

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2.lékařská fakulta

Obor Zdravotní laborant

**Nozokomiální nákazy, význam,
nejčastější původci, možnosti prevence.**

Bakalářská práce

2007

Vypracovala Vilma Klemensová

Vedoucí práce MUDr. Otakar Nyč

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a pouze s použitím literatury a zdrojů uvedených v části Použitá literatura.

V Praze dne 1.4.2007

Vilma Klemensová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu práce MUDr. Otakarovi Nyčovi, který se mi věnoval, za jeho trpělivost, materiál a rady při psaní této práce.

Seznam použitých zkratk

ARO	anesteziologicko resuscitační oddělení
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
FN	Fakultní nemocnice
GISA	glykopeptid středně citlivý <i>Staphylococcus aureus</i>
GRSA	glykopeptid rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
HIV	Human Immunodeficiency Virus
MHA	Mueller Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	metecilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NRL	Národní referenční laboratoř
PBP	Penicilin Binding Protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
SZÚ	Státní zdravotní ústav
VRE	vankomycin-rezistentní enterokok

Seznam použitých zkratk	4
Obsah	5-7
1 Úvod	8
2 Cíl	9
3 Teoretická část	10-21
3.1 Definice NN	10
3.2 Rozdělení NN	10
3.2.1 Endogenní nákazy	10
3.2.2 Exogenní nákazy	10
3.3 Klinické rozdělení NN	11-12
3.3.1 Infekce v místě chirurgického výkonu	11
3.3.2 Gastrointestinální	11
3.3.3 Urogenitální	11
3.3.4 Respirační	12
3.3.5 Infekce krevního řečiště	12
3.3.6 Kožní infekce	12
3.3.7 Neonatální infekce	12
3.4 Přenos NN	13
3.4.1 Přímý přenos	13
3.4.2 Nepřímý přenos	13
3.5 Způsob přenosu	13-14
3.5.1 Inokulací, implantací	13
3.5.2 Vzdušnou cestou	13
3.5.3 Alimentární cestou	14
3.6 Hlavní původci NN	14-21
3.6.1 Gram pozitivní koky	14-16
3.6.1.1 Stafylokoky	14-15
3.6.1.2 Streptokoky	15
3.6.1.3 Enteroky	15-16
3.6.2 Gram negativní tyčky	16-17

3.6.2.1	Enterobakterie	16
3.6.2.2	Gram negativní nefermentující tyčky	16-17
3.6.3	Anaeroby	17
3.6.4	Mykotická agens	17-18
3.6.4.1	Kandidy	17-18
3.6.4.2	Aspergily	17-18
3.6.5	Atypická agens	18
3.6.5.1	Legionely	18
3.6.5.2	Chlamydie a Mykoplasmata	18
3.6.6	Viry	18
3.6.7	Staphylococcus aureus a MRSA	19-21
4	Metodiky	22-18
4.1	Identifikace Staphylococcus aureus	22-23
4.1.1	Mikroskopie	22
4.1.2	Kultivace	22
4.1.3	Produkce katalázy	22
4.1.4	Clumping faktor	22
4.1.5	Volná koaguláza	22
4.1.6	Hyalurinidázový test	23
4.2	Identifikace MRSA	23-28
4.2.1	Průkaz MRSA v klinickém materiálu	23-24
4.2.2	Detekce MRSA v čistých kulturách <i>S. aureus</i>	25-28
4.2.2.1	Disková metoda s 1 ug oxacilinu	25
4.2.2.2	Disková metoda s 30 ug cefoxitinu	26
4.2.2.3	Diluční mikrometoda	26
4.2.2.4	E- test pro vyšetření citlivosti k oxacillinu	27
4.2.2.5	Průkaz PBP2a latexovou aglutinací	28

5	Experimentální část	29-32
6	Diskuze	33-35
7	Závěr	36
8	Souhrn	37
9	Použitá literatura	38-39
10	Seznam tabulek	40
11	Seznam grafů	41
12	Obrazová příloha	42-43

1 Úvod

Nozokomiální nákazy (dále jen NN) patří k závažným problémům současné léčebné péče. Kromě významného podílu na morbiditě i mortalitě hospitalizovaných pacientů, mohou nemalou měrou navyšovat ekonomické náklady příslušného zdravotnického zařízení.

Podle statistik u pacientů, kteří získali infekci ve zdravotnickém zařízení, existuje sedmkrát vyšší pravděpodobnost úmrtí v průběhu hospitalizace ve srovnání s ostatními hospitalizovanými a narůstá pravděpodobnost, že stráví v nemocnici 2,5krát delší dobu. Uvádí se, že průměrná incidence (počet nozokomiálních infekcí na počet přijatých pacientů) se ve vyspělých zemích pohybuje kolem 5-7.(1)

Nemocniční infekce jsou nejen častým důvodem k prodloužení hospitalizace, ale současně téměř vždy vyžaduje další vyšetření, zákroky a modifikaci terapie. Tím logicky stoupají ekonomické náklady, které v jednotlivých zemích dosahují doslova miliardových částek.(2)

V USA ročně nozokomiální infekce navyšují náklady o 4-10 miliard dolarů, v Německu o jednu miliardu eur, v Kanadě o miliardu kanadských dolarů, v České republice se odhady pohybují kolem jedné miliardy korun.(1)

2 Cíl

Nozokomiální infekce ve spojení s narůstající rezistencí mikrobů na antibiotika se stávají v celosvětovém měřítku významným zdravotním rizikem. Nedostatečná produktivita farmaceutického průmyslu ve smyslu nových účinných látek s antibakteriální aktivitou na multirezistentní mikroorganismy, stejně jako doposud globálně nezvládnutá a především v praxi nedostatečně aplikovaná pravidla racionální preskripce antibiotik přispívají k současné prohlubující se krizi antibiotické léčby. Dílčí sběr dat a zkušeností na lokální úrovni patří k základním zdrojům, z kterých je možno čerpat informace nejen pro hodnocení aktuální situace, ale především pro volbu adekvátních strategií zaměřených k omezení negativních epidemiologických a zdravotnických dopadů způsobených šířením rezistentních mikroorganismů v nemocničním prostředí. Také z těchto důvodů jsem zaměřila svoji práci na vysoce aktuální problematiku **MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*)**, a to zejména ve vztahu k možnostem laboratorní diagnostiky těchto kmenů. Právě co nejpřesnější a také pokud možno nejčasnější detekci MRSA považuji za nezbytný základ pro účinnou léčbu infekcí, stejně jako pro kontrolu výskytu MRSA v nemocnici. Cílem mé práce je tedy zhodnocení laboratorních metod pro detekci MRSA a přehled některých epidemiologicky významných dat získaných v návaznosti právě na laboratorní diagnostiku.

3 Teoretická část

3.1 Definice NN

Definice: **Nozokomiální nákaza** je onemocnění exogenního (vnějšího) i endogenního (vnitřního) původu, která vznikne v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení nebo diagnostickým či léčebným zákrokem.(3,4)

Za nozokomiální infekci se považuje i onemocnění, které se projeví až po propuštění do domácí péče, ale ne infekce se kterými byl již pacient do nemocniční péče přijat nebo právě se nacházel v inkubační době. Jedním se základních znaků NN je pravděpodobná etiologická role nemocničních mikroorganismů, které se v řadě případů vyznačují vyšší virulencí a především rezistencí jak k antimikrobním přípravkům, tak i k dezinfekčním prostředkům.(5)

3.2 Rozdělení NN

3.2.1 Endogenní nákazy

Etiologickým agens je mikrob, který je součástí původní mikroflóry pacienta. Zdrojem infekce je pak nejčastěji kůže, respirační systém, gastrointestinální nebo urogenitální trakt. Mikroorganismus způsobí infekci buďto v místě původního přirozeného výskytu při narušení místní imunity, např. při katetrizaci, chirurgickém výkonu apod. Nebo je zanesen při léčebném nebo diagnostickém výkonu do prostředí, kde se může uplatnit jeho patogenní potenciál. Příkladem může být přirozená flóra horních cest dýchacích, která se při intubaci může dostat do dolních cest a vyvolat bronchopneumonii. (2)

3.2.2 Exogenní nákazy

Vznikají zanesením původce nákazy do organismu z vnějšího prostředí. Ve zdravotnickém zařízení přežívají v prostředí rezistentní kmeny

mikroorganismů, které se adaptovaly na prostředí a jsou označovány jako nemocniční kmeny a představují vážný epidemiologický a terapeutický problém.
(2)

3.3 Klinické rozdělení NN

Rozdělení dle vstupní brány infekce :

