

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* - MRSA**

**Ludmila Kamiňská**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Barbora Voxová**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

## **Poděkování**

Děkuji PharmDr. Barboře Voxové za čas, velikou ochotu ale i za poskytnuté studijní materiály a za cenné rady, které mi velice pomohly při psaní této práce. Mé poděkování patří i vedení pracoviště klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové za ochotné poskytnutí screeningových výsledků. Dále bych chtěla poděkovat svému otci, bez kterého by mi studium nebylo umožněno, a tuto práci bych tak neměla možnost nikdy napsat.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15.5.2023

---

Ludmila Kamiňská

# OBSAH

1.	ABSTRAKT.....	6
2.	ABSTRACT.....	7
3.	ÚVOD.....	8
4.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
5.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
5.1.1	Morfologie.....	11
5.1.2	Patogeneze.....	12
5.1.3	Klinický obraz.....	14
5.2	MRSA.....	17
5.2.1	Přenos.....	17
5.2.2	Klasifikace.....	18
5.2.3	Aspekty rezistence k oxacilinu.....	21
5.2.4	Mechanismus rezistence.....	22
5.3	Historie.....	24
5.3.1	MRSA ve světě.....	26
5.3.2	MRSA v České republice.....	27
5.4	Terapie.....	28
5.4.1	Terapie oxacillin rezistentních kmenů.....	30
5.4.2	Rizikové faktory.....	30
5.5	Diagnostika.....	32
5.5.1	Metody diagnostiky.....	32
5.5.2	Laboratorní detekce oxacillin rezistentních kmenů.....	35
5.5.3	Diagnostika u těhotných žen a novorozenců.....	36
5.6	Prevence.....	37
5.6.1	Screening.....	39
5.6.2	Ochrana personálu v nemocnici.....	41
6.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	42
7.	VÝSLEDKY.....	43
7.1	Provedené testy.....	43

7.2	Místa odběru .....	43
7.3	Počet a pohlaví pacientů .....	44
7.4	Věk pacientů .....	45
7.5	Pozitivita na odděleních.....	46
8.	DISKUSE .....	50
9.	ZÁVĚR.....	52
10.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	53
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	54
12.	SEZNAM GRAFŮ.....	54
13.	POUŽITÁ LEITERATURA.....	55

# 1. ABSTRAKT

Autor: Ludmila Kamiňská

Název: Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* - MRSA

Bakalářská práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Tato práce popisuje infekční nozokoniální kmen bakterie *Staphylococcus aureus*, který je rezistentní nejen k meticilinu, a celé skupině  $\beta$ -laktamových antibiotik, ale je také zkříženě rezistentní k několika dalším strukturálně podobným antibiotikům. Tato rezistence je zajišťovaná nadměrně hrubou bakteriální stěnou tvořenou alternativním PBP 2a proteinem. Text dále popisuje mechanismus a přenos rezistence na *mec* genech mezi bakteriemi, aspekty rezistence, klasifikaci kmenů, metody průkazu, možnosti terapie a prevence onemocnění MRSA. Popisuje přenos a historii bakterie v České republice i ve světě.

V druhé části jsou porovnány a zhodnoceny výsledky screeningu MRSA z Ústavu Klinické Mikrobiologie (ÚKM) Fakultní nemocnice Hradec Králové za časový úsek od roku 2019 do 2022 s výsledky z odborných publikací a databází. Tento úsek porovnává počet provedených a pozitivních testů, dále počet, pohlaví a věk pozitivních pacientů, odebírané materiály a prevalenci pozitivivity na jednotlivých nemocničních odděleních.

**Klíčová slova:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, HA-MRSA, CA-MRSA, LA-MRSA, nozokomiální nákazy, laboratorní diagnostika, antibiotika,  $\beta$ -laktamová antibiotika, antibiotická rezistence, oxacilin, nazální nosičství, penicilin vážící bílkovina, PBP 2a, SCCmec

## 2. ABSTRACT

Author: Ludmila Kamiňská

Title: Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA

Bachelor thesis

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Field of study: Healthcare laboratory diagnostics

This work describes an infectious nosocomial strain of *Staphylococcus aureus* resistant not only to methicillin and the entire group of  $\beta$ -lactam antibiotics, but also cross-resistant to several other structurally similar antibiotics. Resistance is provided by its excessively strong bacterial wall formed by an alternative PBP 2a protein. This thesis describes mechanisms and resistance transfer through *mec* genes between bacteria, aspects of resistance, classification of strains, detection methods, possibilities of therapy and prevention of MRSA induced diseases. Transmission and history of the bacteria in Czech Republic and the world are described next.

Second part of this thesis contains results of the MRSA screening from the Institute of Clinical Microbiology of Hradec Kralove University Hospital for the period from 2019 to 2022. Results are compared and evaluated with results from professional publications and databases. This section compares number of conducted and positive tests, total, gender and age of positive patients, types of collected materials and the prevalence of positive results in individual hospital departments.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, HA-MRSA, CA-MRSA, LA-MRSA, nosocomial infections, laboratory diagnostics, antibiotics,  $\beta$ -lactam antibiotics, antibiotic resistance, oxacillin, nasal carriage, penicillin-binding protein, PBP 2a, SCCmec

### 3. ÚVOD

Stafylokoky patří k nejrozšířenějším kmenům bakterií po celém světě. Penicilinázu produkující rezistentní kmeny se objevily již po zavedení penicilinu před padesáti lety. Jejich výskyt byl ojedinělý, netrvalo to však dlouho, a stal se z nich globální epidemiologický problém, na který zareagovala Světová zdravotnická organizace programem pro snížení výskytu rezistence. Stafylokoky produkují celou řadu odolných toxinů, které způsobují rozličné infekce – od drobných s lehkým průběhem přes peritonitidy, pneumonie, bakteriémie a endokarditidy až po syndrom toxického šoku a celkové systémové sepsy. Velkým rizikovým faktorem je přítomnost cizího tělesa, močového katetru nebo chlopenní náhrady v pacientově těle na kterých má bakterie schopnost tvořit biofilmy, asymptomaticky přežívat a čekat na pokles imunity hostitele. Jiné kmeny *Staphylococcus aureus* jsou součástí přirozené mikroflóry některých sliznic člověka a jsou schopny vyvolat onemocnění jen při poklesu nebo při záměrném potlačení imunity jedince.

Jednou z nejčastějších příčin nemocničních a komunitních infekcí je právě MRSA, která disponuje odolností na celou řadu  $\beta$ -laktamových antibiotik, včetně penicilinu a meticilinu. Vysokou rezistenci způsobuje mutace nebo získání *mec* genu produkujícího alternativní protein PBP 2a, který je zodpovědný za tvorbu nadměrně silné stěny bakterie. Obzvláště nebezpečná je schopnost bakterie předávat geny rezistence vertikální i horizontální cestou na jiné bakterie a tím tvořit větší a silnější rezistentní populaci. Rezistentní bakterie se přenáší kontaktem s nakaženým člověkem či infekčním materiálem, jisté kmeny se mohou přenášet i antropozoonózou z chovných zvířat na člověka. Mezi nejčastější metody diagnostiky pro screening MRSA patří díky nízké časové náročnosti real-time PCR a další molekulární testy, vyšetření se provádí ze vzorku odebraného přímo z rány, hemokultur, výtěrů z nosu, krku, perinea, axil ale i jiných materiálů.

Tato práce je rozdělena na úsek teoretický a praktický. Teoretická část této práce je rozdělena na šest podkapitol, ve kterých jsou detailně rozebrány jednotlivé problematiky. První část je zaměřena na rod bakterie, její morfologii, patogenezí a klinický obraz. Druhá část se věnuje klasifikaci, přenosu, mechanismům a aspektům rezistence bakterie k oxacilinu. Následující část přibližuje historii a šíření rezistentní bakterie od začátku výskytu v České republice i ve světě, následně popisuje terapii infekcí, větší část práce je pak zaměřena na diagnostiku rezistentních i citlivých bakterií zlatého stafylokoka, poslední, šestá kapitola, objasňuje techniky prevence jak jednotlivce, tak i zdravotnického pracovníka.

Praktická část obsahuje zpracované výsledky screeningu MRSA z let 2019 až 2022 poskytnuté pracovištěm klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Výsledky jsou zpracovány v grafech a v závěru porovnány s odbornou literaturou a s informacemi z lékařských databází.



## 4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je poskytnout dostatečné množství informací a ze sumarizování odborných publikací o meticilin rezistentním zlatém stafylokokovi, v jednotlivých kapitolách popsat jeho morfologii, projevy a nemoci, charakterizovat rizikové skupiny pacientů nebo jiné choroby rizikové pro onemocnění, přiblížit čtenáři přenos, klasifikaci a mechanismy vzniku a přenosu rezistence meticilin rezistentních bakterií zlatého stafylokoka, i její původ a historii v České republice a ve světě. V diagnostické části objasnit možnosti diagnostiky citlivých i rezistentních stafylokoků a způsob diagnostiky u těhotných žen a novorozenců. V neposlední řadě se zaměřit i na způsob prevence rezistentních onemocnění, kontrolních opatření v nemocnici, na pracovištích i v laboratořích a oznámit využití screeningu pacientů pro prevenci a monitorování šíření tohoto původce onemocnění.

Cílem praktické části je porovnání a v závěru zhodnocení výsledků screeningu MRSA z období čtyř let (2019–2022) z Ústavu Klinické Mikrobiologie (ÚKM) Fakultní nemocnice Hradec Králové s výsledky, které uvádí publikovaná odborná literatura. Zaměřit se na poměr pozitivních a negativních vzorků pacientů v jednotlivých letech, zhodnotit pohlaví a věk pozitivních osob a prevalenci na jednotlivých odděleních a klinikách FNHK.

## 5. TEORETICKÁ ČÁST

### 5.1 *Staphylococcus aureus*

Mezi nejhojnější zástupce gram pozitivních koků patří rod *Staphylococcus*, který zahrnuje dalších 30 aerobních nebo fakultativně anaerobních rodů, vyskytujících se ve shlucích nebo jednotlivě, ojediněle i v páru, nebo v krátkých řetězcích. Buňky nemají schopnost pohybu, patří mezi neodolnější nesporulující bakterie, většina rodů je kataláza-pozitivní. Stafylokoky jsou fylogeneticky příbuzné rodu *Streptococcus*, dále jsou příbuzné rodům *Lactobacillus* a *Bacillus*. Až polovina těchto bakterií je primárně nebo oportunně patogenní. Kvůli svému nozokoniálnímu charakteru představují stafylokoky a jejich infekce vážný epidemiologický problém celého světa. [1,6]

Stafylokoky můžeme rozdělit podle přítomnosti koagulázy na dvě velké skupiny – koaguláza-negativní a koaguláza-pozitivní stafylokoky. Koaguláza-negativních stafylokoků je podstatně více, zastupují jednu z hlavních složek mikroflóry člověka. Tato skupina stafylokoků bývá původcem infekčních onemocnění velice ojediněle. Koaguláza-pozitivní stafylokoky produkující koagulázu – enzym, který je schopen přeměnit fibrinogen na fibrin a vytvořit tak kolem stafylokoků odolný obal, který je chrání před fagocytózou, antibiotiky nebo protilátkami. Zabezpečuje jim delší přežívání, zvyšuje jejich patogenitu a pomáhá při identifikaci dané bakterie. Reprezentují primární nebo oportunní patogeny. Primární zájem u koaguláza-pozitivních stafylokoků je zaměřen právě na *S. aureus* subsp. *Aureus* ale i *S. lugdunensis* a *S. schleiferi*, které mají jenom vázanou koagulázu, ale jsou stále významnými patogeny pro člověka. [1,6]

Stafylokoky produkují kolem 22 enterotoxinů s vlastnostmi superantigenů. Všechny jsou termostabilní a odolné proti enzymatickému rozkladu v gastrointestinálním traktu. Podle enterotoxinů můžeme stafylokoky rozdělit do skupin. Nejběžnější původci otrav z potravin se řadí ke skupině A, často se vyskytují v kombinaci s běžnou skupinou D z kontaminovaných mléčných produktů. Vzácné jsou stafylokoky skupiny B, která je spojena se stafylokokovou enterokolitidou, skupina C z kontaminace mléčných potravin a skupina E superantigen TSST 1 nejsou spojeny s kontaminací potravin. [1]

Rod *Staphylococcus aureus* je jedním z hlavních bakteriálních lidských patogenů. Infekce jsou běžné jak v komunitách, tak v nemocničním prostředí. Jméno získal po svých karotenoidem zbarvených oranžových koloniích. *Staphylococcus aureus* je součástí přirozené mikroflóry lidského těla na kůži a sliznicích, u většiny zdravých jedinců nevyvolává onemocnění. Pokud dojde k vytvoření brány pro vstup infekce do organismu, např. mikrotraumatem sliznice nebo

kůže, jsou tyto bakterie pak schopny vyvolat onemocnění zprostředkované jejich toxiny nebo způsobit invazivní infekce postihující rozličné struktury. Imunitní odpovědi se vyhýbají produkcí antifagocytárního pouzdra, tvorbou protilátek a biofilmu. Produkují superantigeny které jsou důležitým faktorem virulence u syndromu toxického šoku a endokarditidy. [1,8]

### 5.1.1 Morfologie

Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní nepohyblivé grampozitivní bakterie s velikostí přibližně 1  $\mu\text{m}$ . Mají typicky kulovitý tvar, který jim dává jejich buněčná stěna. Vyskytují se převážně samostatně nebo v shlucích tvaru hroznu. Netvoří spory. Představují dominantní část mikroflóry na sliznicích savců i ptáků. V diagnostice rodu *Staphylococcus* se běžně využívá pozorování gramovým barvením obarvených usmrcených bakterií mikroskopicky, v celkovém tisíc násobném zvětšení. Jejich pozitivitu určuje hrubší vnější buněčná stěna i cytoplazmatická membrána. Buněčná stěna je asi 20nm silná, složená z makromolekul peptidoglykanu (mureinu nebo gklykopeptidu) které jsou pospojované a tvoří oligopeptidy – ty zabezpečují její pevnost, sílu i omezenou elasticitu, u grampozitivních bakterií obsahuje buněčná stěna navíc i kyselinu teichoovou. Buněčnou stěnu syntetizují enzymy zvané transpeptidázy, které jsou schopny vázat na svůj povrch penicilin díky svým PBP – penicillin binding proteins. Pokud dojde k vazbě penicilinu na transpeptidázy, dojde k inaktivaci a k inhibici růstu buněčné membrány. Stěna pro buňku představuje mechanickou ochranu, odolává osmotickému tlaku vnějšího prostředí a určuje její tvar. Bez buněčné stěny buňka praskne. Obsahuje enzymy syntetizující buněčnou stěnu a enzymy permeázy, které umožňují selektivní transport malých, do 1nm velkých, molekul živin do buňky i katabolitů z buňky ven. Pokud na grampozitivní buňku působí enzym lysozym, stane se z ní protoplast. Vyšší zvětšení, než je to mikroskopické, pro pozorování struktury buňky je umožněno použitím elektronového mikroskopu, využívajícího elektrony s nižší vlnovou délkou, které bakterií buď prochází, nebo se od ní odráží. Elektronová mikroskopie je využívána k pozorování detailů buněk. Při pozorování se nepoužívají běžné barvicí techniky, ale techniky založené na zabránění propouštění elektronů pomocí solí těžkých kovů. Jedná se o tzv. negativní barvení. Povrch objektu mikroskopu je potažen tenkou vrstvou kovu, např. platiny, pozorovaný objekt se znázorňuje plasticky trojrozměrným obrazem, použitím rastrovací elektronové mikroskopie. [1,5,8]

