyicus</i>	K +		zvíře	potravina	1978	Devriese
14	<i>S. carnosus</i> ssp. <i>carnosus</i>				uzeniny	1982	Schleifer
15	<i>S. auricularis</i>		člověk			1983	Kloos
16	<i>S. caprae</i>		člověk		kozí mléko	1983	Devriese
17	<i>S. gallinarum</i>			drůbež		1983	Devriese
18	<i>S. lentus</i>		čl.zřídka	zvíře		1983	Schleifer
19	<i>S. saccharolyticus</i>	an.)	člověk			1984	Kilpper-Bälz
20	<i>S. arlettae</i>			koza, drůbež		1985	Schleifer
21	<i>S. equorum</i> ssp. <i>equorum</i>			kůň		1985	Schleifer
22	<i>S. kloosii</i>			divoká zvířata		1985	Schleifer
23	<i>S. aureus</i> ssp. <i>anaerobius</i>	an.)K +		ovce		1985	DeLaFuente
24	<i>S. chromogenes</i>			zvíře	mléko	1987	Hájek
25	<i>S. lugdunensis</i>		člověk			1988	Freney
26	<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>schleiferi</i>		člověk			1988	Freney
27	<i>S. delphini</i>	K +		delfin		1988	Varaldo
28	<i>S. felis</i>			kočka		1989	Igimi
29	<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>coagulans</i>	K +		pes		1990	Igimi
30	<i>S. capitis</i> ssp. <i>urealyticus</i>		člověk			1991	Bannerman
31	<i>S. cohnii</i> ssp. <i>urealyticus</i>		člověk	zvíře		1991	Kloos
32	<i>S. muscae</i>			moucha, vepř		1992	Hájek
33	<i>S. piscifermentans</i>				marinované ryby	1992	Tanasupawat
34	<i>S. pasteurii</i>		člověk	zvíře	potravina	1993	Chesneau
35	<i>S. vitulinus</i>		čl. zřídka	zvíře	potravina	1994	Webster
	<i>S. pulvereri</i> = <i>S. vitulinus</i>		člověk	zvíře		1995	Zakrzewska
36	<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>bovis</i>			zvíře		1996	Hájek
37	<i>S. sciuri</i> ssp. <i>carnaticus</i>				masové výrobky	1997	Kloos
38	<i>S. sciuri</i> ssp. <i>rodentium</i>			hlodavci		1997	Kloos
39	<i>S. lutrae</i>	K +		vydra říční		1997	Foster

40	<i>S. succinus</i> ssp. <i>succinus</i>				„jantar“ *)	1998	Lambert
41	<i>S. condimentii</i>				sojová omáčka	1998	Probst
42	<i>S. carnosus</i> ssp. <i>utilis</i>				potraviny	1998	Probst
43	<i>S. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>		člověk			1998	Kloos
44	<i>S. fleurettii</i>				sýr z kozího mléka	2000	Vernozy-Rozand
45	<i>S. succinus</i> ssp. <i>casei</i>				zrající sýr	2003	Place
46	<i>S. equorum</i> ssp. <i>linens</i>				zrající sýr	2003	Place
47	<i>S. nepalensis</i>			kozy v Himalájích		2003	Spergser
48	<i>S. pseudintermedius</i>	K +	člověk	zvíře		2005	Devriese
49	<i>S. simiae</i>			kotul veverovitý		2005	<b>Pantůček</b>
50	<i>S. pettenkoferi</i>		člověk			2007	Trülzsch
51	<i>S. microti</i>			hraboš obecný		2010	<b>Nováková</b>
52	<i>S. massiliensis</i>		člověk			2010	Masalma
53	<i>S. rostri</i>			prase		2010	Riesen
54	<i>S. devriesei</i>			kráva	mléko	2010	Supré
	<b>zatím nevalidovány:</b>						
	<i>S. pseudolugdunensis</i>		člověk			2008	Tang
	<i>S. stepanovicii</i>			hlodavci, hmyzožravci		2010	Hauschild

K+ = koaguláza pozitivní; an.) = striktně anaerobní; \*) *S. succinus* subsp. *succinus* byl izolován ve zbytcích třetihorních rostlin zakonzervovaných v jantaru