3.3.1 Infekce v místě chirurgického výkonu

3.3.2 Gastrointestinální trakt

3.3.3 Urogenitální trakt

3.3.4 Respirační trakt

3.3.5 Infekce krevního řečiště

3.3.6 Kožní infekce

3.3.7 Neonatální infekce

3.3.1 Infekce v místě chirurgického výkonu

Mohou se vyskytnout i přes profylaktické podání antibiotika a komplikují chirurgické výkony, zejména pooperační průběh. Udává se, že představují 14 – 16 % všech nozokomiálních infekcí a jsou tedy druhými nejčastějšími NN vůbec. (2)

3.3.2 Gastrointestinální trakt

Časté jsou např. virové infekce s epidemickým výskytem zejména na dětských odděleních vyvolané rotaviry, adenoviry nebo noroviry. Omezeně může dojít k nákaze i při endoskopickém vyšetření. (2,3)

3.3.3 Urogenitální trakt

Vznikají po operacích močového měchýře, prostaty. Dále při katetrizaci močového traktu, rizikem jsou hlavně dlouhodobě zavedené močové katétry, které

se s vysokou pravděpodobností v závislosti na čase kolonizují nemocniční mikroflórou, která za příhodných podmínek může vést k vzniku infekce ascendentní cestou. (2,6)

3.3.4 Respirační trakt

Inhalační cestou se šíří různé mikroorganismy a jsou nejčastěji vyskytující se NN. Zvláštní kategorií jsou ventilátorové pneumonie u pacientů na řízené plicní ventilaci, kde endotracheální rourka jako cizorodý materiál znamená riziko kolonizace endogenními nebo nemocničními mikroorganismy, které mohou být následně u disponovaného pacienta zdrojem infekce – pneumonie. Incidence nozokomiální pneumonie se udává obvykle mezi 4 a 5 případy na 1000 přijatých pacientů za rok a závisí na typu zařízení a na druhu nemocných, kteří jsou v něm ošetřováni. (7)

3.3.5 Infekce krevního řečiště

Intravenózní vstupy jsou příčinou řady infekcí. Nejzávažnější formou je katedrové sepse.

Mezi infekční komplikace patří - infekce místa vstupu

- infekce krevního řečiště
- endokarditida
- osteomyelitida a další metastatické infekce

3.3.6 Kožní infekce

Kůže se jako brána infekce uplatňuje, je-li narušena její integrita (vpichy po injekcích, kožní léze, bércové vředy apod. (2,4)

3.3.7 Neonatální infekce

Nejčastějším zdrojem neonatálních infekcí je plodová vody, poranění kůže během porodu. Rizikem je zejména komplikovaný protražovaný porod, stejně tak i poporodní intenzivní péče spojená s plicní ventilací, cévní katetrizací apod. (2)

3.4 Přenos NN

3.4.1 Přímý přenos

Současně je přítomen zdroj infekčního agens i vnímavý jedinec.

3.4.2 Nepřímý přenos

Chybí zdroj, ale je přítomno vhodné vehikulum, umožňující přežití infekčního agens po dobu než se dostane k vnímavému jedinci. Např. kmeny *Staphylococcus* sp. zůstávají vitální v prachových částicích až několik dní.

3.5 Způsob přenosu

3.5.1 Přenos inokulací, implantací

3.5.2 Vzdušnou cestou

3.5.3 Alimentární cestou

3.5.1 Přenos inokulací, implantací

Vzniká na základě léčebných procesů, kdy je do organismu vnímavého jedince vneseno infekční agens například nesterilními nástroji, kontaminovanými krevními deriváty a intravenózními roztoky – nepřímý přenos.(5)

Přímou cestou se jedná především o kontaminované ruce zdravotnického personálu, které představují nejdůležitější a nejčastější vektor přenosu .

3.5.2 Vzdušnou cestou

Infekční agens jsou nesena prachem nebo vodním aerosolem- zdrojem jsou různé druhy zvlhčovačů, nebulizátorů, přístrojů pro plicní ventilaci a klimatizační zařízení. (2)

3.5.3 Alimentární cestou

Přenos nemocniční stravou, která může rovněž být kontaminována nemocničními mikroorganismy.

3.6 Hlavní původci NN

Jako původce NN se může uplatnit kterýkoli infekční agens, v závislosti na stavu imunitního systému hostitele. Nejčastěji izolovanými původci jsou stafylokoky a gram negativní mikroorganismy, především enterobaktérie a nefermentující tyčky jako *Pseudomonas aeruginosa*, acinetobaktérie, stenotrofomonády a řada dalších. Příčinou jejich častého uplatnění jako oportunních patogenů je značná přizpůsobivost k nemocničnímu prostředí, zejména vysoká odolnost k zevním podmínkám jako je vyschnutí, změny teplot, minimální nutriční nároky apod. Adaptace také zahrnuje výměnu různých faktorů virulence, vázaných nejčastěji na extrachromosomální DNA. K dalším významným se řadí streptokoky, enterokoky sporulující i nesporulující anaerobní bakterie, v dnešní době se zvyšuje význam toxických kmenů *Clostridium difficile*. Omezeně pak i bakterie jako např. branhamely, korynebaktérie a listerie, dále legionely, kampylobaktérie, mykobaktérie a nokardie. Jako další agens můžeme výjimečně prokazovat různé typy virů, chlamydie, mykoplazmata, rickettsie, kvasinky a plísňe. (2,3,10)

3.6.1 Grampozitivní koky

3.6.1.1 Stafylokoky

Staphylococcus aureus je trvale považován za nejčastějšího původce nozokomiálních nákaz. (8)

Ke stafylokokové infekci jsou více náchylné primárně narušené kožní a slizniční povrchy. Tyto infekce mají tendenci se rozvinout především v traumatizovaných tkáních – operace, popáleniny, dekubity, bércové vředy a v místech kde je přítomno cizí těleso např. kanyly, katetry či šicí materiál. Mezi nejčastější stafylokokové NN patří infekce v místě chirurgického výkonu. (2)

U osob po rozsáhlých operacích gastrointestinálního traktu, u oslabených jedinců nebo u pacientů, kteří jsou léčeni širokospektrými antibiotiky a u nichž byla fyziologická střevní flora potlačena nebo zcela eliminována (např. v důsledku širokospektré antibiotické léčby) se může objevit stafylokoková enterokolitida. (4)

V posledních letech také stále narůstá význam koaguláza negativních stafylokoků, které jsou přirozenou mikroflórou kůže a některých sliznic. S rozvojem používání cizorodých materiálů v medicíně, ať už pro účely katetrizace krevního řečiště a močových cest nebo jako kloubních implantátů, chlopenních a cévních náhrad, shuntů v neurochirurgii apod., se ukázalo, že některé z těchto kmenů mají vysokou afinitu právě k umělým povrchům, na kterých vytvářejí vysoce odolný biofilm. (9)

3.6.1.2 Streptokoky

Streptococcus pyogenes (skupina A) může vyvolávat puerperální sepse (v našich podmínkách spíše výjimečné), pooperační infekce, dekubity, bérčové vředy. Závažnou komplikací může být tato infekce u popálenin. (3)

Streptokoky skupiny B je často nalézány jako původci novorozeneckých sepsí, K nákaze dochází při průchodu kolonizovanými porodními cestami. Kromě toho se uplatňují jako původci ranných, katetrových nebo močových infekcí (3,4)

Streptococcus pneumoniae může vyvolat respirační nozokomiální infekci, zejména u starých osob v léčebnách dlouhodobě nemocných, geriatrických odděleních a domovech důchodců a u alkoholiků. Jinak se, ale uplatňuje především jako původce komunitních infekcí, a to infekcí horních cest dýchacích a bronchopneumonií, výjimečně i hnisavých meningitid. (2,4)

3.6.1.3 Enteroky

Enterokoky jsou fyziologickou mikroflórou intestinálního traktu a jsou přirozeně rezistentní k mnoha antimikrobním přípravkům. Šíří se hlavně kontaminovanými rukama zdravotnického personálu a snadno přežívají v zevním prostředí díky své vysoké odolnosti.

Pozornost je zaměřena hlavně na *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* s přirozenou a získanou rezistencí k mnoha antibiotikům. Velké nebezpečí a riziko obtížně terapeuticky zvládnutelných infekcí představují kmeny s rezistencí k vankomycinu (VRE). Jejich zdrojem nemusí být pouze nemocniční prostředí, ale podle některých studií se mohou šířit na člověka i potravinovými řetězci, tj. nejčastěji masnými a mléčnými produkty. Předpokládá, že podávání antibiotik ve zvířecích velkochovech nejen za léčebným účelem, ale především jako růstových stimulantů sehrálo v nedávné minulosti negativní roli ve smyslu vzniku a šíření VRE. (5)

3.6.2 Gramnegativní tyčky

3.6.2.1 Enterobakterie

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia marcescens* a mnoho dalších druhů patří mezi vůbec nejčastější původce NN. Jako součást běžné střevní flóry jsou snadno přenosné rukama zdravotnického personálu. (2, 10)

Některé z nich dlouhodobým výskytem v prostředí zdravotnického zařízení získají rezistenci na antibiotika a na dezinfekční prostředky, což je epidemiologicky velmi závažné.