Genetická informace je uložena v bakteriálním chromozomu, jediné uzavřené molekule dvouvláknové DNA stočené do klubka, která se stabilizuje třemi bílkovinami. Tvoří útvar zvaný nukleoid, obsahující v malém množství i RNA. Soubor všech chromozomů vně bakteriální buňky se jmenuje genom. Genetická informace se nachází i v plazmidu – kruhové molekule DNA, která se množí nezávisle na chromozomu. [1]

### 5.1.2 Patogeneze

Mezi predisponující faktory rozvoje stafylokokové infekce ze strany hostitele patří kromě poškození rohové vrstvy kůže a slizničních bariér také virové onemocnění, cizí tělesa zavedená v pacientově organismu, dále také defekty leukocytů a přesněji snížení jejich počtu, vrozené defekty chemotaxe, defekty schopnosti opsonizace nebo i defekt stafylocidního účinku polymorfonukleárních leukocytů. Pokles imunity a celkové oslabení organismu v obraně proti stafylokokovi může vyvolat i onemocnění spojené s poklesem imunity jako je např. diabetes mellitus, alkoholismus, mukoviscidóza, vši, svrab, různé ekzémy, maligní tumory a urémie. Hnisavé nemoci způsobené stafylokokem můžou vzniknout i při neurózách, podvýživě nebo dokonce také při duševních traumatech. Narůstající počet pacientů s imunodeficientními stavy vede k těžšímu průběhu nemoci, případně se vytvářejí podmínky pro záchyt zcela nových chorob. [1,4]

Stafylokoky jsou součástí přirozené mikroflóry povrchu těla, což je jeden z primárních ochranných mechanismů sliznic. Kůže je kromě stafylokoků přirozeně kolonizována i korynebakteriemi, horní dýchací cesty s dutinou ústní obsahují *S. epidermidis*, který se příležitostně vyskytuje i v distální části uretry. Pokud dojde k přenosu na sliznici, kde se přirozeně nevyskytuje nebo k porušení lokální přirozené mikroflóry jak anaerobní, tak aerobní, dojde k vyvolání onemocnění. [5]

Naprostá drtivá většina klinických příznaků je vyvolána působením bakteriálních toxinů. Vznikají toxinózy, což jsou zároveň nejčastější typ onemocnění vyvolané touto bakterií. Toxinózy se řadí do několik skupin. Všechny toxiny participující v bakteriálních toxinózách se řadí mezi superantigeny. Stafylokoky mají více než deset druhů enterotoxinů s pyogenní aktivitou vytvářející alimentární intoxikace. Mezi hlavní příznaky stafylokokové enterotoxikózy vznikající požitím toxinu se řadí zvracení a průjem. Pro vyvolání intoxikace musí mít kmen přítomný gen pro produkci. Enterotoxiny jsou strukturně i geneticky velmi podobné toxinu toxického šoku (TSST 1), poškozují střevní sliznici a při parenterálním podání opicím působí letálně. Enterotoxiny se klinicky prokazují jako antigeny, vyšetření je vyžadováno výjimečně. Zlatý stafylokok produkuje epidermolytické toxiny, exfoliatiny A a B, způsobující epidermolýzu rozrušením desmozomů v stratum granulosum kůže. Dochází k vzniku syndromu opařené kůže, který se dělí do tří nosologických jednotek – bulózní impetigo, skarlatiniformní nekrolýza a epidermální nekrolýza. Syndrom toxického šoku (TSS) je další toxinóza vyvolaná zlatým stafylokokem. Syndrom toxického šoku byl popsán v roce 1978, velkou pozornost laické veřejnosti vzbudil však v době, kdy se jeho vznik začal vázat na používání menstruačních tamponů. Tento syndrom může vzniknout i kolonizací jiné než děložní sliznice, například i při chřipce, kolonizací respiračního traktu. TSS je vyvolaný superantigeny, iniciuje masivní vyvolání

produkce tumor nekrotizujícího faktoru (TNF  $\alpha$ ) interleukinů 1 a 2 i leukotrienů. Mezi další toxiny produkované stafylokokem patří stafylokoaguláza koagulující plazmu polymerací, ta je typická pro většinu kmenů, ostatní druhy ji neprodukují, využívá se pro identifikaci *S. aureus* v praxi. Produkována hyaluronidáza hydrolzující buněčný tmel spolu se stafylokinázou vážící fibrin se rovněž řadí mezi faktory virulence. [1,5]

Stafylokoky produkují čtyři druhy hemolyzinů. Hemolyzin alfa porušuje bránu eukaryotických buněk, dále je produkován hemolyzin beta, gama a delta. Integritu buněčné membrány leukocytů porušuje tvořený PV-leukocidin bakterií, který v leukocytech tvoří póry, což vede k jejich usmrcení. [5]

*Staphylococcus aureus* vyvolává pyogenní infekce determinovány řadou faktorů, které jsou navázané na bakteriální buňku a produkty bakteriálního metabolismu. Infekční proces je výsledkem interakce mikroba s hostitelem, patogenitu zvyšují i struktury bakterie, určené pro únik bakterie před fagocytózou. Ložiska pyogenní infekce mají ohraničený tvar, často dochází k šíření bakterií do krevního oběhu. Bakteriémie je kvantitativně nevýrazná a krátkodobá, imunitní systém je schopen očistit krevní řečiště, pokud ale očišťovací mechanismus selže, je nemocný vystaven riziku vzniku systémové zánětlivé reakce s ireverzibilním multiorgánovým selháním a s letálním koncem. [1]

K patogenitě prokazatelně přispívají také proteinové adhezenční faktory a teichoové kyseliny, přítomné v obalu bakterie, zabezpečující vazbu stafylokoka k buňkám a k mezibuněčné hmotě, čímž zprostředkovávají kolonizaci kůže a sliznic. Průnik je usnadňován přítomností cizích těles, která umožňují adhezi koaguláza-negativním stafylokokům a fibrinovým vláknům, mechanismem je vazba volné plazmakoagulázy. Vázaná plazmakoaguláza přispívá k zásadní funkci – ke schopnosti úniku před fagocytózou za pomoci shlukování bakteriálních buněk, čímž je značně ztěžována adheze fagocytů. Pomocí proteinu A je blokován Fc fragment imunoglobulinových molekul a je tak značně znesnadněna opsonizace. Exoprodukty poškozují *in vivo* leukocyty i hemolysiny, k šíření infekce přispívají i extracelulární enzymy. Přítomností bakterií v krevním oběhu mohou vzniknout metastatická ložiska, která slouží jak zásobárny bakterií a umožňují tak delší vyplavování do oběhu. Vedle akutních forem, které mají tendenci vyvolat pyogenní reakce, rozlišujeme i formy s již počáteční tendencí vyvolání chronicity a tvorby buněčného infiltrátu, kdy se stafylokok chová jak intracelulární parazit. Je schopen dlouhodobě přežít uvnitř makrofágů. Tento typ onemocnění se léčí z pravidla dlouho a náročně, je obtížné získat a vykultivovat vzorek. Na patogenezi se podílí buněčná citlivost, která se dá ověřit testem s užitím stafylokokových antigenů. [1]

### 5.1.3 Klinický obraz

Zlatý stafylokok je původcem celé řady klinických nemocí rozličné závažnosti a výskytu díky extracelulárním toxinům a enzymům, a také kvůli jeho strukturálním komponentům. Nejvýznamnější je pro stafylokoky charakteristická plazmakoaguláza konvertující fibrinogen na fibrin, čímž dochází ke shlukování buněk. Spolu se shlukovacím faktorem se podílí na vzniku převážně opouzdřených abscesů. Predisponujícím faktorem pro vypuknutí infekce je získaná nebo vrozená abnormalita neutrofilů. [1,7]

Téměř všechny stafylokoky, kromě *S. saprophyticus*, který vyvolává zápal močových cest u mladých žen, vyvolávají infekce vázané na přítomnost pomůcek z umělé hmoty. Především gram pozitivní bakterie se dokážou naadherovat na povrch takové pomůcky a následně využít tento předmět jako bránu vstupu do těla hostitele. Adherence je podpořena povrchovou slizovou vrstvou bakterií, která zároveň zajišťuje ochranu před imunitními mechanizmy interference s T-helper bílými krvinkami. Infekce postihuje kloubní náhrady, intravaskulární katetry, likvorové spojky a cévní i chlopenní plastové náhrady, kde tvoří biofilm. Buňky v biofilmu jsou vysoce rezistentní k antimikrobiálním látkám a dezinfekcím. Nejvýznamnější jsou různé druhy endokarditid vytvořené usazením infekčních bakterií v biofilmu na površích chlopní. Řadíme mezi ně endokarditidy akutní, subakutní, po chirurgickém zákroku, zároveň však také endokarditidy narkomanů. Při asistovaném dýchání se biofilm adhezuje na stěny trubic, při nedostatečné péči o nemocného je schopný infiltrovat až plíce či průdušky. Dosud není známa metoda odstranění vytvořeného biofilmu, možnosti léčby jsou omezené, a to vytváří závažný problém veřejného zdraví. Zdrojem nákazy je buď nemocný sám, ošetřující personál nebo kontaminovaný materiál. Nákaza postihuje především pacienty s poklesem imunity, neutropenií nebo úmyslným potlačením imunity imunopresivními látkami. [1,5]

Stafylokoky způsobují hlavně kožní onemocnění, vyskytují se však také jako původci orgánových onemocnění, například osteomyelitidy, bronchopneumonie nebo endokarditidy. Způsobují až 20% infekcí ran po chirurgickém zákroku v nemocnici, exogenní zdroj nákazy může být i zdravotnický personál. Kožní onemocnění vyvolané stafylokoky rozdělujeme na povrchové a hloubkové. Mezi ty povrchové řadíme formy hnisavých chorob postihujících jenom a jen částečně vrchní vrstvu pokožky. Hojí se bez jizvy. Hloubkové jsou charakteristické mnohopočetnými zánětovými infiltráty v podkožním vazivu, po zahojení vzniká kožní defekt s trvalou jizvou. Stafylokoky vyvolávají onemocnění na mnohých částech těla, pokud se jedná o původce hnisavého onemocnění kůže, mluvíme o stafilodermiích. Mezi stafilodermie patří i 2 typy přenosného impetiga, u non-bulózního se tvoří na kůži masivní krusty, počátečně i puchýřky. Bulózní impetigo postihuje převážně kojence a starší děti, je typické rychlým rozvojem puchýřků s po čase vyvinutým jasně puruletním zákalem a s hnědavými krustami. Ecthyma je na začátku

velice podobná non-bulóznímu impetigo, po čase se však tvoří hlubší léze s chronickým průběhem. Vyskytuje se v oblasti dolních končetin na hygienicky zanedbané kůži. Puchýře se serózní tekutinou a se zanícenou kůží fialovočervené barvy za několik dní zasychají a tvoří se žlutohnědý nebo hnědý strup. Pod strupem se nachází nepravidelně ohraničený vřed, jehož léčba je velmi zdoluhavá. Pokud kůže zareaguje na přítomnost bakterií nadbytečně, dochází k vytvoření hnisavého onemocnění pyoderma vegetans, projevujícího se výraznější cévní proliferací v místě infekce. Je charakteristická pro imunodeficientní pacienty. Stafylodermie se můžou projevit i vznikem periokulárních infekcí, zánětem očního víčka charakteristickým zánětem s přítomností šupin v oblasti řas, často jsou postiženy i přilehlé žlázy (Meimbomské, Zeisové, hlavní žlázy) i slzné váčky. Jako reakce na stafylokokové toxiny se tvoří konjunktivitida, vzácně i keratitida. Pokud se rozšíří impetigo z přilehlé kůže na víčko mluvíme o dermatoblepharitide. [1,4,5]

Časté je taktéž postižení vlasového folikulu (folikulitida), které úzce souvisí s hygienickými návyky, kumulací steroidů, olejů, dehtů ve vývodu, často i zanesením mechanické nečistoty do ústí folikulu nebo třením oblečení. Nejmírnější forma – ostiofolikulitida – se projevuje drobnými nebolestivými pustulkami kolem vlasu či chlupu. Při folikulitidě jsou bolestivým zánětem postiženy celé cibulky folikul i jejich přilehlé okolí, postižené folikuly mají schopnost nakazit okolní zdravé folikuly a tím může dojít k vytvoření veliké souvislé léze. Při dlouhém trvání se vlasy uvolňují a vypadávají. Furunculus je prudký stafylokokový zánět folikulu i jeho okolí tvořící absces kolem folikulární jednotky s mírnou bolestivostí hlavně v oblasti ochlupení vznikající teplem, vlhkem a mechanickým třením, u mužů i v oblasti brady. Může být následkem folikulitidy zatlačením infekce do vlasového folikulu nebo krevní cestou, nebo následkem tření oděvu o pot produkující místa na těle. Silný zánět v podkoží způsobuje zhrbolatění kůže, na vrcholku hrbolků je malý hnisavý puchýřek, později může docházet k nekróze tkániva a vzniku nekrotického stržně. Po zahojení zůstává na místě kráterový vřed s jizvou. Splynutím mnohých blízkých furunkulů vzniká karbunkul, velký hrbol velikosti pěsti, zanechává po sobě vředy, zanechávající rozsáhlé jizvy. Léčba trvá několik týdnů a je často doprovázená těžkými horečkami. Postihují taktéž u dospělých apokrinální žlázy v oblasti axil, což je velmi bolestivé. Onemocnění začíná tvorbou hluboko v podkožním vazivu uložených, zvětšujících se hrbolů, s jemně zanícenou kůží. Později po vytečení žlutozeleného hnisu zanechává jizvu. Může postihovat i okolní žlázy a rozšiřovat se, tím se jeho léčba prodlužuje a může trvat až několik měsíců. [1,4]