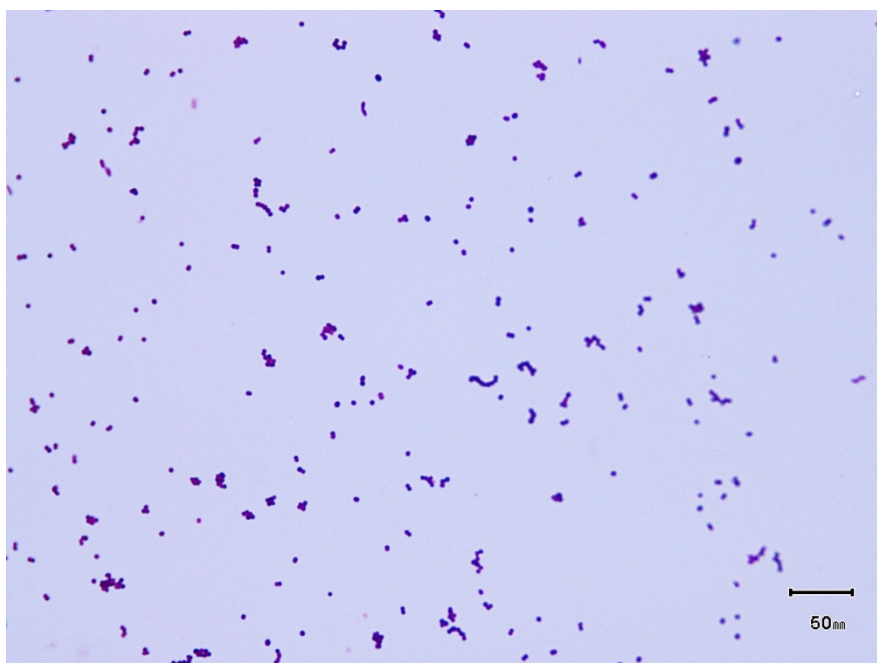
Zdroj: PETRÁŠ, Petr. Čtyři nové druhy v rodu *Staphylococcus* popsané v roce 2010. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie. Praha: SZÚ, 2010, 19(11), 334-337. ISSN 1803-6422.*