Jsou původci širokého spektra různých NN jako infekcí v místě chirurgického výkonu, infekcí močového traktu, infekcí dýchacích cest a infekcí krevního řečiště.

3.6.2.2 Gramnegativní nefermentující tyčky

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* a další.

Tyto kmeny jsou značně rozšířeny v zevním prostředí a často se uplatňují jako etiologické agens NN, zejména v souvislosti se selekcí vyvolanou podáváním širokospektrých antimikrobiálních přípravků. Kolonizace těmito kmeny je mnohem častější než klinické onemocnění. K onemocnění dochází například u

pacientů na jednotkách intenzivní péče v souvislosti používáním endotracheálních kanyl. (3,10)

Vysoce specifickým epidemiologickým problémem pacientů s cystickou fibrózou je *Burkholderia cepacia*, v našich podmínkách nejčastěji genomvar III, který se vyznačuje zřejmě vyšší virulencí, ale zejména multirezistencí a v některých případech až pan rezistencí. Kolonizace těmito, pro ostatní relativně neškodnými mikroorganismy, znamená pro pacienty s cystickou fibrózou téměř pravidelně zhoršení prognózy základní choroby s rizikem opakovaných atak těžkých až nekrotizujících pneumonií. Eradikace ze sliznic dýchacích cest se přes intenzivní a kombinovanou antibiotickou léčbu daří zcela výjimečně. (11)

3.6.3 Anaeroby

Clostridium perfringens a další klostridia, peptokoky, fusobaktérie, bakteroidy mohou vyvolávat anaerobní nebo smíšené infekce v dutině břišní, měkkých tkáních, dutině ústní i jinde. (10)

Clostridium difficile se vykytuje také jako součástí normální střevní mikroflóry, ale v posledních letech bylo identifikováno jako velmi významný původce NN. K infekci dochází často následkem podávání antibiotik, které porušují rovnováhu běžné flóry zažívacího traktu a tím může docházet ke zmnožení toxických kmenů *Clostridium difficile*. Zdroj může být endogenní nebo exogenní, kdy nejčastějším vektorem přenosu jsou ruce zdravotnického personálu. V posledních letech se toto species stává v některých zemích (Kanada, Velká Británie...) nejvýznamnějším nozokomiálním patogenem, způsobujícím širokou škálu střevních infekcí, od banálních průjmů až po těžké, někdy smrtící enterokolitidy. Důvodem tohoto šíření je zřejmě kromě jiného jejich vysoká odolnost k řadě desinfekčních prostředků a to především díky schopnosti tvorby spor a také vysoký stupeň přirozené i získané rezistence k většině antibiotik. (12)

3.6.4 Mykotická agens

3.6.4.1 Kandidy (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida crusei*)

3.6.4.2 Aspergily (*Aspergillus sp.*, *Aspergillus fumigatus*).

Povrchové formy mykóz lokalizovaných na kůži nebo sliznicích jsou většinou snadno diagnostikovatelné a léčitelné. Riziko ohrožení života ale představují systémové mykózy postihující jeden nebo více orgánů, které navíc mohou zejména v počátečních stádiích probíhat nenápadně a při patrném rozvoji klinických příznaků už může být infekce obtížně terapeuticky ovlivnitelná. (2)

Se systémovou mykotickou infekcí je třeba počítat při dlouhodobém podávání širokospektrých antimikrobních preparátů, agresivní chemo a radioterapi, u transplantovaných pacientů léčených imunosupresivou a vůbec u všech jedinců s významným imunodeficitem zejména v buněčné složce. (2, 10)

3.6.5 Atypická agens

3.6.5.1 Legionely

Představují relativně nové riziko v nemocnicích, kde často izolovány z vodovodních systémů, zvlhčovačů vzduchu, inhalátorů a z klimatizace. Mohou vyvolávat různé klinické formy od lehčích forem připomínajících spíše virovou infekci až po těžké pneumonie s fatálním průběhem. (2,3,8)

3.6.5.2 Chlamydie a Mykoplasmata

Chlamydia pneumoniae a *Mycoplasma pneumoniae* jsou původci atypických pneumonií. Ve zdravotnických zařízeních může spíše výjimečně dojít k jejich nozokomiálnímu výskytu.

3.6.6 Viry

Velkou skupinu tvoří především respirační nákazy vyvolané *virem* *influenzy*, *parainfluenzy*, *adenoviry* a jiné. Jako nozokomiální nákaza se může objevit infekce *virem herpes simplex* nebo *herpes zoster*, zvláště nebezpečná je tato infekce pro novorozence.

Střevní nákazy vyvolané *enteroviry*, *rotaviry* a *parvoviry* jsou z významné z hlediska četnosti a vysoké kontagiozity.

Cytomegalovirus – je nebezpečná především u novorozenců a kojenců či pacientů s rozsáhlými popáleninami u kterých může mít těžký až smrtelný průběh.

Viry hepatitidy, nejčastěji typu B a C, přenášené krví a krevními deriváty

3.6.7 *Staphylococcus aureus* a MRSA

Ve své práci se dále zaměřuji na stafylokoky, konkrétně na kmeny *Staphylococcus aureus*, se závažným fenotypem rezistence tzv. MRSA, které jsou významnými nozokomiálními patogeny se schopností rychlého šíření, zejména v prostředí vysokého selekčního tlaku antibiotik. V současné době tyto kmeny znamenají trvalou hrozbu pro hospitalizované pacienty a je jim proto věnována velká pozornost v odborných kruzích se snahou omezit jejich další výskyt a šíření.

Staphylococcus aureus je obecně vůdčí lidský patogen způsobující širokou škálu onemocnění od banálních kožních forem až po těžké život ohrožující systémové infekce včetně endokarditidy, pneumonie a sepse obecně. (8)

Uplatňuje se jako původce komunitních infekcí stejně jako jeden z nejčastějších vyvolatelů nemocničních infekcí. (4,8)

Kromě vlastního působení v místě infekce mohou být stafylokoky vysoce nebezpečné díky produkci různých toxinů uvolňovanými při kolonizaci nebo infekci hostitele, příkladem je syndrom toxického šoku, který může být způsoben minimálně třemi typy stafylokokovými toxiny. Nepřímou cestou intoxikace je pozření jídla kontaminovaného stafylokoky s produkcí enterotoxinů s následnými gastrointestinálními příznaky. (8)

Kromě značné heterogenity infekcí patří *Staphylococcus aureus* také k velmi adaptabilním mikroorganismům ve smyslu schopnosti získávání a šíření mechanismů rezistence k nejrůznějším skupinám antibiotik. Jestliže ve 40. letech, krátce po objevu a klinické aplikaci penicilinu, byly téměř všechny stafylokoky k penicilinu citlivé, na počátku 60.let, již více než polovina produkovala penicilinázy se schopností hydrolyzovat a tím inaktivovat molekulu penicilinu. Farmaceutický průmysl dokázal rychle reagovat a v relativně krátké době se podařilo vyvinout a uvést do klinické praxe peniciliny (methicilin, oxacillin a další) stabilní k působení beta laktamáz. Nicméně již v roce 1961 je popsán první případ výskytu stafylokoka s rezistencí i k tomuto typu antibiotik, v současnosti označovaný jako MRSA. (13) V průběhu několika let se různé klony MRSA se globálně rozšířily a v mnoha nemocnicích se stal hlavním nozokomiálním

patogenem . V České republice není methicilinové antibiotikum registrováno, ale používá se analogický přípravek, patřící do identické skupiny antibiotik, oxacilin. Podkladem rezistence k této skupině penicilinů není inaktivující enzym, beta laktamáza, ale změna vazebného místa antibiotika, tzv. PBP (penicilin binding protein), což je transpeptidáza mající klíčovou úlohu při kompletaci peptidoglykanu buněčné bakteriální stěny. Mutací podmíněná syntéza alternativní PBP2' znamená ztrátu afinity k penicilinu a bakterie se díky tomu stává k jeho účinku odolná. Závažnost výskytu tohoto fenotypu spočívá ve sdružené rezistenci ke všem beta laktamovým antibiotikům, které jsou doposud v klinickém užívání. Navíc se často, podle typu klonu, kterých je několik, přidružuje rezistence k dalším skupinám antibiotik, nejčastěji makrolidům, linkosamidům, fluorchinolonům, aminoglykosidům a případně dalším. Zatím posledním stupněm ve vývoji rezistence stafylokoků je rezistence k glykopeptidům, které jsou považovány za rezervní přípravky pro léčbu těžkých gram pozitivních infekcí vyvolaných právě vysoce odolnými kmeny nejčastěji stafylokoků nebo enterokoků. Tento fenotyp, tzv. GRSA (glycopeptide resistant *Staphylococcus aureus*) je zatím popisován sporadicky a například v ČR ještě nebyl detekován. (2,10,13)