Stafylokokové infekce postihují i potní žlázy u novorozenců s malnutricí, fyziologickou poruchou vývoje vývodu ekkrinních potních žláz nebo následkem přílišného pocení. Pokud je postižen jenom vývod potní žlázy, na kůži se těmto pacientům vytváří malé hnisavé puchýřky, při postižení hlubších vrstev vznikají bolestivé, hnisavé červené hrboly, které mají tendenci se zvětšovat. Zanechávají za sebou jizvy. Vzhledem připomínají furunkuly bez nekrotických stržňů. Novorozenci mohou být postiženi speciální, velmi nakažlivou formou puchýřového

novorozeneckého impetiga. Postihuje novorozence v prvních týdnech života, rozšiřuje se v porodnicích nebo jeslích při nedostatečné hygieně i do větších epidemií. Vyskytuje se na kůži sedací části, končetin a trupu. Projevuje se velkými puchýři naplněnými serózní hnisavou tekutinou, teplotou, nespavostí a nechutí do jídla. Puchýře zasychají na chrasty. [1,4]

Nachází se-li *Staphylococcus aureus* v podkoží, vyvolává i některé cellulitidy, způsobuje ztrátu podkožního pojiva či jiné zánětlivé procesy. Cellulitida pochází z povrchových vřidků, vzniká po poranění, zanesením bakterií do hlubších vrstev kůže, ložisko infekce se nachází v podkožním tuku. Již po několika hodinách vznikají rudé prosáklé léze, na kůži pak velké puchýře se strupy, zvětšují se lymfatické uzliny, postižený má pocit nevolnosti, horečku a zimnici. Stafylokoky se vyskytují i při bakteriální synergistické gangréně – Meleneyova chronickém vředu destruuujícího rozsáhlé oblasti kůže. Fourierova fascitida je nekrotizující onemocnění vyvolávané touto bakterií nachází-li se v hlubších vrstvách podkoží nebo na supraficiální fascii. Má vysokou letalitu a bývá sdružené se syndromem toxického šoku. Stafylokoky postihují také slinné žlázy a nehtové ploténky. Dále postihují tenké střevo, kde vyvolávají vodnatý, nezápalečný průjem bez leukocytů, méně často pak vyvolávají hnisavé záněty u uretritidy. [1,4,5]

Stafylokokové exotoxiny vyvolávají syndrom toxického šoku (TSS). Projevuje se nejčastěji u žen a dívek používající menstruační tampony, postihují ale i jiné sliznice. Uvolňované exotoxiny způsobují masivní uvolňování cytokinů stimulací složek imunitního systému pomocí jejich superantigenů. Vyvolávají rozsáhlé orgánové postižení, hypotenzi a později vyrážky na chodidlech a dlaních, které mají tendenci se loupat. Průběh může být mírný až fatální, záleží na době od infikování a na včasném podchycení. [1,7]

Exotoxiny vyvolávají i skarlatinu a syndrom opařené kůže, která je navozená stafylokokovými exfoliativními toxiny, postihuje malé děti nebo dospělé s predispozicí, kdy způsobuje renální selhání, malignity a jiné onemocnění. Léčí se protistafylokokovou chemoterapií, drenáží a rehydratací pacienta. Syndrom opařené kůže je znám jako Ritterův syndrom u malých dětí nebo Lyellova nemoc u dospělých, Je způsoben také produkcí stafylokokového exfoliatinu. Po dvou dnech se odděluje vrchní vrstva pokožky, destruuje se mezibuněčné spoje a tvoří se velké číré puchýře. Na malé děti se přenáší od dospělých nosičů na jejich rukou. Pro Lyellův syndrom je charakteristická přítomnost Nikolského fenoménu, jedná se o snadné odloučení zdánlivě normální epidermis třením, v důsledku nedostatečné adheze epidermálních buněk. [1,7]

U dětí mohou být supraantigeny stafylokoků původcem Kawasakiho syndromu, akutní vaskulitidy vyskytující se u citlivých jedinců do věku 4 let s poruchou aktivace T-lymfocytů po expozici infekci. Dítě postižené Kawasakiho syndromem trpí konjunktivitidou, horečkami, vyrážkami a olupováním kůže na špičkách prstů. Mezilidský přenos u této nemoci doposud nebyl zaznamenán. [7]



## 5.2 MRSA

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* je jednou z nejčastějších příčin nemocničních a komunitních infekcí. Kmeny, které se uplatňují jako nozokomiální, jsou v nemocničních zařízeních z pravidla výrazně rezistentní k antibiotikům. MRSA disponuje odolností na celou řadu  $\beta$ -laktamových antibiotik – meticilin a penicilin – což výrazně stěžuje léčbu infekce, možností léčby zůstávají pouze léky s nižší účinností jako je například vankomycin. Příčinou klinicky závažné rezistence je tvorba nadměrně silné stěny buňky bakterie. Na závažnosti infekce pacienta přidává opakovaný nález bakterií téhož kmene, přítomnost kmene v různých vzorcích biologického materiálu z různých sliznic, nebo zjištěná vysoká koncentrace bakterií ve vzorku. K průkazu stafylokoků může dojít i přímo na odstraněném vzorku materiálu např. kanyly. Nově byl zachycen komunitní kmen MRSA obsahující *mecA* gen na jiném místě vyvolávající onemocnění u ambulantních pacientů. Kmeny komunitní MRSA jsou odlišné od nemocničních, jsou lépe citlivé na ATB, oproti nim jsou však virulentnější kvůli své produkci Panton-Valentin leukocidinu (PVL), toxinu poškozujícího lidské neutrofile, který je spojován s opakujícími se, či velmi závažnými infekcemi. Nejčastěji jsou původci pneumonií, infikuje hlavně mládež, děti ale i hospodářská zvířata. Komunitní pneumonie se šíří mimo nemocnic, např. v rodinách po inhalaci kapének a infiltrování dolních cest dýchacích z horních. Pokud se bakterie dostanou do krve vznikají bakteriemie (ve 40-60 %) a možnost postupu do sepse a septického šoku. Méně často, v 15 % způsobuje nozokoniální pneumonie. Vážné může být převážně pro malé děti a imunokompromitované pacienty, riziková jsou pacienti s asistovaným dýcháním. Vyšetřuje se odběr sputa a krve. [1,2,3,5,9]

Rezistence na antibiotika se zdaleka netýká jenom zlatého stafylokoka. Se zavedením dalších antibiotik pro terapii MRSA došlo k vývoji dalších typů rezistence. Rezistenci bakterií zvyšuje i působení selekčního tlaku, který eliminuje citlivé buňky a nechá prostor pro růst odolných buněk. Mezi problémové, klinicky významné rezistentní druhy bakterií, patří i penicilin a cefalosporin rezistentní pneumokoky, multirezistentní *Acinetobacter baumannii* a *Mycobacterium tuberculosis*, vankomycin rezistentní enterokoky ale i nově vytvořená zvířata a zemědělské podniky postihující vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA). [5]

### 5.2.1 Přenos

Nejčastěji je zdrojem přenosu kontakt s člověkem, který je postižený touto infekcí, nebo je jejím nosičem, v nemocnici se jedná o zdravotnický personál nebo pacienty. Jako přechodné zdroje infekce MRSA mohou v nemocnici sloužit kontaminované předměty a zdravotnické prostředky. Bakterie ke svému přilnutí na epitelové buňky sliznice pacienta využívají kyselinu teichoovou,

kteřou syntetizují na povrchu své buněčné stěny. K šíření v nemocničním a komunitním prostředí mohou přispívat biofilmy, které stafylokoky tvoří. Bakterie v takto vytvořeném biofilmu přežívají bez vytvoření onemocnění u hostitele až do momentu poklesu imunity, kdy následně propukne infekce. Nejčastěji se tvoří biofilm na površích chirurgických plastových náhrad zavedených do lidského těla, může se však vytvořit například také na epitelu sliznic a v nose. Zajímavé je, že existují důkazy spojující zvýšenou kapacitu tvorby biofilmu a schopnost bakterie v něm přežít, které se pojí s rozšiřováním brazilského klonu MRSA, typického nemocničního kmenu, který byl rozšířený zejména v 80. letech, v dnešní době se v ČR prakticky nevyskytuje. [9,10]

Bakterie se přenáší také zoonózou mezi zvířaty nebo antropozoonózou z člověka na zvíře a naopak. Zvířata, převážně v hospodářských chovech, může postihovat vlastní autochromní zvířecí kmen MRSA, který se vyvine v jejich chovu. Zvíře může být i nosič, pokud je majitel nemocný, později může docházet k zvířecímu bezpříznakovému nosičství, proto je nutno provést vyšetření postiženého zvířete pro prevenci reinfekce a pro ochranu zdraví majitele, nebo jiného člověka. V České republice byla zaznamenána pozitivita pouze u hospodářského zvířete bardoně. Onemocnění se může přenášet i z produktů živočišné výroby alimentárně od postižených zvířat, ze salátů, cukrovinek atd. Projevuje se bolestmi hlavy, průjmem, zvracením až kolapsem, následuje však rychlé ozdravení. V případě nákazy zvířat se vede ve veterinárních nemocnicích dokumentace pro kontrolu výskytu MRSA kmenů. Obsahuje konkrétní metodiky průkazu, monitoring pacientů, personálu, propouštění pacientů i etický kodex pro majitele zvířat s onemocněním způsobeným MRSA kmeny. [3,5]

### 5.2.2 Klasifikace

Původně byla MRSA prokazována mapováním nedávných změn na chromozomu (přes epidemie a pandemie) makrorestrikční analýzou DNA pomocí pulzní elektroforézy. Tato metoda se dělí dle analýzy DNA a SCCmec na několik typů. [3,10]

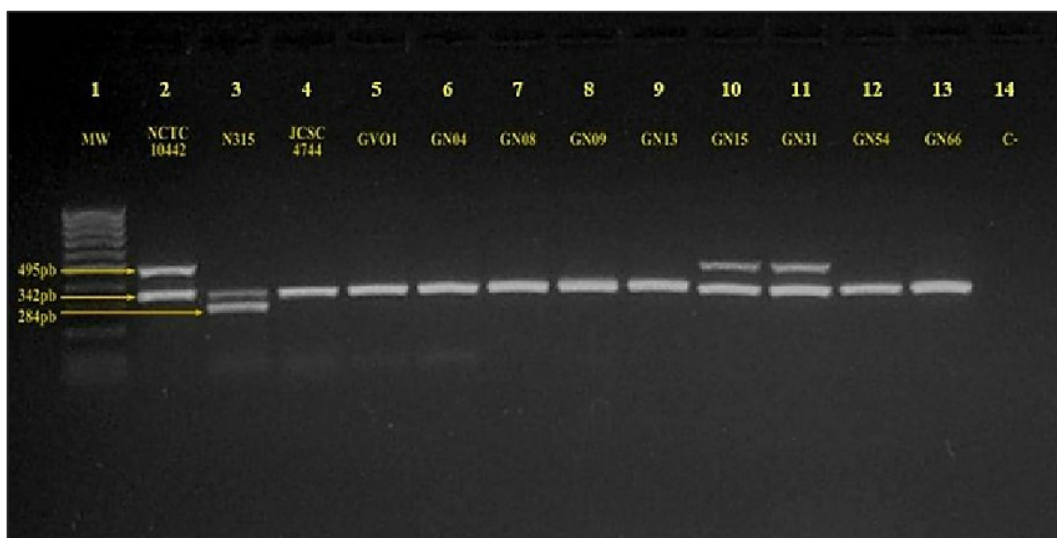
Typ I – první kmen MRSA, o velikosti 34kbp z roku 1961, původem z Velké Británie, a typ IA – obsahující plazmid navíc který je charakteristický pro Iberský klon. Typ II s velikostí 52kbp se vyskytoval nejdříve v Japonsku, následně v New Yorku, naopak typ III z roku 1985 s délkou 66kbp se vyskytoval nejdříve na Novém Zélandě, jeho varianta se nyní vyskytuje i u Maďarského a Brazilského klonu. Typy II a III obsahují geny pro rezistenci k těžkým kovům ale i k jiným antibiotikům. Typ IV byl nejdříve nalezen jak pediatrický kmen v Portugalsku v roce 1999, následně v Polsku. Jeho typ je charakteristický pro klon UK-EMRSA-15. Typ V byl prokázán u komunitních kmenů CA-MRSA, typ VI u nemocničních kmenů HA-MRSA. Další kmeny, kromě těch, které obsahují genové komplexy, nejsou zatím detailně popsány. [3,10]

Současná klasifikace je založena na sekvenčním typu (ST), citlivosti (MSSA) nebo rezistenci (MRSA) a úseku SCCmec (1-12). Příklad názvosloví klasifikace:

*ST239-MRSAIII* = brazilský kmen

Sekvenční typ (ST) se zjišťuje dle multilokusové sekvenční analýzy. Ten je po zjištění dále archivován v databázi, obsahující tisíce těchto typů a kmenů, do které stále nově přibývají nové typy *S. aureus*. [3]

**Obrázek 1 – Multiplexní PCR pro typizaci SCCmec**



Jako marker molekulové hmotnosti slouží dráha 1. Dráhy 2, 3 a 4 vykazují výsledky pro SPA kmeny NCTC 10442 (SCCmec typ I), N315 (SCCmec typ II) a JCSC4744 (SCCmec IV). Dráhy 5 až 13 ukazují typizaci pro SCCmec izoláty ze studie. Izoláty ze studie na dráhách 10 a 11 měly SCCmec typu I, dalších sedm izolátů mělo SCCmec typ IV. Negativní kontrolu PCR reakcí obsahuje dráha 14.