**Příloha 2:** Mikroskopický preparát grampozitivní koky ve shlucích (stafylokoky), barvení dle Grama, zvětšení 1000x.



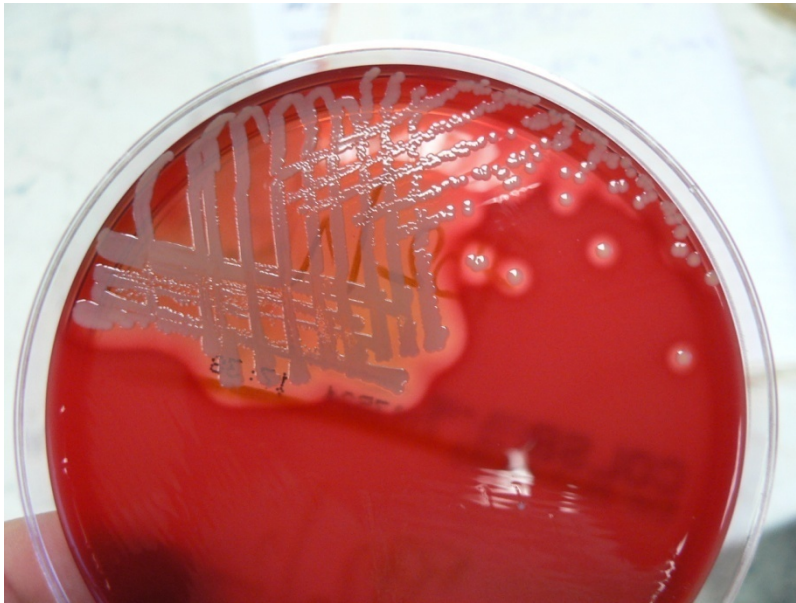
*Zdroj: foto autor*

**Příloha 3:** Mikroskopický preparát grampozitivní koky v řetězcích (streptokoky), barvení dle Grama, zvětšení 1000x.



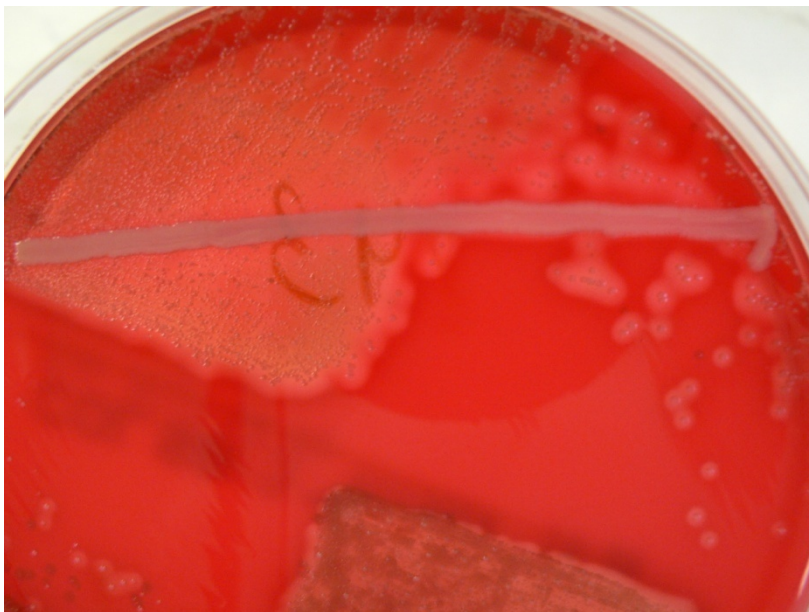
*Zdroj: foto autor*

**Příloha 4:** *Staphylococcus aureus* - růst na krevním agaru po 24 hod.



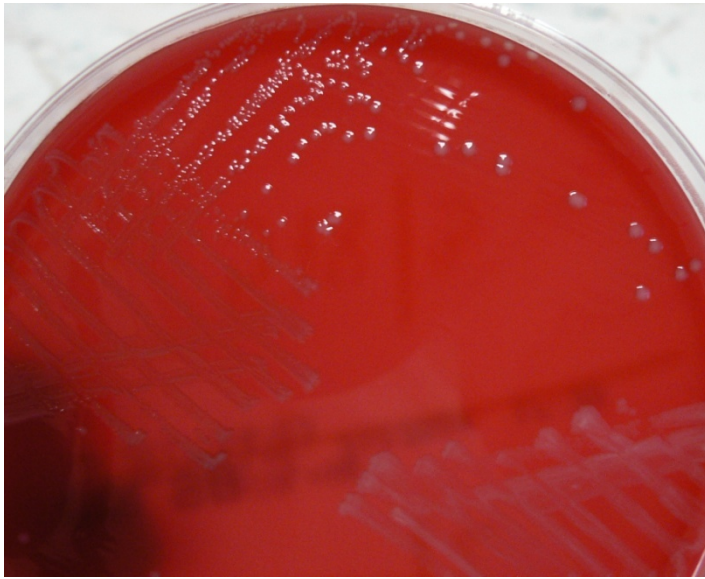
*Zdroj: foto autor*

**Příloha 5:** *Streptococcus pyogenes* - růst na krevním agaru ve smíšené kultuře po 24 hod.



*Zdroj: foto autor*

**Příloha 6:** *Enterococcus faecalis* - růst na krevním agaru po 24 hod.



*Zdroj: foto autor*

## Příloha 7: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.



**FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ**

**Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči**

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory  
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín  
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

*Barbora Ondříčková*

*Studentka oboru Zdravotní laborant*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů*

*Západočeská univerzita v Plzni*

### **Povolení sběru informací ve FN Plzeň**

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Zdravotnický významné gram pozitivní koky*“.

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

*Mgr. Bc. Světluše Chabrová*

*manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP*

*zástupkyně náměstkyně pro oš. péči*

*Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň*

*tel.. 377 103 204, 377 402 207*

*e-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)*

*3. 11. 2016*