V posledních letech byly izolovány i komunitní kmeny MRSA, některé z nich se uplatňují jako původci závažných infekcí. MRSA nejsou virulentnější než původní citlivé bakterie druhu *S. aureus*, protože k vyvolání infekce je zapotřebí stejný počet bakteriálních buněk. Pro multirezistenci k antibiotikům a k řadě desinfekčních prostředků je však mnohem obtížnější MRSA eradikovat nebo zcela zničit. (14)

Výskyt MRSA mezi izoláty *Staphylococcus aureus* od hospitalizovaných pacientů ve světě je nejvyšší v USA (zhruba 60%) a v Japonsku (více než 70%). Mezi zeměmi Evropy jsou ve výskytu MRSA značné rozdíly. Aktuální data ze zemí, které se účastní EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), jsou k dispozici na webových stránkách www.earss.rivm.nl. Velká Británie, Irsko, Francie, Portugalsko, Chorvatsko, Itálie, Řecko, Rumunsko a Bulharsko hlásí výskyt MRSA mezi invazivními izoláty *S. aureus* v rozmezí 25 - 50%, země střední Evropy a Španělsko udávají 10 - 25%. Severské země mají tradičně nízký výskyt MRSA, nejpříznivější je situace v Nizozemí, Dánsku a

Švédsku (< 1%). V České republice (ČR) byl v letech 2000 - 2004 zaznamenán vzestupný trend výskytu MRSA (z necelých 4% v roce 2000 na 12,8% v roce 2005). Také se rychle zvyšuje počet nemocnic, kde byl zaznamenán výskyt invazivní infekce vyvolané MRSA (z 11 v roce 2000 na 51 v roce 2005). (14)

4 Metodiky

4.1 Identifikace *Staphylococcus aureus*

4.1.1 Mikroskopie

Základní metodou je barvení podle Grama: gram pozitivní koky tvořící shluky, někdy připomínající hrozny, odtud také pochází název celého rodu řecky „*staphyle*“ (znamená hrozen).

4.1.2 Kultivace

Základním médiem pro kultivaci stafylokoků je krevní agar, na kterém vytvářejí stafylokoky po 18 – 24 hodinové inkubaci bělavé nebo žluté („*aureus*“) kolonie, často obklopené zónou hemolýzy.

4.1.3 Produkce katalázy

Do zkumavky s 3% peroxidem vodíku se ponoří klička s nabranou kulturou. Pozitivní test svědčící pro přítomnost katalázy se projeví unikajícími bublinkami.

4.1.4 Clumping faktor

Pro průkaz vázané koagulázy, neboli „clumping faktoru“ se užívá screenigový latexový test. Z kolonie se připraví na sklíčku hustá suspenze a přidá se kapka komerčního latex aglutinačního testu, dojde-li do 10 sekund k aglutinaci, jedná se o pozitivní test potvrzující přítomnost *S.aureus*. Poslední verze těchto testů vykazují ještě vyšší citlivost díky detekci proteinu A, případně některých povrchových antigenů *S. aureus*. (15)

4.1.5 Volná koaguláza

Reaguje s plasmatickým faktorem za vzniku stafylotrombinu, který katalyzuje změnu fibrinogenu na fibrin. Zkumavkový test, kdy se v citrátové králičí plasmě rozmíchá jedna kolonie a nechá se 4 hodiny inkubovat při 37°C se zjišťuje, jestli došlo k shlukování plasmu. (15)

4.1.6 Hyaluronidázový test

Pro průkaz hyaluronidázy se používá dekapsulační test se kmenem *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*, jehož pouzdra obsahují kyselinu hyaluronovou. K čáře masivně naočkovaného streptokoka, široké asi 1,5 cm, se kolmo očkuje čára testovaného stafylokoka. Test se hodnotí po 18hodinové kultivaci při 37 °C. Pokud stafylokok hyaluronidázu produkuje, vytvoří se v blízkosti jeho linie v mukózním nárůstu *S. equi* patrný půlkruh bez hlenovitého nárůstu svědčící o rozrušení pouzdra (dekapsulaci) (viz obr.1 obrazová příloha). Výsledek je nutné odečíst druhý den ráno, poloměr zóny s dekapsulovaným *S. equi* se s dobou inkubace natolik zvětšuje, že další den již nelze tento test hodnotit. (16)

4.2 Identifikace MRSA

4.2.1 Průkaz MRSA v klinickém materiálu

Naočkování vzorku pacienta na vyhledávací selektivně-diagnostickou půdu s oxacilinem a s vyšší koncentrací NaCl, která podporuje růst MRSA a inhibuje většinu druhů gramnegativních tyčků a další průvodní mikroflóry. V praxi se používají buďto komerční půdy, kde MRSA kmeny vyrůstají v barevně zabarvených koloniích (viz. obr. č. 2 obrazová příloha) nebo si laboratoře připravují vlastní vyhledávací média, na kterých se přítomnost MRSA detekuje prostým růstem, (viz obr.č .3 obrazová příloha).

Metodika je uvedena v tabulkách č. 1. a 2. (17)

Tabulka č. 1 Vyhledávání MRSA ze vzorků – vyhledávací metoda s 2 mg/l oxacilinu (ORSAB Oxoid)

Půda	Živný agar s 5,5% NaCl a 2 mg/l oxacilinu.
Očkování	Vzorek se masivně rozetře na vymezenou výseč vyhledávací půdy. Současně se očkuje na krevní agar se 4% NaCl a na obyčejný krevní agar.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	Hodnotí se růst.
Hodnocení	Růst dvou a více kolonií vede k podezření na MRSA. Obsahuje-li půda manitol a indikátor, půda kolem kolonií <i>S. aureus</i> (MRSA) se zbarví.
Další vyšetření	Izolace kolonií z vyhledávací půdy na krevní agar a inkubace 24 hodin/35°C. Čistá kultura se identifikuje rutinním způsobem (vyšetření produkce koagulázy). Další postup, viz vyšetření citlivosti izolátů.

Tabulka č.2 Vyhledávací metoda s 2 mg/l oxacilinu

Půda	MHA agar s 4-5,5% NaCl a 2 mg/l oxacilinu.
Inokulum	Do fyz. roztoku se rozetře 3-5 kolonií přímo z 24 hodinové kultury vyrostlé na krevním agaru. Dbá se na to, aby byly zastoupeny všechny morfologicky odlišné kolonie.
Koncentrace inokula	Upraví se fyz. roztokem dle stupně 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu.
Očkování	10 ul inokula se rozetře kličkou na povrch agaru (průměr plochy 15 mm) a nechá se zaschnout.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	Hodnotí se růst.
Hodnocení	Růst dvou a více kolonií vede k podezření na MRSA.
Další vyšetření	Vyhledávací metoda s 6 mg/l oxacilinu a další rutinní metoda vyšetření citlivosti.
Ověření MRSA	Latexová aglutinace nebo PCR.

4.2.2 Detekce MRSA v čistých kulturách *S. aureus*

Vyhledávací metoda pro MRSA v kombinaci s alespoň jednou běžně používanou metodou vyšetřování citlivosti (diskovou, diluční). (17)

4.2.2.1 Disková metoda s 1 ug oxacilinu viz tabulka č.3

4.2.2.2 Disková metoda s 30 ug cefoxitinu viz tabulka č.4

4.2.2.3 Diluční mikrometoda viz tabulka č.5

4.2.2.4 E- test pro vyšetření citlivosti k oxacillinu viz tabulka č.6

4.2.2.5 Průkaz PBP2a latexovou aglutinací (MRSA-SCREEN Denka Seiken) viz tabulka č.7

Tabulka č .3 Disková metoda pro vyšetření citlivosti k oxacilinu

Půda	Mueller-Hinton agar.
Inokulum	Do fyz. roztoku se rozetře 3-5 kolonií přímo z 24 hodinové kultury vyrostlé na krevním agaru. Dbá se na to, aby byly zastoupeny všechny morfologicky odlišné kolonie.
Koncentrace inokula	Upraví se fyz. roztokem dle stupně 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu.
Očkování	Roztěr na celou plochu agaru kličkou nebo přelitím a odsátím přebytku.
Disk	Disk s 1 ug oxacilinu se umístí na povrch agaru. Celá plocha disku musí být v kontaktu s agarem.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	Inhibiční zóny se prohlíží ve světle pod úhlem 45°. Pátrá se po nárůstu ojedinelých kolonií nebo povlaku, nejlépe při zvětšení lupou. Průměr zřetelné inhibiční zóny se změří obvyklým způsobem.
Hodnocení	Homorezistentní populace MRSA obvykle nevytváří zóny inhibice. Heterorezistentní populace vytváří zřetelné zóny inhibice s patrným růstem rezistentní subpopulace MRSA v povlaku nebo jednotlivých koloniích. Heterorezistentní populace s extrémně nízkým počtem rezistentních buněk vytváří zóny inhibice jako citlivá populace (≥ 13 mm).
Příčiny chyb	Málo koncentrované inokulum poskytuje falešně negativní výsledky. Příliš koncentrované inokulum může poskytnout falešně pozitivní výsledky.
Další vyšetření	Vyhledávací metoda a diluční mikrometoda nebo Etest.
Ověření MRSA	Latexová aglutinace nebo PCR.