Zdroj: Oscar Correa Jimenez / 2012 (převzato) <https://www.researchgate.net/profile/Oscar-Correa-Jimenez/publication/246044269/figure/fig1/AS:298363602915338@1448146834284/Multiplex-PCR-for-SCCmec-typing-Results-for-SCCmec-typing-by-multiplex-PCR-Lane-1-MW.png>

### 5.2.2.1 HA-MRSA – healthcare acquired

Způsobuje vážné komplikace jako je například zánět plic, infekce močových cest či sepsi u hospitalizovaných pacientů. Je často spojován s přítomností terapeuticky zavedeného cizího tělesa do organismu jako je např. intravaskulární či močový katetr, nebo endotracheální trubice, na kterých tvoří biofilmy pro vlastní přežití. Dlouhodobě hospitalizováni pacienti, pobyt

v pečovatelském domě, častá hemodialýza, chronické rány nebo imunodeficientní pacienti mají zvýšené riziko infekce HA-MRSA. Projevuje se vyrážkou, bolestí hlavy, svalů, zimnicí, horečkou, únavou, bolestí hrudi a dušností. [1,10]

#### **5.2.2.2 CA-MRSA - community associated**

Do 90. let 20. století byla MRSA výhradně nemocničním patogenem. Později byly zdokumentovány pozitivní případy u jedinců z USA bez hospitalizace. První případy byly fatální. V současné době se vyskytuje po celém světě. Je schopna infikovat zdravé lidi bez předešlého onemocnění. Způsobuje středně vážné infekce kůže, nejvíc v oblasti ochlupení a v okolí poraněných míst. Postižené místo je oteklé, bolavé, vytváří se vyrážky se žlutým nebo bílým centrem. Okolí je zanícené, teplé, při horším stavu mokuje. Může být přítomná horečka. Komunitní MRSA je přenášena komunitami i do zdravotnického prostředí, je nutno ji rozlišovat od nosokomiální varianty. CA-MRSA se diagnostikuje lidem kteří neměli předešlé onemocnění MRSA, byli diagnostikováni do 48 hodin, poslední rok nebyli hospitalizováni, ošetřováni, katetrizováni ani dialyzováni. Rizikové faktory přenosu komunitního kmenu jsou kontaktní sporty, špatné hygienické návyky a sdílení předmětů osobní hygieny. Léčba je lehčí než léčba HA-MRSA, spočívá v podání perorálních antibiotik a dodržení dostatečné hygieny. [7,9]

#### **5.2.2.3 LA-MRSA – livestock associated**

Je označení kmenů MRSA infikující hospodářská zvířata na farmách. U lidí je spojována s lokalizovanými infekcemi ran, abscesy, otitidou ale i s těžšími a invazivními infekcemi jako je bakteriémie, pneumonie a endokarditida. Převážně infikuje jedince, kteří přicházejí do kontaktu s hospodářskými zvířaty, zejména s prasaty, a jejich členy domácnosti. Byly zaznamenány zprávy o přenosu LA-MRSA i na osoby nepřicházející do kontaktu se zvířaty, v těchto případech se nákaza šíří kontaminovaným životním prostředím, méně často i potravou. V současnosti je trvalý přenos LA-MRSA z dobytka na člověka neobvyklý. Na rozdíl od CA-MRSA a HA-MRSA neobsahuje kódovací gen *mecA* pro rezistenci, obsahuje jeho homolog *mecC* gen. Prevalence v Evropských zemích stoupá. V České republice je LA-MRSA rezistentní na antibiotikum tetracyklin. Infekce z hospodářských zvířat nejsou četné, převládají komunitní kmény vyvolávající onemocnění lidí, přenášející se později i reverzně antropozoonózou na dobytek. [5,10]

### 5.2.3 Aspekty rezistence k oxacilinu

Typickým důkazem neomezené adaptability bakteriálních mikroorganismů vůči stále dalším a novým antibiotikům by mohly být právě stafylokoky. Po objevení převratného penicilinu Flemingem v roce 1928 se zdál být problém stafylokokových infekcí vyřešen, bohužel současný stav kmenů stafylokoků, jestli už koaguláza negativních nebo pozitivních, dokazuje pravý opak. Již v té době Fleming upozornil na nebezpečí vzniku rezistence kmenu *Staphylococcus aureus* při nadměrném používání penicilinu. Tři roky po uvedení tohoto antibiotika na trh byl skutečně izolován penicilin rezistentní kmen *Staphylococcus aureus*, kvůli své produkci enzymů  $\beta$ -laktamáz (penicilináz). Tehdy šlo o ojedinělý záchyt, poté začal výskyt významně stoupat a dnes dosahuje počet kmenů produkujících penicilinázu způsobující rozkládání penicilinu 80–90 %. [1,2]

Rychlým šířením rezistentních stafylokokových infekcí se již na počátku 60. let zavedl vývoj semisyntetických penicilinů rezistentních vůči účinkům penicilinázy. Kmeny rezistence k oxacilinu jsou rovněž multirezistentní, rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamovým ATB. Patří mezi ně antibiotika meticilin, oxacilin, nafcilin, cloxacilin a další. Stabilita semisyntetických penicilinů je značná ale ne absolutní. Za nejstabilnější se považuje meticilin, po něm oxacilin. Působí charakteristicky selektivně na stafylokoky a částečně i na streptokoky. Byly popsány celkově tři typy penicilináz produkovaných bakteriálním plazmidem, které se liší imunologicky i substrátovou specifitou. Později byl v 60. letech popsán v řadě zemí sporadický výskyt kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k oxacilinu (meticilinu) – MRSA. Typ rezistence těchto kmenů je označován slovem „intrinsic“, protože není zprostředkován enzymatickou destrukcí antibiotika, ale změnou jeho cílových struktur. Rozvoj rezistence ovlivňují mnohé faktory. Tvorbu rezistence indukuje nedodržení dávkování nasazeného ATB, preskripce a užívání širokospektrých antibiotik bez ohledu na indikace. V jiných zemích dochází k nekontrolovanému prodeji antibiotik bez receptu. Velký problém sehraává i naložení s likvidací antibiotik, neboť velké množství léčiva může být uvolněno při nesprávném zacházení do okolního prostředí. Rezistence se zvyšuje i požíváním produktů hospodářských zvířat kterým jsou antibiotika podávána v krmivu za účelem podpory jejich růstu a zlepšení jejich zdraví. [1,2]

Rezistence je způsobená mutací nebo získáním *mec* genu produkujícího náhradní penicilin binding protein (PBP 2a). Původní PBPs zabezpečují katalýzu transpeptidázové reakce při kompletování peptidoglykanu buněčné stěny bakterie. Kmeny zlatého stafylokoka produkují čtyři hlavní PBPs 1, 2, 3 a 4, první tři jsou pro buňku životně důležité. U MRSA buněk je vytvářen alternativní PBPs 2a s nízkou aktivitou k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, nahrazující funkci původního PBPs 2. Gen zodpovědný za syntézu alternativního PBPs 2a - *mecA* se prokazatelně vyskytuje jen u oxacilin rezistentních stafylokoků. Alela, oblast chromozomu nesoucí gen *mecA*,

obsahuje mnoho inzerčních míst, které umožňují mnohočetnou chromozomálně vázanou rezistenci k dalším skupinám antibiotik jako např. makrolidům, tetracyklinům a sulfonamidům. MRSA kmeny jsou navíc schopné získat další geny rezistence k produkci  $\beta$ -laktamáz, rezistenci k dalším antibiotikům např. trimetoprimu a aminoglykosidům. Rezistence k oxacilinu je založena na záměně původního PBP<sub>2</sub> za alternativní PBP<sub>2a</sub>. Rezistence může být homogenní nebo heterogenní. Heterogenní populace obsahuje směs buněk jak citlivých, tak i buněk s různým stupněm rezistence, průkaz rezistence takové populace je složitější než u té homogenní, která obsahuje buňky, které mají všechny stejný stupeň rezistence. Při heterogenní rezistenci se její fenotyp manifestuje *in vitro* za použití nižší inkubační teploty s přísadou NaCl do růstového média pro plnou expresi tohoto fenotypu rezistence. Kolonie heterogenní populace se při kultivaci na krevním agaru jeví různě velké, vytvářejí různou hemolýzu i intenzitu pigmentu. Prokázaná rezistence stafylokoků k oxacilinu je klinicky významná v případě terapeutického selhání  $\beta$ -laktamových antibiotik. Některá zkoumaná antibiotika mohou být účinné *in vitro*, proto se musí při nálezu rezistentního kmenu stafylokoků k oxacilinu interpretovat nález jako rezistence ku všem doposud užívaným  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. [1,2]

#### 5.2.4 Mechanismus rezistence

Rezistence u prokaryot je výsledkem vývoje jedinečných fenotypových a genotypových znaků. Změnami v genomu se populace stává rezistentní. V praxi je typické zvyšování rezistence selháním terapie antibiotiky nebo použitím menší než účinné koncentrace, ve které může přežít malý počet bakterií, které se adaptují změnou své struktury a při dalším kontaktu můžou být zcela rezistentní – perzistence bakterií. Pojmem rezistom rozumíme množinu genů s vyvinutou rezistencí na antibiotikum jako reakci na používání antimikrobiálních látek. Populace bakterií mohou být fenotypově odlišné, mají tudíž rozdílnou citlivost. Vrozená rezistence je dána strukturou bakteriální buňky. Ta již nemá cílovou strukturu nebo snížila afinitu cílové struktury na antibiotikum, buněčná stěna se stala pro antibiotikum plně nepropustnou nebo buňka odstranila transportní systém pro antibiotikum k cílové struktuře. Bakterie dokážou inaktivovat antibiotikum změnou jeho struktury nebo ho enzymaticky neštěpí a tím se stane antibiotikum neúčinné. Inaktivace antibiotik spočívá v modifikaci aminoglykosidů – adenylaci, fosforylaci nebo acetylaci. Betalaktamázy štěpí a tím deaktivují  $\beta$ -laktamy, penicilin a cefalosporin. Bodovými mutacemi vznikají nové druhy betalaktamáz. [5]

Rezistence k methicilinu se šíří výhradně vertikální cestou – klonálně. Selekcí tlakem antibiotika se potlačí citlivé buňky a dojde k množení rezistentních buněk bez zábrany. Populace se tak stává rezistentní. Geny rezistence se přenáší na potomstvo pomocí plazmidů, pro SPA je charakteristické dědění genu *mecA* determinujícího syntézu peptidázy s mizivou afinitou

k oxacilinu. Horizontálním přenosem se genetická informace dostává do cizí bakterie konjugací v plazmidech, transpozonech nebo transdukci profágem. Přenos DNA transformací z okolního prostředí je ojedinělý. [3,5,7]

Plazmidy jsou nezávislé, samostatně se replikující extrachromozomální molekuly nukleových kyselin, přenáší se mezi prokaryotními buňkami horizontálním transferem, čímž je zabezpečen přenos antimikrobiální rezistence a přežití buňky. Obsahují geny pro replikaci, geny pro fenotypovou výhodu bakterie i geny pro ulehčení transportu plazmidu – tra geny. Geny rezistence na ATB se přenášejí na konjugativním R-plazmidu. V buňce se množí a řetězově infikují další geny. Za multiantibiotickou rezistenci může být zodpovědný jenom jeden plazmid. R-plazmidy mohou nést i geny pro zvyšování produkce faktorů virulence např. toxinů. Plazmidy jsou zodpovědné i za kódování virulentního stafylokokového enterotoxinu fibrinolysin. Vyskytují se v buňkách v mnoha kopiích – od 1 do 1000. Geny se mezi buňkami přenášejí i bez vynucených podmínek, zdánlivě bez účelu (příkladem je transdukce u bakteriofága). Přenos plazmidů je jednosměrný a odehrává se za přítomnosti samičích buněk F<sup>+</sup>, které informace přijímají, nejsou však schopné je odevzdávat a samčích buněk F<sup>-</sup>, které je odevzdávají, nejsou však schopné informace přijímat. Geny se přenášejí do recipientní buňky konjugací, kdy samčí donor daruje samičímu akceptoru plazmid. F<sup>+</sup>. Přenos je zprostředkován sex-specifickými fimbriemi (fimbrie IV. typu) pro jejichž tvorbu jsou potřebné geny nesené F plazmidem. Koncem plazmidu se dvě buňky dotknou, retrahují se, dojde k přiblížení a penetraci všech obalů akceptorové buňky fimbrií donoru. V akceptorové i donorové buňce dojde k dokončení syntézy chybějícího řetězce DNA. Toxin F produkuje toxin zabíjející jiné samičí buňky v okolí, které by mohly způsobit vytlačení přeneseného plazmidu v injikované akceptorové buňce svou rychlou proliferací. V průběhu evoluce se nepotřebné plazmidy vyřazují z buněk, představují vysokou energetickou zátěž pro buňku. [5,7]

Kromě plazmidů se rezistence může přenášet i přes mírné bakteriofágy tzv. profágy které jsou schopny přenášet mezi buňkami geny. Profág buňku okamžitě nezabije, společně se svou DNA jí odevzdá i gen rezistence, který se zabuduje do jejího chromozomu. Proces přenosu bez zabití buňky se nazývá lyzogenie. Konverzí získává buňka z bakteriofága nové vlastnosti i geny, kterými si může buňka zvýšit svou virulenci. Informace z jednoho místa na druhé místo molekuly DNA v buňce přenášejí transpozony, které rovněž obsahují gen rezistence k ATB, rezistenci k betalaktamům kódují transpozony jednoduché. [5,7]

U bakterií může být přítomná multirezistence k několika antibiotikům s podobnou strukturou, u příbuzných antibiotik se jedná o rezistenci zkříženou. MRSA bývají rezistentní ke gentamicinu, ciprofloxacinu, erytromycinu, tetracyklinu a dalším, zřejmě rozdílným antibiotikům. Multirezistence se přenáší geny konjugací přes výše zmiňované plazmidy nebo transpozony. Gen

mnohočetné antibiotické rezistence zvaný *mar* je do jisté míry univerzální. Typů mechanismů multirezistence je několik desítek a určují je bílkoviny genu „Mar“. Geny rezistence se vyskytují v populaci i bez selekčního tlaku. [5]

Důvod odolnosti meticilin rezistentních stafylokoků spočívá v jejich alternativním transpeptidázovém enzymu jménem PBP2a – penicillin binding protein. Kvůli své nízké afinitě neplní transpeptidázovou funkci, není tudíž citlivý na  $\beta$ -laktamy a není jimi inhibován, jak originální enzym nerezistentních bakterií PBP2, které jsou silně afinitní. PBP2a gen kóduje gen *mecA*, charakteristický gen pro MRSA. *MecA* umožňuje propojování peptidů v buněčné stěně pro její syntézu i v přítomnosti  $\beta$ -laktamů díky své nižší afinitě a schopnosti inhibice léčiva. Syntéza probíhá i v přítomnosti léčiva v terapeutické hladině. Příčinou klinicky závažné rezistence je tvorba nadměrně silné stěny buňky bakterie. [2,3]