Tabulka č.4 Disková metoda s cefoxitinem pro průkaz MRSA (6)

Půda	Mueller-Hinton agar.
Inokulum	Do fyz. roztoku se rozetře 3-5 kolonií přímo z 24 hodinové kultury vyrostlé na krevním agaru. Dbá se na to, aby byly zastoupeny všechny morfologicky odlišné kolonie.
Koncentrace inokula	Upraví se fyz. roztokem dle stupně 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu.
Očkování	Roztěr na celou plochu agaru kličkou nebo přelitím a odsátím přebytku.
Disk	Disk s 30 ug cefoxitinu se umístí na povrch agaru. Celá plocha disku musí být v kontaktu s agarem.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	Inhibiční zóny se prohlíží ve světle pod úhlem 45°. Pátrá se po nárůstu ojedinelých kolonií nebo povlaku, nejlépe při zvětšení lupou. Průměr zřetelné inhibiční zóny se změří obvyklým způsobem.
Hodnocení	MRSA vytváří inhibiční zóny <27 mm.
Příčiny chyb	Málo koncentrované inokulum poskytuje falešně negativní výsledky. Příliš koncentrované inokulum může poskytnout falešně pozitivní výsledky.
Další vyšetření	Vyhledávací metoda a diluční mikrometoda nebo Etest.
Ověření MRSA	Latexová aglutinace nebo PCR.

Tabulka č.5 Diluční mikrometoda pro vyšetření citlivosti k oxacilinu (9)

Půda	Mueller-Hinton bujón (20-25 mg/l Ca ²⁺ a 10-12,5 mg/l Mg ²⁺) + 2 % NaCl pro oxacilin.
Koncentrace oxacilinu	Osm ředění dvojnásobně geometrickou řadou (od 0,125 mg/l do 16 mg/l).
Inokulum	Do fyz. roztoku se rozetře 3-5 kolonií přímo z 24 hodinové kultury vyrostlé na krevním agaru. Dbá se na to, aby byly zastoupeny všechny morfologicky odlišné kolonie.
Koncentrace inokula	Upraví se fyziologickým roztokem dle stupně 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu.
Očkování	1-5 ul podle typu jehlového inokulátoru.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (nebo jeho kopie CNCTC 5480).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	MIC je koncentrace v první jamce, která inhibuje růst.
Hodnocení	Homorezistentní populace vykazuje zřetelný růst i ve vysokých konc. oxacilinu (>16 mg/l). Heterorezistentní populace se může jevit jako citlivá k oxacilinu.
Příčiny chyb	Málo koncentrované inokulum poskytuje falešně negativní výsledky. Příliš koncentrované inokulum může poskytnout falešně pozitivní výsledky.
Další vyšetření	Vyhledávací metoda.

Tabulka č. 6 E test pro vyšetření citlivosti k oxacilinu (ABBIodisk Solna)

Půda	Mueller-Hinton agar s 2% NaCl.
Inokulum	Do fyz. roztoku se rozetře 3-5 kolonií přímo z 24 hodinové kultury vyrostlé na krevním agaru. Dbá se na to, aby byly zastoupeny všechny morfologicky odlišné kolonie.
Koncentrace inokula	Upraví se fyziologickým roztokem dle stupně 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu.
Očkování	Roztěr 0,2 ml inokula na celou plochu agaru kličkou.
Etest	Proužek s oxacilinem se umístí na agar tak, aby jeho celá plocha byla v kontaktu s agarem.
Inkubace	24 hodin/35°C.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (nebo jeho kopie CNCTC 5480).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Odečítání	Inhibiční zóny se prohlíží ve světle pod úhlem 45° . Pátrá se po nárůstu ojedinelých kolonií nebo povlaku, nejlépe při zvětšení lupou. Mikrokolonie a izolované kolonie se zahrnují k rostoucí kultuře. MIC se odečítá v místě úplné inhibice růstu kolonií, kde okraj inhibiční zóny protíná proužek.
Hodnocení	Homorezistentní populace vykazuje zřetelný růst i ve vysokých konc. oxacilinu (>16 mg/l). Heterorezistentní populace se může jevit jako citlivá k oxacilinu.
Příčiny chyb	Málo koncentrované inokulum poskytuje falešně negativní výsledky.
Další vyšetření	Vyhledávací metoda.
Ověření MRSA	Latexová aglutinace nebo PCR.

Tabulka č. 7 Průkaz PBP2a latexovou aglutinací (MRSA-SCREEN Denka Seiken)

Vyšetřovaný kmen	24 hodinová kultura na živném agaru.
Negativní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivní kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (nebo jeho kopie CNCTC 6271).
Inokulum	2 plné kličky o obsahu 1 ul (2 ul).
Koncentrace inokula	$1,5 \times 10^9$ buněk.
Extrakce PBP2a	K inokulu v mikrozkuhavce se přidají 4 kapky činidla 1.
	Suspenze se povaří po dobu 3 minut.
	Po vyjmutí z lázně se mikrozkuhavka nechá vychladnout pokojové teplotě.
	Přidá se kapka činidla 2 a suspenze se promíchá.
	Suspenze se centrifuguje při nízkých otáčkách (1500g) po dobu 15 min. Supernatant se po centrifugaci odsaje.
Latexová aglutinace	Na podložku se přenese 50 ul supernatantu a promíchá se s 25 ul specifických Ig proti PBP2a značených latexem.
	Na podložku se přenese 50 ul supernatantu a promíchá se 25 ul nespecifických Ig proti PBP2a značenými latexem (negativní kontrola)
Odečítání	Suspenze na podložce se promíchává obvyklým kolébavým způsobem.
	Odečítá se nejdříve po 3 minutách a pak za 15 minut.
Hodnocení	Pozitivní: zřetelná a typická aglutinace (vytvoření shluků v čiré tekutině).
	Negativní: nezřetelná, nejasná aglutinace ve zkalené tekutině.
Interpretace	MRSA – aglutinace jen se specifickými Ig pro PBP2a.
	MRSA negativní – žádná nebo netypická aglutinace.
	Nemožno interpretovat – aglutinace s negativní kontrolou.
Příčiny chyb	Ingredience nebyly před použitím řádně protřepány.
	Mikroorganismus není <i>S. aureus</i> .
	Suspenze nebyla ve vodní lázni 3 minuty (prodloužení této doby snižuje senzitivitu, zkrácení doby je příčinou nespecifické aglutinace).
	Supernatant obsahoval sediment-buněčnou drť (nespecifická aglutinace).
Ověření MRSA	PCR.

V laboratořích Ústavu lékařské mikrobiologie se pro detekci MRSA používají výše popsané vyhledávací testy (půda s obsahem NaCl a oxacilinu), diskové difusní testy, stanovení MIC mikrodiluční metodou a ke konfirmaci, či vyloučení nejednoznačných nálezů pak průkaz *mecA* genu latexovou aglutinací firmy Denka Seiken.

V rámci určování citlivosti stafylokoků k jednotlivým antibiotikům diskové difusní metodou se již v základní sestavě testuje oxacilin i cefoxitin.

5 Experimentální část

V roce 2006 v Ústavu lékařské mikrobiologie bylo u 4682 pacientů izolováno 8756 kmenů *S. aureus*.

Z 4682 *S. aureus* bylo identifikováno 578 kmenů MRSA u 131 pacientů a z toho bylo 17 pacientů nosičů MRSA z předchozích let, ale s další hospitalizací.

V tabulce č.8. je srovnána citlivost jednotlivých metod použitých pro průkaz MRSA

Tabulka č.8 Senzitivita metod k průkazu MRSA

	Počet vyšetřených stafylokoků	Počet identifikovaných MRSA	Počet ověřených MRSA*	% citlivosti testu
Půda s 2mg/l oxacilinu	3 905	417	425	98,1 %
Disková metoda s 1 ug oxacilinu	4 680	515	550	93,6 %
Disková metoda s cefoxitinem	4 680	550	550	100 %
Diluční mikrometoda	695	236	250	94,4 %

* kmeny MRSA confirmovány průkazem *mecA* genu (Denka Seiken)

Graf č. 1 srovnání celkového počtu pacientů s nálezem *S.aures* (4 682) a počtu nově izolovaných MRSA (131) v roce 2006, které tvořily 2,8 % všech kmenů *S.aures*

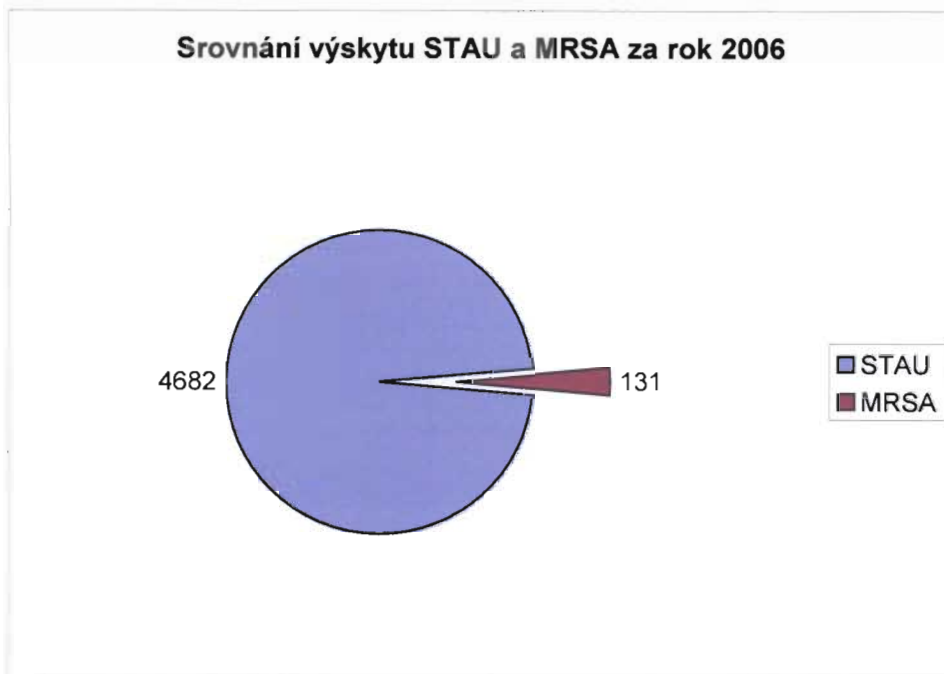
Grafu č.2 zastoupení výskytu MRSA na jednotlivých odděleních FN v Motole

Graf č. 4 analýza záchytu MRSA v biologickém materiálu

Graf č. 5 výskyt nově zachycených izolovaných kmenů MRSA v letech 2001-2006

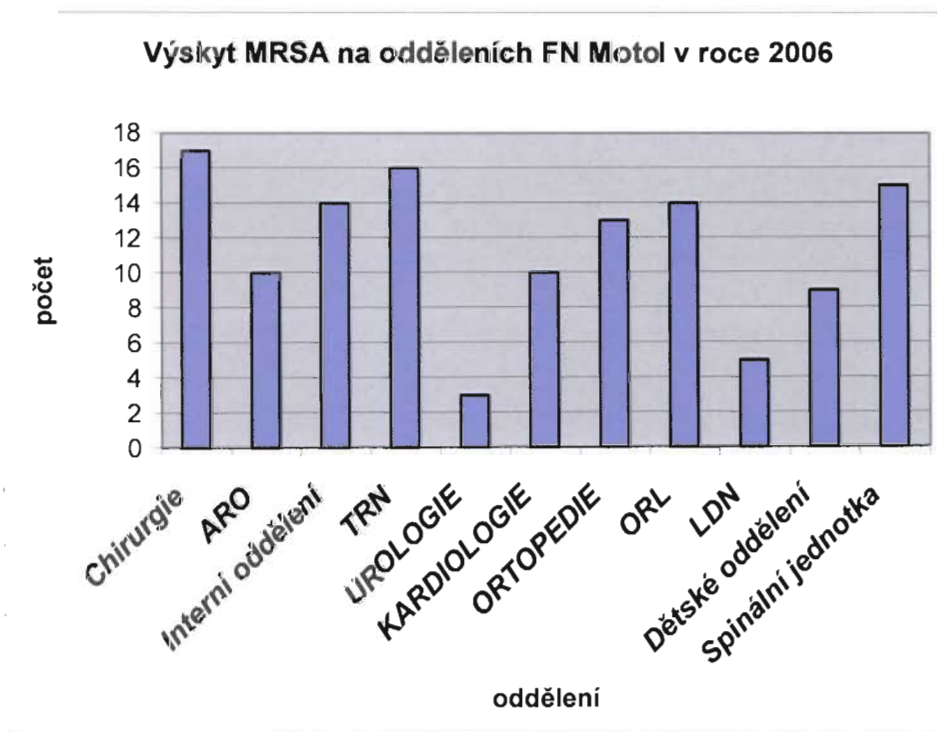
Graf č.1

Podíl MRSA k celkovému počtu izolovaných kmenů *S. aureus*



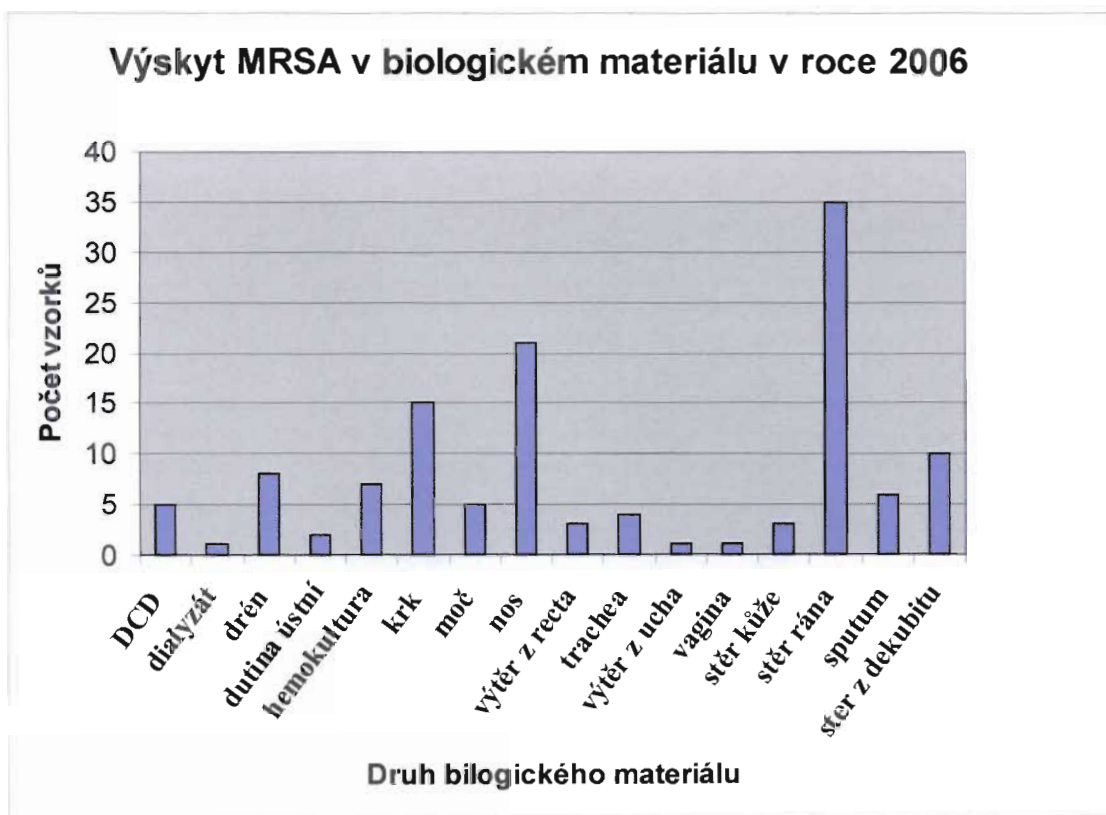
Graf č.2

Výskyt MRSA na jednotlivých odděleních.