Alternativní enzym PBP2a je produkován dvěma cestami. Pokud je produkce enzymu spuštěna přítomností  $\beta$ -laktamového antibiotika, mluvíme o inducibilní produkci. Tato rezistence je označována jako skutečná, kmen vykazuje rezistenci i na koncentraci antibiotika vyšší než 4mg/l. Dále je známa rezistence hraniční (do 4mg/l) která je způsobená jiným mechanismem. Stupeň rezistence závisí na druhu mechanismu rezistence, citlivosti k inhibitorům. Inducibilní produkce je pod kontrolou genů *mecR1*, který kóduje membránový signální protein a *mecI*, který reguluje transkripci, tyto geny leží v těsné blízkosti genu *mecA*. Gen *mecA* s délkou 2,1kbp leží na chromozomu v oblasti SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec element). Blízko něho, směrem ke genu *mecR* se nachází promotory genů a operátor. Do chromozomu strategicky integruje blízko počátku replikace v specifickém místě attBsc neobsahujícího žádné jiné geny, důležité geny se transkribují nejdříve. Správnou orientaci SCCmec při vložení do chromozomu zajišťují rekombinázy *ccA* a *ccB* (cassette chromosome recombinase). SCCmec slouží i k vložení jiných prvků rezistence z transpozonů nebo plazmidů. Donor úseku SCCmec do dnešní doby není s určitou jistotou známý, nejpravděpodobnější poskytovatelé tohoto úseku jsou *Staphylococcus epidermidis* a *S.haemolyticus* u kterých se tento úsek vyskytuje taktéž. Do dnešní doby je známo 12 typů SCCmec, vyskytujících se u zlatého stafylokoka. Konstitutivní produkci se rozumí přítomnost mutace v oblasti regulátorových genů, i bez přítomnosti betalaktamů. Enzym může být produkován všemi buňkami kmene, které tvoří homorezistentní nebo heterorezistentní kmen. Vyskytují se zde buňky s různou citlivostí. [2,3,7]

### **5.3 Historie**

Stafylokoky jsou známy již od dob antiky. Do 70. let byly známy jenom dva druhy stafylokoků – pro člověka patogenní druh *Staphylococcus aureus* a nepatogenní druh *Staphylococcus epidermidis*. Pro zařazení bakterie do kmene zlatého stafylokoka bylo potřeba otestovat tvorbu



vázané plazmakoagulázy, dále prokázat přítomnost zlatých odstínů pigmentů a hemolýzu na krevním agaru. Pro zařazení ke kmenu *S. epidermidis* je test negativní na plazmakoagulázu i hemolýzu s koloniemi obsahující bílé pigmentované kmeny. Původně byly stafylokoky na základě buněčné morfologie a katalázové aktivity děleny do dvou čeledí – *Micrococacae* a *Streptococacae*. V současnosti již nejsou nově popisované rody začleňovány do těchto čeledí, oficiálně však toto hierarchické uspořádání nebylo nikdy zrušeno. Rody byly později rozčleněny Kloosem a Scheiferem na více než 40 samostatných druhů a poddruhů, ke kterým jsou vypracovány identifikační postupy a lze je spolehlivě fenotypicky určit i v rutinní diagnostické zdravotnické laboratoři. [1]

Do druhé světové války byly nejobávanější bakterie Streptokoky, po válce je nahradily Stafylokoky, které v tomto období nejvíce expandovaly do nemocnic a začaly způsobovat nosokomiální infekce zejména na porodnických odděleních, což vyvolalo velké diskuse o tom, jestli by se neměly porody vrátit do bezpečnějšího domácího prostředí. Propuknutí nosokomiálních infekcí vyvolaných zlatým stafylokokem v padesátých a šedesátých letech se podařilo dostat pod kontrolu zavedením nových antibiotik, čímž se do popředí dostaly gram negativní tyčky. V roce 1976 byl profesorem Hájkem na Lékařské Fakultě univerzity Palackého v Olomouci popsán nový kmen koaguláza-pozitivního stafylokoka *S.intermedius*, později byl popsán i kmen koaguláza negativního *S.saprophyticus* subsp. *Hyticus*. V posledních letech minulého tisíciletí se opět dostaly do popředí zlatým stafylokokem indukované nozokomiální infekce, včetně stafylokoků rezistentních na meticylin a plazmakoaguláza negativních stafylokoků. [1]

Dnes představuje rod *Staphylococcus* skupinu podmíněně patogenních druhů pro člověka i zvířata. Velký počet těchto druhů je součástí přirozené mikroflóry našich sliznic i kůže a nejsou pro člověka nebezpečné, pokud nedojde k jejich infiltraci na jiné místo v těle, k poklesu imunitního systému s nedostatečnou účinností fagocytózy, porušení mechanických bariér sliznic nebo k traumatu. Jako podpora uchycení bakterie v tkáni slouží i přítomnost cizích těles v těle. Stafylokoky se vyskytují jako původci onemocnění s různou frekvencí. Nejčastěji se vyskytuje *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* a ostatní. V posledních letech nabyla taxonomie stafylokoků podstatných změn, v současnosti je v tomto rodu celkem 35 druhů, některé obsahují poddruhy. [1]

Rezistentní kmeny stafylokoků se objevily již po zavedení penicilinu před padesáti lety. Tehdy byly kmeny produkující penicilinázu v nemocnici ojedinělé, dnes ji produkuje většina známých kmenů. Výskytem oxacilin rezistentních kmenů byl zanedlouho postižen celý svět, což představovalo velký epidemiologický problém. Vývoj rezistentních kmenů bakterií poukazuje na selhávání antibiotické terapie. Jako kompenzace nedostatečné účinnosti léčby infekcí pomocí

oxacilinu a methicilinu se následně začaly tvořit rezistentní kmeny na další antibiotika, VISA (vankomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*) a VRSA (vankomycin rezistent *Staphylococcus aureus*). Před pár lety bylo objeveno nové nebezpečí rezistence až k sedmi betalaktamovým a některým jiným antibiotikům. Enzymy karbapenemázy, rovněž zodpovědné za destrukci betalaktamových antibiotik, se doposud vyskytovaly jenom u méně virulentních kmenů. Geny takové rezistence jsou lokalizovány na chromozomu a přenášejí se horizontálním přenosem. Obsahují více než 10 strukturně odlišných skupin hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. [5]

### 5.3.1 MRSA ve světě

Výskyt kmenů zlatého stafylokoka je geograficky variabilní, ve světě se výrazně liší dle oblasti. Mezi oblasti s nižší prevalencí (cca. 5 %) patří sever Evropy – Skandinávie, Holandsko, Česká republika, naopak Jižní Evropa, USA a Asie patří mezi oblasti s vysokým (až 40%) výskytem stafylokoka rezistentního k oxacilinu. Existují dva mechanismy šíření rezistentních stafylokoků. Jestli kmen rezistentní je, pokračuje šíření již rezistentního kmenu. Pokud získá kmen citlivý na meticilin SCCmec obsahující gen rezistence, stává se rezistentním a dále se šíří v této podobě. První případ infekce MRSA byl nahlášen v 60. letech 20. století i když sekvence genomu poukazuje na výskyt již v 40. letech, dříve, než byl zaveden penicilin. [1,2,10]

V Evropě se obecně zvyšuje prevalence MRSA ze severu na jih kontinentu. Na severu tvoří hodnotu do 5 % zatím co na jihu 25-50 %. V roce 1960 po uvedení meticilinu na trh se již po šesti měsících zjistila pozitivita třech kmenů z 5 000 vyšetřovaných v nemocnici v Jižní Anglii. V roce 1967 se rozšířila dále do Francie, Indie, Dánska, Anglie, Austrálie a Švýcarska s prevalencí až 20 % mezi kmeny. Od 20. let 60. století měla MRSA rostoucí trend, který se ale změnil počátkem 21. století, od kdy má stabilní až klesající trend. Začátkem 80. let klesla prevalence až na 0,2. Např. v Dánsku je od té doby kolem 2 %. [3]

V Evropě dochází k poklesu výskytu HA-MRSA, vzrůstá však výskyt LA-MRSA. Ve spojených státech bylo v roce 2005 rezistentních na meticilin až 53 % izolátů zlatého stafylokoka. Tato rezistence byl uváděna jako nejčastější příčina infekcí kůže v amerických nemocnicích. Výskyt HA-MRSA vykazuje od roku 2005 klesající trend. V roce 2007 byla zavedena mnohostranná preventivní strategie včetně MRSA screeningu a hygienických opatření. Program významně snížil infekce MRSA o 62 % na odděleních intenzivní péče a o 45 % na jiných odděleních. Mezi země s největším výskytem MRSA patří asijské země. MRSA v těchto zemích tvoří až 50 % všech onemocnění vyvolaných zlatým stafylokokem. Největší prevalenci mají země s neomezeně dostupnými antibiotiky i bez lékařského předpisu, Jižní Korea a Japonsko, a to více než 70 %. Míra rezistence bakterie je v těchto zemích kvůli nesprávnému užíváním antibiotik vysoká.

Vrchol prevalence nastal na konci 90. let 20. století a odsud dodnes klesá. Stejně jako Evropa a Amerika, Austrálie také provedla řadu místních a národních opatření, která v roce 2002 vedla ke snížení výskytu HA-MRSA na tomto území. Nejstarší zprávy o přítomnosti komunitní infekce na tomto území pocházejí z 80. let, a to ze západní části. V dnešní době se v této oblasti vyskytuje několik odlišných, již identifikovaných klonů CA-MRSA, mezi kterými se nachází i virulentní klony. Z území Afriky jsou dostupné jen informace z jižní části, prevalence se v některých částech odhaduje na více než 50 %, jinde pod 25 %. Od počátku 21. století se ve většině zemí prevalence zvyšuje, v jižní části od roku 2006 klesla ze 36 % na 24 %. Velkou variací mezi africkými státy vysvětluje i dostupnost a použití antimikrobiálních látek a přítomnost výskytu infekce HIV, která představuje rizikový faktor pro kolonizaci MRSA. [10]

### 5.3.2 MRSA v České republice

Česká republika je od roku 2000 aktivně zapojená do Evropské sítě pro sledování antimikrobiální rezistence (EARS), která shromažďuje data o prevalenci infekce MRSA kultivované z krve. Na území ČR byly doposud zaznamenány 4 MRSA kmeny. Studie začala v roce 1966, v roce 2000 byla zaznamenána přítomnost MRSA v 11 nemocnicích (prevalence 4 %), o pět let později byl výskyt zvýšen až na 51 nemocnic (prevalence 13 %). Od roku 2005 se prevalence drží na stejné úrovni, v porovnání s Evropským průměrem (16,9 %) je však nižší. Všechny kmeny MRSA zaznamenané na území ČR v těchto letech pocházely pouze z několika pandemických klonů – převládajícího brazilsko-maďarského, který tvořil většinu (80 %), následoval klon iberský (12 %). Největší procento záchytu v letech 2000-2002, a to až 70 % všech případů, bylo tvořeno brazilským klonem rozšířeným v roce 1996. V roce 2000 byl brazilský kmen nahrazen velice podobným českým klonem, který tvořil po roce 2002 nejvíce případů, až 68 %. Další klon zaznamenaný na území ČR rozšířený před rokem 1996 byl iberský (z Pyrenejského poloostrova). Po roce 2001 byl detekován stále více endemický klon EMRSA-15. [2,11,25]

Pro zmapování současné epidemiologie byla v roce 2016 až 2018 prováděna studie fenotypu a genotypu ze 618 kmenů MRSA izolovaných z hemokultur pacientů. Většina kmenů MRSA přítomná na území ČR je multirezistentní na řadu antibiotik – erytromycin, klindamycin a ciprofloxacin, méně kmenů bylo pak rezistentních na gentamicin, chloramfenikol a tetracyklin. Mezi kmeny bylo zjištěno 52 různých stafylokokových typů, nejběžnější byly t003, t586, t014 a t002. Nejrozšířenější stafylokokový typ od roku 2004 je t003. Dominantními typy na jednotkách intenzivní péče jsou t003 a t014. [25]

Na území ČR probíhal od roku 2002 do roku 2017 screening genů izolátů z MRSA/mecA. Prováděn byl Národní referenční laboratoří pro antibiotika. Identifikace byla klíčová pro kontrolu šíření patogenu a pro vhodnou volbu léčby infikovaných. Kmeny s nepřítomností genu mecA

byly dále zkoumány na přítomnost genu *mecC*. Celkově bylo izolováno 3472 vzorků z MRSA. Rezistence byla způsobena u 18 vzorků homologním genem *mecC*, u ostatních přítomností *mecA*. Většina byla citlivá na testovaná antibiotika. Molekulární sekvenace odhalila mezi 18 vzorky, které obsahovaly *mecC* gen, přítomnost osmi různých typů stafylokoků, které měly absenci genů kódující TSS, enterotoxiny i exfoliativní toxiny. První detekce izolátu MRSA/*mecC* byla provedena v roce 2004. [24]

## ***5.4 Terapie***

Historie terapie stafylokokových infekcí se datuje od 50. let minulého tisíciletí, kdy po deseti letech od zavedení první antibiotické terapie získal penicilin rezistenci. Bakterie jsou schopny velmi rychle vybudovat rezistenci na každou novou látku, tudíž po zavedení meticilinu v 80. letech si vytvořila bakterie rezistenci i na něj. Náhradou byl vankomycin, na který si opět vytvořila bakterie rezistenci, a to již po deseti letech. V devadesátých letech vznikl již vzpomínaný kmen VRSA, v roce 1997 byl poprvé zaznamenán na vankomycin semirezistentní kmen VISA. [7,12]

Je potřeba si uvědomit, že působení antibiotika je kromě patogenu vystavena i přirozená mikroflóra lidského těla, na které dochází k selekci rezistentních kmenů usmrcováním citlivých bakterií. Antibiotikum by mělo způsobit co nejmenší poškození mikroflóry pacienta. Nadměrné používání antibiotik selekci jenom zvyšuje, kmeny se stávají rezistentnější na dané antibiotikum. [7]

Na léčení infekcí se využívají dva druhy terapií. Specifická terapie je nasazována po identifikaci původce vyšetřením citlivosti na ATB a je následována doporučením mikrobiologa. Empirická terapie se využívá u pacientů, u kterých je riziko prodloužení infekce čekáním na výsledek specifické terapie, která určuje původce diagnózy. Účinek spočívá v navázání a následné inhibici cílového místa působením antibiotika. Nasazují se dle určené diagnózy a klinických příznaků. [5,7]

Antibiotika se stejnou základní strukturou mají stejný účinek. Zasažená cílová struktura ovládá syntézu určitého druhu makromolekul potřebných pro přežití bakterie. Polovina antibiotik účinkuje na buněčnou stěnu bakterie. Betalaktamy a glykopeptidy inhibují enzym syntetizující peptidoglykan, váží se na něj a ruší jeho funkci, a tak způsobují poškození membrány a následnou lýzu buňky. Čtvrtina antibiotik inhibuje syntézu bílkovin, patří mezi ně tetracykliny, makrolidy, chloramfenykol, aminoglykosidy i oxazolidinony. Zasahují různá místa povrchů ribozomů, kde interferují s molekulami m-RNA, t-RNA nebo interferují s DNA, a tak zabraňují replikaci bakteriálního chromozomu a tím i množení buněk. K inhibici syntézy nukleových kyselin DNA dochází i v přítomnosti fluorochinolonů. Většina kmenů, které produkují enzymy betalaktamázy, se léčí enzymaticky stabilními peniciliny, mezi které patří i naftacilin. Na léčbu meticilin

rezistentního stafylokoka se využívá vankomycin, úspěšně byl použit i muciprocin. Mezi členy skupiny betalaktamových antibiotik patří peniciliny, cefamyciny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy, mezi ty patří mnoho dalších zástupců lišících se strukturou připojeného kruhu na základní betalaktamový kruh. Alternativní léčba zahrnuje také léčba cefalosporiny I. generace, ty bohužel nejsou zcela stabilní a existuje jistá variabilita. [5,7]

Úspěšnost terapie akutní stafylokokové infekce je vázána na komplexní řešení systémové zánětlivé reakce a na podání antimikrobiálních léků. Terapie chronické stafylokokové infekce je i kvůli náročnému získání materiálu pro diagnostiku kvůli intracelulárně uloženým bakteriím velice náročná, vyžaduje kooperaci chirurga a imunologa. Izolace se provádí hlavně u nemocničních pacientů, pokud je úspěšná, na léčbu se může užít autovakcína. Vyrábí se antistafylokokový fágový lyzát a stafylokokový anatoxin který obsahuje 80 % jeho exoproduktu – toxoidu  $\alpha$ -lyzinu, tvořeného ze stafylokokového toxinu. Toxiny jsou bílkoviny antigenní povahy transportované do venkovního prostředí organismu přes aktivní transportní sekrečními mechanismy. Vyvolávají tvorbu protilátek – antitoxinů. Toxin můžeme spontánně pozvolna detoxikovat zvýšením teploty, působením UV záření nebo chemicky vlivem formolu nebo pepsinu na toxin. Po několika týdnech dojde ke změně toxoformních skupin a k vymizení toxicity, imunogenita je však zachována. Takto pozměněný toxin se nazývá toxoid a využívá se k očkování proti onemocnění, které je vyvoláno daným toxinem, např. stafylokokové otravy z potravin, syndrom toxického šoku, u jiných bakterií i proti záškrtu, antraxu, tetanu a botulizmu. [1,5,7]

Hnisavé choroby se léčí převážně lokálně – odstraňováním strupů, hnisu, šupinek, dezinfekcí postiženého místa a preventivním ošetřováním okolní kůže. Pro léčbu se používají masti s 3-10% obsahem kyseliny salicylové, u dlouho léčených onemocnění např. ekzémů je osvědčená výměna více typů dezinfekčních mastí a obkladů. Při hloubkových infekcích místní ošetřování nestačí. Využívají se autovakcíny nebo formolové toxiny stafylokoků – stafylokokový anatoxin. Záněty potních žláz se léčí lihovými dezinfekčními roztoky s ozařováním, u onemocnění vlasů je pro prevenci šíření nutná epilace v rozsahu velikosti chorobní léze zvětšenou o 1 cm a pravidelné mazání 1-3% jódovou tinkturou, lihovým 0,1% roztokem či dezinfekční mastmi s obsahem kyseliny salicylové. [4]

Pokrokem terapie je v dnešní době zavedeno více než 100 perspektivních látek pro hledání nových mechanismů účinku, část je již u klinických zkoušek prováděných většinou malými nebo středně velkými firmami. Látky jsou zaměřené na hledání nových mechanismů účinku, které navozující přístup k novým cílovým strukturám. Nová cílová místa jsou zaměřena hlavně na nukleotidové struktury genomu s využitím genomiky popsané bezproblémově již u několika desítek druhů bakterií. [5]

### 5.4.1 Terapie oxacilin rezistentních kmenů

Výběr antibiotik pro rezistenci je omezen rezistencí k semi-syntetickým penicilinům (methicilin, oxacilin), všem ostatním  $\beta$ -laktamům i s jejich kombinací s inhibitory  $\beta$ -laktamázy. Cílená terapie MRSA využívá betalaktamáza stabilní peniciliny jak vankomycin, linezolid, daptomycin a chinopristin-dalfopristin. Existují možnosti alternativní léčby pacientů postižených oxacilin rezistentním kmenem stafylokoka i doplňková terapie zahrnující podávání intravenózního imunoglobulinu, aktivovaného proteinu C a mimotělní membránové oxygenace. I když platí, že oxacilinová rezistence je zkřížená pro všechna  $\beta$ -laktamová antibiotika, mezi zástupci této skupiny existují rozdíly afinit k PBPs 2a. Nejvyšší stupeň aktivity vykazuje penicilin, ampicilin a amoxicilin. [1,7]

Pro terapii vážných stafylokokových infekcí byl za jeden z nejspolehlivějších léků kdysi považován vankomycin. Využíval se pro léčbu pacientů s alergií na penicilin nebo při prokázané rezistenci k oxacilinu. Později byly v Japonsku a částech USA izolovány kmeny s redukovanou citlivostí k tomuto antibiotiku. Tolerance byla určena na 8 mg/l (MIC). Za méně účinné antibiotikum pro terapii oxacilin rezistentních kmenů stafylokoku se považuje teicoplanin, na který byl ale později v průběhu léčby také izolován mutantní rezistentní kmen. Významnou protistafylokokovou aktivitu mají i antibiotika skupiny fluorochinolonů které byly dříve vyvinuté proti gramnegativním infekcím. V našich podmínkách zastoupené ofloxacinem, pefloxacinem a ciprofloxacinem. Rezistence k oxacilinu může být sdružená s rezistencí k fluorochinolonům. Mezi další antibiotika účinné v terapiích infekcí patří klindamycin a rifampicin inhibující proteosyntézu, potlačující produkci toxinu PVL, proti kterému však vzniká ve velkém procentu v průběhu terapie rezistence, proto se podává především v kombinaci s vankomycinem. Omezeně využívaný je kvůli kombinované rezistenci také baktericidní syncerid, vysoce aktivní na oxacilin rezistentní stafylokoky. Velmi nadějně používané jsou také deriváty cefalosporinových a karbapenemových antibiotik i nové skupiny vysokoúčinných druhů jako glycylycylinů a oxazolidinonů. Při terapii stafylokokových infekcí je nutno pamatovat na riziko vzniku tolerance nebo úplné rezistence u pacienta v průběhu jeho terapie. [1]

### 5.4.2 Rizikové faktory

Pro efektivní kontrolu šíření MRSA v jakémkoliv prostředí je nezbytné znát rizikové faktory onemocnění a způsoby jeho šíření. Nejdůležitější metodou zamezení přenosu a šíření MRSA v nemocnicích zůstává hygiena rukou a pravidelná dezinfekce, která prokázala významné snížení přenosu MRSA, zkrácení doby hospitalizace, užívání antibiotik i zamezení vzniku multirezistentních bakterií. Mezi všeobecně více ohrožené skupiny patří děti do dvou let, pacienti

s implantovanými chlopenními náhradami nebo zavedenými močovými katetry, pacienti s potlačenou imunitou nebo jejím defektem, jedinci ze sociálně slabších rodin, sportovci provozující individuální i kontaktní sporty, narkomani, homosexuálové a vojáci. Bylo identifikováno několik faktorů, které ovlivňují výsledek – infekce rukou, lokalizace infekce, léčba, původce i účinnost antibiotické terapie a následný zdravotní stav pacienta. [7,13,15]

Nárůst multirezistentních kmenů způsobuje problémy nejen v nemocnicích ale i v domovech pro seniory. Starší lidé jsou vystaveni většímu riziku infekce, která může poté přenosem ohrožovat i přítomný ošetřující personál. Mezi rizikové faktory přenosu byly zařazeny chronické kožní onemocnění, oslabená imunita, a trvale zavedené objekty jako katetry a trubice. Rizikovým faktorem u dětí je kromě delšího pobytu v nemocnici, který není rizikový faktor jenom pro onemocnění MRSA ale i pro onemocnění na multirezistentní gramnegativní bakterie, přítomnost osteomyelitidy a dermatózy rizikový faktor i vysoký celkový počet leukocytů, který byl přítomen až u 80 % dětí testovaných na onemocnění MRSA. Nebezpečí přenosu infekce z nosiče na novorozence zvyšuje nízká porodní hmotnost dítěte a porod císařským řezem. U profesionálních chovatelů prasat existuje riziko přenosu varianty LA-MRSA antropozoonózou na chovatele. Prevalenci LA-MRSA ovlivňují podmínky chovu. Alternativní farmy vysoké produkce s charakteristickou častou aplikací léčiv a hormonálních preparátů zvířatům vykazují vyšší dynamiku kolonizace, v ekologických farmách nebyla zjištěna téměř žádná kolonizace. Šíření ovlivňuje počet prasat v objektu, materiál podestýlky, období výkrmu a antibiotická léčba. [14,15,16]

Incidence multirezistence je vysoká při přítomnosti rezistence bakterie na klindamicin a levofloxacin. Rizikové faktory pro rezistenci na klindamicin zahrnují nitrožilní užívání léků a přítomnost HIV viru, hepatitidy typu C, nebo přítomnost nozokomiální infekce. Pacienti trpící hepatitidou C, jinou nozokomiální nákazou a pacienti, kteří jsou léčeni intravenózním podáním léků mají dva krát vyšší pravděpodobnost získání rezistentní formy na klindamycin, ve studii z roku 2005 mělo tuto formu až 58 % všech pacientů s onemocněním MRSA. Pacienti s anamnézou HIV mají pravděpodobnost až šest krát vyšší. Až 67 % pacientů s klindamicin rezistentním kmenem mělo v anamnéze předchozí nozokomiální záznam. Při analýze rizikových faktorů infekcí MRSA v letech 2010 až 2012 se pravděpodobnost onemocnění u pacientů nitrožilně užívajících léky zvýšila až 11krát, u pacientů s nozokomiální infekcí byla pravděpodobnost až 5krát vyšší. Z těchto údajů vyplývá, že pacienti nitrožilně užívající léky nebo ti s nedávným kontaktem se zdravotnickými zařízeními mohou být potencionálním rezervoárem vznikající rezistence MRSA. Při rezistenci na levofloxacin má význam přítomnost diabetu a horečky při počátečním projevu. Diabetičtí pacienti mají pravděpodobnost získání levofloxacin rezistentního kmenu 2,5krát vyšší, pacienti se zvýšenou teplotou nad 38 °C dva krát vyšší. V studii mělo MRSA rezistentní na levofloxacin 39 % postižených pacientů. Rizikovými faktory

pro rezistenci u obou antibiotik jsou pacientovy hodnoty C-reaktivního proteinu, rychlost sedimentace erytrocytů a počet bílých krvinek. Rezistence na obě antibiotika je zatím statisticky nevýznamná i když v posledních letech vzrostla. [13]

## 5.5 Diagnostika

Ve vzorcích pacienta diagnostikujeme mikroorganismus, jeho produkt nebo provádíme test produkce protilátek jako odpověď pacientovy imunity na infekci. Mimo rutinní praxe stafylokoky diferencujeme od fylogeneticky podobných bakterií taxonomicky typem peptidoglykanu v buněčné stěně bakterie a procentuálním obsahem bází guaninu a cytosinu. Prakticky lze odlišit stafylokoka od mikrokoka sledováním mikroskopické morfologie, taktéž produkcí pigmentů při kultivaci, a i biochemickými testy na průkaz oxidázy. Pro diagnostiku se musí původce nejdříve izolovat, následně se vyšetří citlivost k ATB, prokáže se, nebo se vyšetří protilátky. [1,5,7]

K nejrozšířenějším metodám odlišení stafylokoka od velice podobného mikrokoka je stanovení citlivosti na furazolidon nebo bacitracin při kultivaci pomocí komerčně vyráběných disků. Kultivace probíhá kvůli potřebám stafylokoků v aerobních podmínkách, výjimku však tvoří dva kataláza-negativní druhy vyžadující anaerobní prostředí, *S. aureus* subsp. *Anaerobius* a *S. saccharolyticus*. MRSA kmeny se odlišují svým fenotypem. Pro diagnostiku se doporučuje kombinace vícero metod s ověřením výsledků. Kmeny se dají odlišit i kvantitou produkce  $\beta$ -laktamů (penicilináz) nitrocefínovým testem. Některé kmeny produkují jenom malé množství  $\beta$ -laktamáz. Pokud test vyjde negativní, indukuje se s pomocí 1 $\mu$ l oxacillinového disku [1,2]

### 5.5.1 Metody diagnostiky

V minulosti se využívaly nepřesné testy produkce deoxyribonukleázy, která je však produkována kromě *S. aureus* i *S. intermedius* i řadou různých druhů koaguláza negativních stafylokoků. Deoxyribonukleáza štěpí molekuly DNA na mononukleotidy a polynukleotidy. Test probíhá na agarové půdě, která se po přidání NaCl zakalí, vznikne viditelná precipitace. Samotné nukleotidy nereagují, neprecipitují s NaCl. Test odlišuje *S. epidermidis* jako negativní výsledek a *S. aureus* (*S. intermedius*) vychází pozitivně. [1,6]

Metody přímého průkazu se využívají pro průkaz mikroba přímo ve vzorku a pro identifikaci izolovaného nebo vykultivovaného kmene. Mezi základní metody patří mikroskopie rozlišující gram-pozitivní a gram-negativní tyčky a koky. Celá čeleď stafylokoků spadá pod gram pozitivní koky. [1]