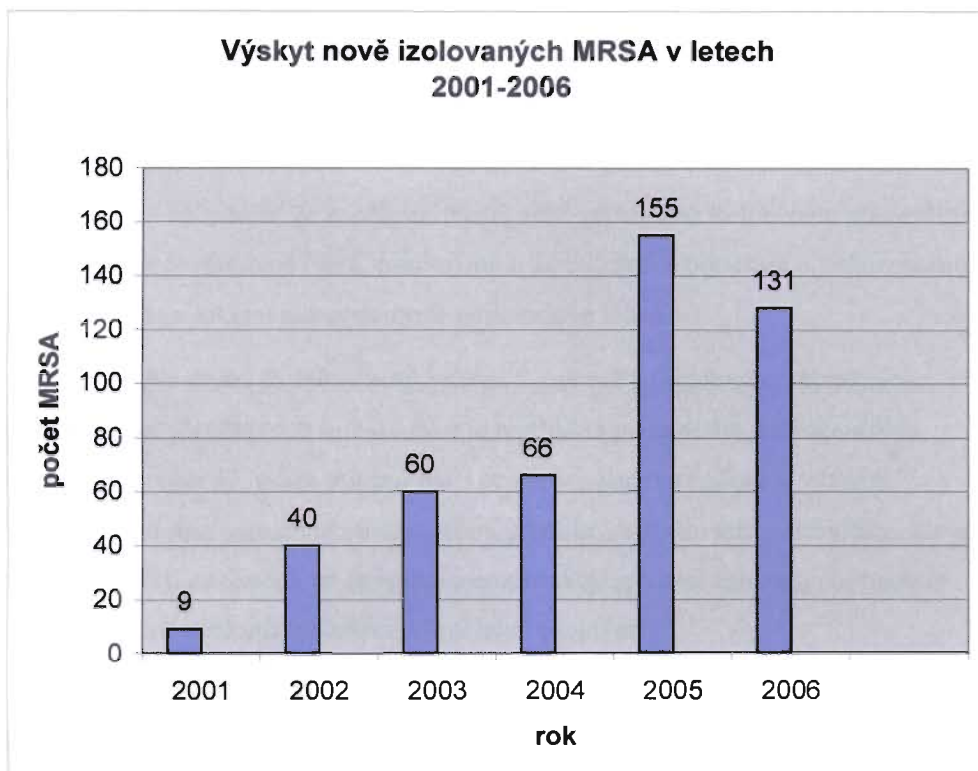
Graf č.3

Výskyt MRSA podle druhu biologického materiálu



Graf č.4

Sledování výskytu nově zachycených izolovaných kmenů MRSA v letech 2001-2006



6 Diskuze

Stafylokoky patří z hlediska infekčních komplikací k nejčastějším původcům širokého spektra infekcí. Je třeba ale zdůraznit, že ne každá kultivace *S. aureus* znamená infekci, a proto je vždy nezbytná adekvátní interpretace nálezu vztahená ke konkrétnímu pacientovi včetně lokalizace nálezu a případných klinických projevů.

Je známo, že například trvalá nebo přechodná kolonizace především nosní sliznice je relativně častá, minimálně u 20 % zdravé populace a jednoznačně není důvodem k lokální ani systémové antibiotické léčbě.

Na druhé straně včasný průkaz *S. aureus* jako původce závažných mnohdy život ohrožujících infekcí jako je například pneumonie, endokarditida, septický stav obecně, může mít pro další prognózu pacienta zásadní význam, protože mimo jiné umožňuje cílenou léčbu protistafylokokovými antibiotiky, která má vyšší naději na úspěch ve srovnání s empirickou aplikací založených mnohdy na zcela pro etiologii typických klinických projevech.

Objevení se MRSA na počátku 60. let a jeho rychlé rozšíření zejména v nemocničním prostředí přinesl v posledních letech řadu komplikací z hlediska zvýšené mortality a morbidit a s tím související zvýšením nákladů na léčbu, diagnostiku a preventivní opatření.

Mimo jiné znamenalo přehodnocení stávající strategie léčby stafylokokových infekcí. Základní protistafyloková antibiotika se stala neúčinná a bylo třeba hledat nové přípravky s ověřeným účinkem pro široké užití.

Jak potvrzují i dílčí data z našeho sledování šíření MRSA je pravděpodobnější na odděleních, kde jsou těžcí pacienti (JIP, ARO, spinální jednotka...), svou roli zde jistě sehrává selekční tlak antibiotik a stupeň imunosuprese nemocného

Lokalizace MRSA přináší podstatnou informaci pro celkové posouzení závažnosti nálezu s následnou strategií případné léčby.

Jak je uvedeno výše bakteriologická diagnostika stafylokoků zahrnuje řadu kroků, kombinací metod, cílených k rychlému a co nepřesnějšímu ověření

S. aureus, který je ve vztahu k ostatním, koaguláza negativním stafylokokům skutečným významným patogenem.

Rozšíření MRSA v nedávné minulosti a hlavně současnosti pak přirozeně přineslo další požadavek rychlé a přesné detekce tohoto závažného fenotypu rezistence.

V laboratorních doporučeních lze celosvětově nalézt širokou škálu nejrůznějších metod stanovení citlivosti sloužících k průkazu MRSA a je s podivem, že do dnešní doby neexistuje obecná shoda ve výběru optimálních testů, ba naopak různé literární prameny poskytují mnohdy až navzájem konfliktní informace ohledně citlivosti a spolehlivosti jednotlivých metod. Vysvětlením mohou být do jisté míry lokální rozdíly ve výskytu různých klonů, které se liší nejenom v citlivosti k různým antibiotikům, ale v citlivosti k podmínkám, kterými lze ovlivnit expresi *mecA* genu kódujícího PBP2a. Těmito podmínkami jsou například prodloužená inkubace, vyšší teplota inkubační teplota nebo koncentrace NaCl. Z toho faktu jednoznačně vyplývá, že laboratorní diagnostiku MRSA nelze založit pouze na jedné reakci, riziko falešně negativního výsledku se tak zvyšuje.

Lokální zkušenosti s laboratorní diagnostikou MRSA jsou proto velmi cenné jak pro možnost srovnávání s jinými pracovišti, tak hlavně z důvodu optimálního využití jednotlivých metod a jejich správné interpretace. Svůj význam má i výběr finančně dostupných reakcí, příkladem může být využití PCR pro přímou detekci MRSA, které je bezesporu velmi citlivou a rychlou metodou, nicméně pro rutinní použití z důvodů ceny jednoho komerčního testu (kolem 500,- Kč), zatím nelze uvažovat o masivním využití.

Naše výsledky ukazují na citlivost základních vyhledávacích i částečně ověřovacích metod..

Kombinace pudy s oxacilinem a stanovení diskové citlivosti (oxacilin, cefoxitin) se podle našich zkušeností ukazuje jako zcela postačující, ekonomicky únosný přístup. U klinicky významných izolátů je možno určit MIC i pro ověření citlivost k dalším antibiotikům a MRSA konfirmovat průkazem *mecA* genu, který by měl také vyloučit spíše ojedinělý fenomén hyperprodukce stafylokokové penicilinázy, s kterým může být fenotyp MRSA zaměněn.(17)

Věrohodný průkaz MRSA je tedy prvním základním krokem, od kterého se odvíjí další interpretace ve smyslu odlišení kolonizace a průkaz klinicky významných izolátů, cílená léčba a efektivní epidemiologická opatření. Dobře fungující databáze izolovaných MRSA na mikrobiologické laboratoři, včasné hlášení na příslušné oddělení, stejně jako hygienické složce jsou další podmínky, bez kterých nelze zabezpečit prevenci dalšího šíření závažných nosokomiálních patogenů a MRSA především.

Tento, podle našeho mínění dobře fungující systém lze považovat za jeden z hlavních důvodů, že za rok 2006 bylo určeno méně nových nosičů MRSA, ve srovnání s předchozím rokem 2005 (2005 počet 155 kmenů a v roce 2006 pouze 131).

Nelze opominout případy MRSA importované z komunity nebo častěji jiných zdravotnických zařízení, jejich včasné podchycení a následná protiepidemická opatření hrají podstatnou úlohu v dalším šíření.

Dostupnost nemocniční směrnice věnující se problematice MRSA na lokálním intranetu je také velmi důležitým nástrojem prevence na lokální úrovni zdravotnického zařízení.

Jestliže se v celorepublikovém průměru stále zvyšuje počet izolátů invazivních MRSA, a tomu odpovídá i meziroční srovnání v motolské nemocnici v období 2001 – 2004. Naopak lokální výsledky za rok 2006 ukazují na prozatím zastavení tohoto nepříznivého trendu, což jasně svědčí o efektivnosti informačního a protiepidemického systému ve FN v Motole. Mikrobiologické oddělení v tom má bezesporu svoji zásluhu.

Velkým problémem zůstává eliminace nosičských kmenů MRSA, a to zejména ve vztahu k možnému přenosu na rizikové pacienty, u kterých mohou vyvolat závažnou infekci. V tomto směru neexistuje zaručený postup, a např. celkové podávání antibiotik je účinné jen z části, málokdy trvale a z epidemiologického pohledu je nežádoucí. I tady sehrává bakteriologická laboratoř svoji významnou úlohu v monitorování nosičů MRSA v nemocnici.

7 Závěr

Nosokomiální nákazy představují jednu z velkých medicínských výzev současné medicíny. Ztráty, které NN přináší jsou ohromné a mnohdy zcela znehodnocují výsledky i těch nejprogresivnějších, život zachraňujících výkonů.

MRSA je pak jedním z klíčových, v mnoha zemích vůdčích nosokomiálních patogenů. Jeho spolehlivá laboratorní detekce a navazující kaskáda léčebných a preventivních algoritmů jsou proto neodmyslitelnou součástí komplexního systému zaměřeného k zábraně šíření nosokomiálních mikroorganismů.