Kultivace je také rutinně využívaná v klinické praxi, stafylokoky se kultivují z výtěru krku, nosu, rán či sputa na krevním agaru s přídavkem 10% NaCl. Kolonie rostou po 24 hodinách na plochách s máslovitou konzistencí široké 2 mm, pro zlatého stafylokoka je typická nazlátlá barva kolonií, jiné druhy mají kolonie bělavé. Kultivace na krevním agaru se užívá pro odlišení kolonie stafylokoka od kolonií jiných bakterií. Vyhledávací metody záchytu rezistentních kmenů s pomocí oxacilinového disku jsou pomalejší, podporuje ho přídavek 2-4% NaCl na agar před kultivací pro lepší záchyt rezistentních kmenů a podporu jejich růstu. V kultivaci je důležitá kvantifikace počtu bakterií (např.  $10^{-5}$  v 1 ml moči). Selektivita pro MRSA kmeny a kmeny koaguláza negativních stafylokoků s *mecA* genem je téměř 100%. U kultivace lze odlišit stafylokoky dle stupně hemolýzy, koaguláza negativní mají jenom delta hemolysin, alfa stafylokoky a zlaté stafylokoky mají výraznější hemolysin. [1,2,5,7]

Biochemické identifikační metody slouží k odlišení stafylokoků od streptokoků nebo enterokoků které mají mikroskopicky podobné vlastnosti. Patří mezi ně test průkazu katalázy pro odlišení kataláza pozitivních a kataláza negativních druhů bakterií, který u stafylokoků vychází pozitivně, test oxidázy je u stafylokoků negativní. Užitečnější test se zaměřuje na produkci termostabilní nukleázy (tzv. tnázy). Kromě koaguláza-pozitivních streptokoků produkuje tnázu i kmeny *S.schleiferi*, u některých testů i *S.lugdunensis* u kterých je ale koaglutinace mnohem jemnější. [1]

Pro stafylokoky velmi typickou koagulázu (plazmakoagulázu) můžeme prokazovat vázanou nebo volnou. Test produkce volné koagulázy uvolňované bakterií do prostředí při růstu stafylokoků odlišuje koaguláza pozitivní a negativní stafylokoky, využívá se velmi spolehlivá komerčně vyráběná souprava založená na antigenní analýze Staphytest 16. Vázaná koaguláza tzv. clumping factor (shlukovací faktor) je sraženým fibrinogenem tvořený obal chránící stafylokoky před poškozením. Prokazuje se sklíčkovým testem, suspendováním stafylokoků do kapky králičí plazmy pro screening pozitivních kmenů, *S. aureus* se koaguluje a vytváří dobře patrné shluky. Test je však vysoce nepřesný. Lepší možností je použití osvědčené metody latexových testů pro zjištění shlukovacího proteinu A, důležitého povrchového antigenu u zlatého stafylokoka. [1]

Latexová aglutinace prokazuje stafylokokové skupiny – A, B, G. Využívají se komerčně vyráběné soupravy, latexové částice obalené lidským fibrinogenem a purifikovaným imunoglobulinem G nebo jeho fragmentem Fc se sráží v přítomnosti SPA. U stafylokoků se dále může prokazovat hyaluronidáza (faktor průniku), enzym hydrolyzující mezibuněčný tmel – kyselinu hyaluronovou. Jedná se o rychlou, levnou a velmi spolehlivou metodu. [1,5,6]

Staphytest 16 se používá kromě průkazu volné koagulázy i pro odlišení jednotlivých druhů. Kombinací většího počtu enzymatických reakcí s osmi základními testy určení lze po změně zbarvení reakčního důlku odlišit klinicky významné stafylokoky. Využívá mikrometody k odečtu jednotlivých, při pozitivitě charakteristicky zbarvených reakčních důlků. U pozitivní fosfatázové

reakce vidíme červenofialové, u zkvašování cukrů žlutohnědé zbarvení, červené zbarvení u ureázy, červeno-růžové u VP testu a fialovočervené při pozitivním nitrátovém testu, který mění barvu po přidání práškového zinku. Přítomností bublinek prokazujeme katalázovou pozitivitu. Kataláza umožňuje rozlišení stafylokoků a morfologicky podobných enterokoků a streptokoků. Odčítávání se provádí fotometricky nebo okometricky. Pro ověření positivity pyrázy Staphytestem 16 se používá PYR-test, detekující enzym pyrrolidonyl-arylamidázu charakteristický pro identifikaci stafylokoků ze skupiny A. [1,6]

#### Identifikace koaguláza – pozitivních stafylokoků (KPS)

V lidském biologickém materiálu přichází v úvahu jenom *S.aureus* a *S.intermedius*. *S. intermedius* je identifikován pomocí testu volné koagulázy s pozitivním výsledkem a latexovým testem s negativním výsledkem. Tyto kmeny nikdy neprodukují karotenoidní pigment. Kmeny *S. intermedius* produkují  $\beta$ -hemolysin, toxin rozpouštějící erytrocyty, který se projeví na krevním agaru částečnou  $\beta$ -hemolýzou přecházející do úplné hemolýzy. [1,5]

#### Identifikace koaguláza – negativních kmenů stafylokoků (KNS)

Skupinu KNS zastupují tři stafylokoky, nejčastěji se vyskytující v lidském biologickém materiálu. Jedná se o *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* a *S.hominis*. Tvoří asi 90 % všech záchyťů KNS v biologickém materiálu. Základem je rozdělení na dvě skupiny dle rezistence k novocibinu. Využívá se klasický diskový difuzní test na Müller-Hintonově půdě, disky obsahují koncentraci 5pg. Pozitivita je určena průměrem inhibiční zóny rovným nebo vyšším než 16 mm. Do skupiny novocibin rezistentních stafylokoků patří *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S.hominis*, dále také původce infekcí močových cest *S.saprophyticus*, subsp. *Hyticus* který byl prvně popsán českým profesorem Hájkem z Olomouce. Vzácně se může u koaguláza-pozitivních kmenů vyskytovat i rezistence k novocibinu.

Identifikaci KNS lze provést jednoduše dle dichotomického schématu ORIDES pomocí oddělení oxidáza-pozitivních stafylokoků a pomocí testů xylózy, sacharózy a trehalózy u zůstávajících kmenů. Lze je samozřejmě identifikovat i podle komerčních Staphytestů obsahujících 16 testů na jednom stripu, sedmnáctý test je samostatný VP test. U kmenů *S. hominis* subsp. *Novobiosepticus* je nutné používat klasický diskový difúzní test kvůli neschopnosti Staphytestu 16 zachytit rezistenci tohoto kmenu. Výsledek pyrázy na staphytestu 16 je nutno ověřit samostatným PYRA-testem, ten totiž může být falešně pozitivní. Staphytesty nedokáží jednoznačně určit kmeny *S.intermedius* a *S.aureus*, pro zřetelné odlišení je nutno provést ještě test volné koagulázy nebo shlukovacího faktoru. Vlastní identifikace je zprostředkována inovovaným systémem české sbírky mikroorganismů v Brně, poskytuje ji firma Lachema. [1]

Mezi metody průkazu řadíme i metody molekulární biologie pro průkaz části DNA mikroba v materiálu. Mezi molekulární metody řadíme několik metod. Hybridizační metody využívající DNA sondy, krátké úseky DNA schopné specificky detekovat komplementární úsek patogenního DNA genomu bakterie. Fragment DNA hledá ve vzorku svou komplementární kopii DNA nebo RNA. Vazba se pozná podle specifické protilátky navázané na sondu značenou radioizotopem nebo fluorescenční látkou (biotin nebo streptavidin). Metoda je náročná, proto byla z velké části nahrazena jinými. Pro amplifikaci vzorku m-RNA buňky na identifikaci se využívají DNA mikročipy, které obsahují několik tisíc krátkých fragmentů jednotlivých genů naadherovaných na nosiči, skleněné nebo křemíkové destičce. Po amplifikaci dochází k rozštěpení a hybridizaci RNA buňky na jednotlivé fragmenty čipu. Vzorek se identifikuje podle vazby na známé fragmenty genů na nosiči. [5,7]

Polymerázová řetězová reakce – PCR, je nekultivační technika průkazu toxinu nebo strukturální komponenty mikroba. Odhaluje přítomnost cílového genu jednotlivého organismu ve vzorku prodlužováním řetězců pomocí primerů, úseků DNA obsahujících 20 nukleotidů neomezeně amplifikujících původní oblasti komplementárních vláken DNA. Metoda je využívána hlavně pro těžko kultivovatelnou virologii, je rychlá, výsledky jsou dostupné od 1 do 3 hodin. V poslední době je tato metoda nahrazována rychlejší real-time PCR (rt-PCR) která využívá stejné principy a techniky, navíc však obsahuje fluorescenčně značené sekvenční specifické sondy, které hybridizují s hromadícími se amplikony, amplifikovanými produkty a umožňují monitoring v reálném čase na rozdíl od klasické PCR, která poskytuje výsledky až po dokončení reakce. Množství fluorescence je přímo úměrné množství vytvořeného amplikonu. [7]

Hmotnostní spektra bílkovin analyzujeme levnou a přesnou fyzikálně-chemickou metodou založenou na hmotnostní spektrofotometrii s názvem Maldi-Tof. Dále mezi molekulární metody patří sondy peptidových nukleových kyselin, které pronikají dovnitř buňky a tím přímo komplementárně hybridizují s nukleovou kyselinou a hybridizace kontrolována fluorescenční mikroskopií. [5,7]

### 5.5.2 Laboratorní detekce oxacillin rezistentních kmenů

Průkaz lze provádět několika metodami, ty se liší i druhem prokazované populace. U heterogenní populace a u směsi různě citlivých a rezistentních buněk je průkaz složitější než u homogenní populace. Pro plnou expresi genů se používá kultivace při nižší teplotě s přidavkem NaCl v růstovém médiu. Kolonie se následně jeví jako různě pigmentované, velké kolonie s jinou hemolýzou. Nově se používají pro screening specificky selektivní chromogenní média metabolizující substrát za uvolnění chromogenu a vizuální změny barvy kolonii. Velice rozšířená metoda testu radiační antimikrobiální citlivosti všeobecně rezistentních kolonií se provádí

s použitím 1 µg oxacilinového disku v diskovém difuzním testu. Je to metoda rychlá, dostupná, s vysokou specifitou kolem 80 %. Senzitivita reakce se zvyšuje přidavkem 2% NaCl do živného média a s prodloužením kultivace na 2 dny. Dalším způsobem je citlivější diluční metoda se zachováním standardních podmínek. Obě metody vyžadují 18–24 hodin inkubace po izolaci mikroorganismu. V posledních letech byly vyvinuty komerční testy pro rychlou detekci MRSA přímo z výtěru ran, nosu i z pozitivních hemokultur. [1,18]

Jako screeningové testy se využívá rt-PCR a další molekulární testy, hlavně díky kratší době a schopnosti detekovat MRSA kmen i přímo z výtěrů ran a nosu, molekulární metody mají schopnost odlišit SPA od MRSA přímo z hemokultur. Přímou lze také využít velice efektivní vyhledávací metody, kdy agar již obsahuje 4% NaCl pro stimulaci růstu oxacilin rezistentní subpopulace. Tato metoda je téměř 100 % senzitivní pro detekci MRSA kmenů ale i koaguláza-negativních stafylokoků s mecA genem. [1,18]

Ostatní způsoby stanovení využívají vysoce specifické automatizované systémy s nižší senzitivitou. Od roku 1999 kmeny produkují PVL, který se přenáší mezi heterogenními kmeny SPA pomocí bakteriofágů. PVL pozitivní kmeny MRSA mají malá ohniska a případy jsou sporadické, molekulární testování genů se zatím rutinně neprovádí. Pacient má velmi vysoké hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) a může, zároveň však nemusí mít leukopenii. [17]

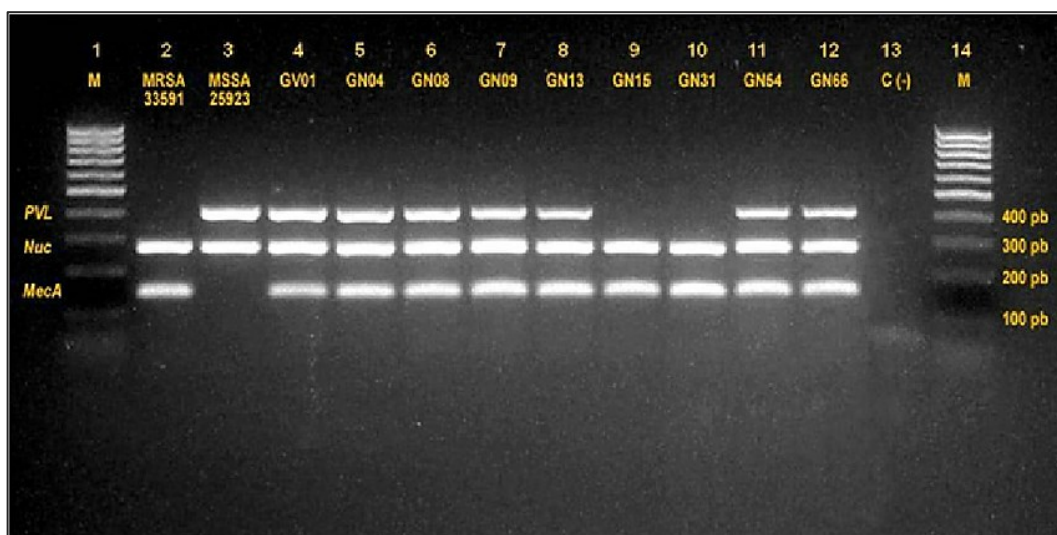
### 5.5.3 Diagnostika u těhotných žen a novorozenců

Mezi ohroženou skupinu populace patří i novorozenci. Nebezpečí výskytu infekce je u nich vysoké. MRSA často způsobuje ohniště infekce na neonatálních jednotkách intenzivní péče zanesením z infikovaných asymptomatických rodičů, sourozenců, návštěvníků i zdravotnických pracovníků. Celosvětová souhrnná prevalence mateřské kolonizace byla 3,23 %. Nejvyšší míra kolonizace, až 15,34 %, je mezi černošskou populací v Africe, nejnižší míra je v Evropě (do 1,51 %). Odhaduje se, že světově je infekcí MRSA zasaženo až 4,5 milionů žen. Během těhotenství se nabízí těhotným možnost screeningu MRSA z nosí dutiny při první návštěvě porodní asistentky mezi 13. a 20. týdnem těhotenství. Rizikovými faktory významně spojenými s výskytem infekce zanesením je nízká porodní hmotnost, dlouhý pobyt na jednotce intenzivní péče a porod císařským řezem. [19,20,21]

Pozitivní přenašečky jsou izolovány od ostatních gravidních žen, před léčbou se provádí výtěr krku, nosu a hráze. Podíl přenašeček mezi těhotnými ženami byl ve studii z Dánska, do které měly těhotné matky možnost vstoupit v roce 2015, 0,11 %, Nejvíce bylo infekcí komunitních, ty pocházely od budoucích matek přenašeček v období šestinedělí. Většinu pozitivních žen tvořily zdravotnické pracovnice. Vzorky byly naočkovány do standardního bujonu s přidavkem 2,5 %

NaCl, na krevní agar a chromový agar, citlivost se prováděla diskovou difuzí s využitím systému EUCAST. Potvrzení infekcí probíhalo pomocí PCR, pozitivní výsledky byly sekvenovány a genom byl zapsán do databází. Účast na studii přijalo 72 % oslovených žen, MRSA byla pozitivní u 0,2 % z nich. [7,19,20]

**Obrázek 2 – Multiplexní PCR pro detekci genů *nuc*, *mecA* a *PVL***



Multiplexní PCR byla použita k potvrzení druhu *Staphylococcus aureus* (gen *nuc*), rezistence na methicilin (gen *mecA*) a přítomnost genů *PVL* u těhotných žen. Dráhy 1 a 14 jsou markery DNA molekulové hmotnosti, dráhy 2 a 3 obsahují referenční kmen ATCC 33591 (*nuc* a *mecA* pozitivní, *PVL* negativní) a referenční kmen ATCC 25923 (*nuc* a *PVL* pozitivní, *mecA* negativní). Reprezentativní izoláty se nacházejí na dráhách 4 až 12. Negativní kontrola PCR reakcí se nachází na dráze 13.