Ve své práci jsem chtěla ukázat možnosti, výstupy, konsekvence, úskalí a také určité perspektivy fungování laboratorní diagnostiky MRSA v prostředí velké nemocnice.

8 Souhrn

Bakalářská práce shrnuje význam a prevenci nozokomiálních nákaz se zaměřením na (MRSA). V teoretické části jsou rozebrány způsoby přenosu NN, jednotliví původci NN společně s bránami vstupu infekce.

MRSA jako významný nozokomiální patogen představuje riziko závažných infekcí pro hospitalizované pacienty. Jeho laboratorní průkaz zahrnuje kombinaci různých metod pro dosažení co nejvyšší spolehlivosti detekce a následnou účinnou léčbu a prevenci dalšího šíření.

V experimentální části jsou prezentovány výsledky sledování výskytu MRSA za rok 2006, které jsou příznivé i ve srovnání s minulými lety. Ukazuje se, že důsledná mezioborová spolupráce je podmínkou účinných postupů zamezujících dalšímu šíření MRSA v velké nemocnici.

Summary

Bachelor's work summarises the importance and prevention of nosocomial infections (NN) and is focused on MRSA. In theoretical part analysed modes of transmission of NN, single causative agents of NN together with their portals of entry.

MRSA as important nosocomial pathogen constitutes a risk factor of severe infections for hospitalised patients. Its lab diagnostics contains combination of various methods to achieve the maximal (highest) fidelity of detection and following efficient therapy and prevention of farther spread.

In the experimental part are presented results of observation of MRSA cases in 2006, what are favourable while being compared with previous years. It has been indicated that uncompromising interdisciplinary cooperation is the condition of efficient approaches preventing farther spread of MRSA in large hospital facility.

9 Použitá literatura.

1. Dostupné z URL : <http://www.linet.cz/zdravotnicka-technika/o-spolecnosti/casopis-komfort/komfort-3-2004/26766/nemocnicni-infekce-zabijeji-miliony-lidi-a-stoji-miliardy-dolaru>
2. Mayhall,G.C.et al.: Hospital Epidemiology and Infection Control.3th ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, 2004
3. Šrámová,H et al.: Nozokomiální nákazy 2.Praha,Maxdorf Jessenius,2001
4. Šrámová, H. et al.: Nozokomiální nákazy. Praha, Maxdorf Jessenius, 1995
5. Kolář,M.,Antibiotická léčba nozokomiálních infekcí.Praha,TRITON, 2000
6. Teplan, V., Horáčková, M., Běbrová, E. et al : Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětském věku. Praha, Grada, 2004
7. Ševčík, P. et al.: Záněty plic v intenzivní medicíně.Praha. Galén, 2004
8. Votava, M.: Lékařská mikrobiologie obecná. Brno, Neptun, 2001
9. Schindler, J. Mikrobiální biofilm. Vesmír 2001; 80(4): 203 -206
10. Wenzel, R., Brewer,T., Bultzer, J.P. et all.: Infection Control in the Hospital. 3ht ed.Boston. International Society for Infectious Diseases, 2004
11. Vávrová et al. : Cystická fibróza. Praha, Grada, 2006
12. Pepin, J. : Improving the Treatment of Clostridium difficile – Associated Disease : Where Should We Start ?. Clin.Inf. Dis. 2006; 43
13. Nyč, O.: Stafylokoky – některé aspekty rezistence k oxacilinu. Remedia- Klinická mikrobiologie. 1999;3 (2)
14. Bergerová, T. et al. : *Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních.* Dostupné z URL: <http://www.cls.cz/projekty.htm>
15. Votava, M et al. : Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii.Brno,Masarykova universita v Brně, 2000
16. Andrysík, T., Machová,I., Petráš, P. et al. : Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2004; 13(5)

17. Pracovní skupina pro metody vyšetřování antibiotické citlivosti (PSMVAC)*,
Pracovní skupina pro monitorování rezistence, NRL pro antibiotika, SZÚ Praha.:
Mikrobiologický průkaz kmenů MRSA, GISA A GRSA. Zprávy CEM (SZÚ,
Praha) 2003; 12(4):164-171.

10 Seznam tabulek

Tabulka č.1 :Vyhledávání MRSA ze vzorků – vyhledávací metoda s 2 mg/l oxacilinu (ORSAB Oxoid)	23
Tabulka č.2 : Vyhledávací metoda s 2 mg/l oxacilinu	23
Tabulka č.3 : Disková metoda pro vyšetření citlivosti k oxacilinu	25
Tabulka č.4 : Disková metoda s cefoxitinem pro průkaz MRSA	26
Tabulka č.5 : Diluční mikrometoda pro vyšetření citlivosti k oxacilinu	26
Tabulka č.6 : E test pro vyšetření citlivosti k oxacilinu (ABBIodisk Solna)	27
Tabulka č.7 : Průkaz PBP2a latexovou aglutinací (MRSA-SCREEN Denka Seiken)	28
Tabulka č.8 : Senzitivita metod k průkazu MRSA	29

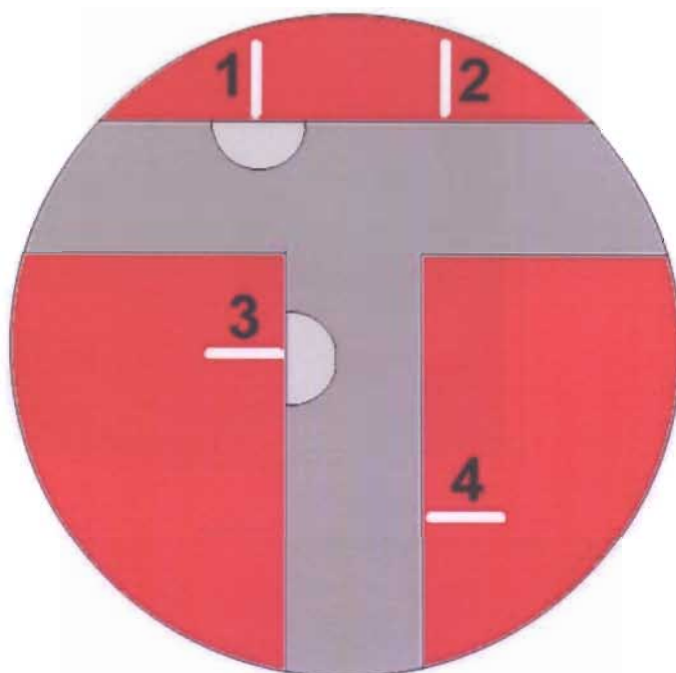
11 Seznam grafů

Graf č.1: Podíl MRSA k celkovému počtu izolovaných kmenů <i>S. aureus</i> _____	30
Graf č.2: Výskyt MRSA na jednotlivých odděleních_____	30
Graf č.3: Výskyt MRSA podle druhu biologického materiálu_____	31
Graf č.4: Sledování výskytu nově zachycených izolovaných kmenů MRSA v letech 2001 2006_____	32

12 Obrazová příloha

Obr. č.1 Kresba: T. Andryšik (16)

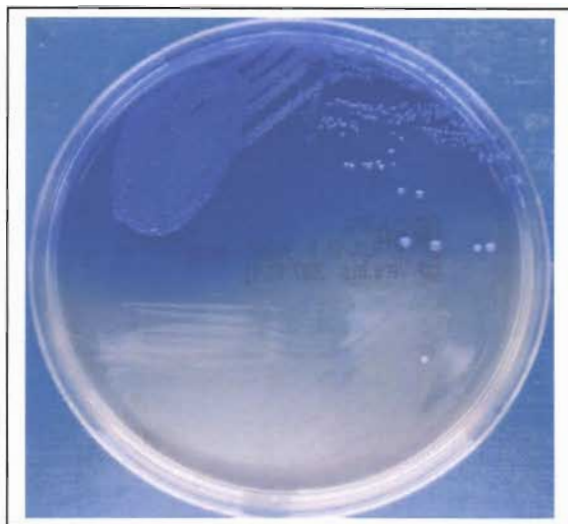
Schéma : Průkaz hyaluronidázy pomocí dekapsulace *S. equi* – schéma testu



- inokulační čára 1. - pozitivní kontrola kmen *S. aureus*
inokulační čára 2. - negativní kontrola kmen *S. epidermidis*
inokulační čára 3. - testovaný kmen - pozitivní
inokulační čára 4. - testovaný kmen - negativní

Obr.č. 2

Vyhledávací půda k průkazu MRSA (ORSAB Oxoid)
MRSA kmen (horní polovina plotny) a *S.aureus* citlivý k oxacilinu (negativní
nález v spodní polovině plotny)



Obrč. 3

Vyhledávací půda k průkazu MRSA s oxacilinem zhotovená laboratoří.
MRSA kmen je v horní výseči, ostatní stafylokoky citlivé k oxacilinu jsou
inhibovány.