Zdroj: Oscar Correa Jimenez / 2012 (převzato) <https://www.researchgate.net/profile/Oscar-Correa-Jimenez/publication/246044269/figure/fig2/AS:298363602915339@1448146834314/Multiplex-PCR-for-detection-of-nuc-mecA-and-PVL-genes-Multiplex-PCR-was-carried-outto.png>

## 5.6 Prevence

Nemocničním infekcím lze předcházet. Úplným a klíčovým základem prevence před nejenom kožním onemocněním je dostatečná hygiena kůže, vlasů a nehtů jak na pracovišti, tak v běžném životě. Poslední studie z USA potvrdily snížení úmrtnosti před a po klinickém vyšetření z 8,3 % na 2,3 %. Ze dvou milionů infekcí je v USA ročně smrtelných přibližně 100 000. Podle posledních studií lze zabránit správným mytím rukou až třetině všech nemocničních infekcí. Hnisavým kožním onemocněním je způsobeno až 8 % pracovní neschopnosti. [4,7]

Předpoklady prevence na pracovišti zahrnují tyto opatření: vedení přesné evidenci chorob, používání ochranných materiálů, oděvů a rukavic jako součást individuální ochrany kůže a taktéž včasná výměna, dezinfekce a čištění prostorů. Důležitá je také hygiena na pracovišti, správná ventilace prostoru pro snížení teploty a vlhkosti, manuální odstraňování prachu pro zábranu přenosu bakterií. [4]

Rezistentní bakterie mohou přetrvávat na suchých površích až 4-5 měsíců. Nejúčinnější dezinfekcí prostředí je detailní fyzikální čištění celé místnosti. To musí zajistit odstranění mikroorganismů a zamezit opětovné kontaminaci. Výhodné jsou i v laboratoři využívané zařízení s ultrafialovým světlem. Bylo prokázáno snížení výskytu rezistentních bakterií používáním chemického antiseptika chlorhexidinu. U vysoce rizikových jednotek jako jsou transplantační oddělení kostní dřeně či jednotky intenzivní péče byla prokázána účinnost právě této látky. S hygienou pracoviště souvisí i hygienicko-technické opatření, pod kterými si můžeme představit odstranění částí náradí, přístrojů, nábytku nebo jiného objektu nebo části v prostoru ze kterých byl zaznamenán přenos nemoci, např. ostré hrany a hrboly, zahrnuje také vyřazení poškozených strojů a dalších předmětů které by mohly být nástroji vzniku mikrotraumat, drobných poškození kůže nebo sliznic a vniku bakterií. [4,22]

Bakteriální rezistence se nelze úplně zbavit. Rezistence je přirozená evoluční reakce na přítomnost antibiotika v prostředí lidského organismu. Lze ji snížit nebo omezit přítomností rezistentního antibiotika. Je potřeba si uvědomit, že působení antibiotika je kromě patogenu vystavená také přirozená mikroflóra lidského těla, na které dochází k selekci rezistentních kmenů usmrcováním citlivých bakterií. Antibiotikum musí způsobit co nejmenší poškození tohoto systému pacienta. Nadměrné použití antibiotik selekci jenom zvyšuje, kmeny se však stávají rezistentnější na dané antibiotikum. [5,7]

Základem je komplexní přístup v praxi, racionální antibiotická politika, kterou vykonávají antibiotická střediska a národní referenční laboratoř, která nakládá s vybranými antibiotiky v nemocnicích. Mezi její kompetence patří i vydávání antibiotik na lékařský předpis, dodržení doporučení odborníků a směrnic o vybírání antibiotik, omezení použití širokospektrálních ATB, dodržování dávek a intervalu léčby. Strategie k dlouhodobému snížení rezistentních bakterií zahrnuje identifikaci přenašečů, molekulární typizaci ohnisek, opatření k přerušení přenosu infekce a odstranění ekologických rezervoárů ve zdravotnických zařízeních, komunitách a mezi hospodářskými zvířaty. Šíření antibiotické rezistence zabraňuje antibiotická politika. Antibiotika by se měla využívat pouze vhodným způsobem – k léčbě nebo profylaxi nemoci. Před zavedením léčby je nutno zhodnotit citlivost *in vitro*, farmakokinetiku a mechanismus rezistence k dané látce. Látka by se neměla podávat, pokud není antibiotická léčba pro pacienta nevyhnutelná. Antibiotikum by se mělo podávat to nejvhodnější, které je schopno léčit pacienta nebo zabránit

rozvoji infekce. Při použití antibiotik je nutno dobrat předepsané množství a nepřerušit léčbu, pokud to není životně nevyhnutné. Použití antibiotik k profylaxi se doporučuje jenom na určitou dobu za jasně stanovených podmínek. [7,22]

### 5.6.1 Screening

MRSA způsobuje závažnou zdravotní hrozbu, která stále více znepokojuje lékaře, orgány veřejného zdraví i širokou veřejnost. Naposled v březnu roku 2010 bylo v Římě opětovně zorganizováno setkání odborníků Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (ESCMID) s Mezinárodní společností pro antimikrobiální chemoterapii (ICC) zaměřené na preventivní a kontrolní opatření a na léčbu MRSA infekcí. Země s nízkou prevalencí nebyly považovány za hlavní problém, pozornost byla věnována lokalitám s endemickým výskytem MRSA. [23]

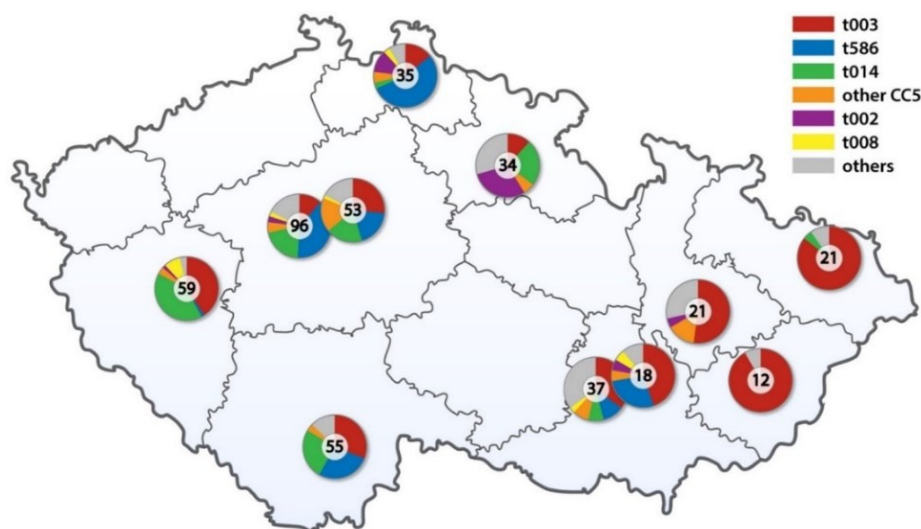
Screening detekuje přenos MRSA využitím mikrobiologických postupů. Je doporučeno několik míst odběru pro screeningové vyšetření. Vždy by měl být zahrnut výtěr z nosní dutiny, který je typicky vždy pozitivní u přenašečů onemocnění. Pokud je zjištěna infekce MRSA u pacienta, je provedena kontaktní izolace pro zábranu přenosu. Screening se vykonává i před propuštěním pacienta z nemocnice pro vyloučení možného přenosu mimo zařízení. Komplexním aspektem z hlediska péče o zaměstnance i z hlediska mikrobiologie je screening pracovníků. Existují různé kategorie screeningu. Může být anonymní za účelem podpory hygieny pracovníků, před nástupem do zaměstnání, pro naplánování eradikačního režimu nebo pro potvrzení eradikace MRSA. [23]

Ke sledování rezistence se využívají národní a mezinárodní systémy. Systém dozoru (surveillance) varuje zdravotnický personál o zachycení neobvyklé rezistence, slouží k časnému zachycení nových forem rezistence, sbírá a analyzuje data. Provádí se na vícero úrovních. Místní surveillance sleduje nemocniční situace, celostátní a mezinárodní systém slouží k sběru epidemiologických dat kmenů. Hlavní specifika účelného monitorování provádí Spojené státy americké. Evropské monitorování provádí EARS (evropská síť antibiotické rezistence), zahrnuje sběr dat z rutinně prováděných vyšetření citlivosti v 900 laboratořích z 1500 nemocnic v 33 evropských zemích. Každoroční výsledky problémových druhů bakterií, jako je například zlatý stafylokok, uveřejňuje na webových stránkách. Sleduje se pouze druhy izolované z problémových infekcí např. meningitid, pneumonií, sepsí apod. [5]

V období od září 2017 do ledna 2018 bylo na 11 odděleních klinické mikrobiologie od hospitalizovaných i ambulantních pacientů odebíráno izoláty MRSA z výtěrů nosu, krku a kůže za účelem provedení screeningu MRSA pacientů s rizikovými faktory pro rozvoj MRSA infekce a stanovení stafylokokových typů. Během 5měsíční studie bylo odebráno 441 izolátů MRSA.

Mezi shromažďovaná data patřil věk, pohlaví, místo výtěru a diagnóza spojená s MRSA izolací. Původ byl definován jako HA-MRSA, pokud se příznaky infekce projeví po více než 48 hodinách od přijetí, nebo pokud byl pacient v tomto období hospitalizován. Pokud infekce nespĺňovala tyto kritéria, byla klasifikována jako CA-MRSA. Izoláty byly identifikovány pomocí hmotnostního spektrofotometru MALDI-TOF, přítomnost *mecA* genu byla stanovena kvantitativní PCR. Dále byly identifikovány další parametry, gen *arcA* charakteristický pro argininový katabolický mobilní komplex, geny *lukSF-PV* a kódující PVL. Citlivost se testovala pomocí difúzní diskové metody na následující antibiotika: oxacilin, erytromycin, cefoxitin, gentamicin, klindamicin, tetracyklin, ofloxacin, tifampicin, vankomycin, teikoplanin, trimethoprim/sulfamethoxazol, linezolid, ceftarolf a tigecyklin. [11]

**Obrázek 3 – Rozdělení nemocnic účastnících se studie**



Koláčové grafy vykazují nejběžnější přítomné stafylokokové typy.

*Zdroj: Oxford University Press, 2021 (převzato) J Antimicrob Chemother, Volume 76, Issue 1, January 2021, Pages 55–64, <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa404>*

Průměrný věk pacientů byl 67,06 let (v rozmezí 1 den až 107 let). Hospitalizovaných pacientů bylo 303 (68,71 %), ambulantních 136 (30-84 %). U dvou pacientů byl původ neznámý. Pacientů mužského pohlaví byla většina, až 64,40 % (284). Izoláty byly nejčastěji z infekcí kůže, měkkých tkání, od asymptomatických nosičů, sepse, z infekcí dýchacích cest, močových cest, kostí a kloubů. HA-MRSA tvořila 70,52 % a vyskytovala se u starších pacientů ve srovnání s CA-MRSA, která tvořila 16,78 %, u jiných byl původ neznámý. Bylo zjištěno, že izoláty jsou s výjimkou oxacilinu a cefoxitinu často rezistentní na erytromycin (87,98 %), klindamicin (84,81 %) a ofloxacin (82,77 %). Rezistence ke klindamycinu byla indukována u 51 izolátů. Rezistence vůči



ostatním antimikrobiálním látkám nedosáhla 10 % s výjimkou gentamicinu (14,51 %) a tetracyklinu (10,43 %). V průměru byly izoláty rezistentní na tři ze všech testovaných antibiotik. [11]

### 5.6.2 Ochrana personálu v nemocnici

Při léčení a prevenci chorob má velký význam střední zdravotnický personál kvůli svému bezprostřednímu kontaktu s nemocným pacientem. Personál neplní jenom úlohu mechanického ošetřovatele, důležitý je také jeho taktní a ohleduplný přístup a příznivý vliv na duševní stav pacienta. Měl by respektovat pacientovy projevy nervozity, které onemocnění často doprovází. [1,4]

Standardní preventivní opatření se týká používání osobních ochranných prostředků a dodržování zásad bezpečné manipulace s potencionálně kontaminovanými vzorky před, během, i po analýze vzorku. Vhodná hygiena rukou pomocí mýdla, vody a dezinfekce na bázi alkoholu prokazatelně pomáhá ke snížení přenosu všech infekcí. V případě infekce MRSA je pro nemocniční personál klíčová bariérová ochrana. Použitím roušky nebo respirátoru a případně brýlí dochází ke snížení expozice pracovníků a snižuje se tak riziko přenosu infekce kapénkami či vzduchem. Vhodné je používání rukavic, aby se zabránilo přenosu z pacienta na pacienta. Infekční agens se může šířit i přes kontaminované uniformy zdravotnických pracovníků, používáním pláštů se naruší přenos mikroorganismů. Kontaminované jehly a ostré předměty se musí řádně likvidovat pro prevenci percutánního poranění. Kontaminovaný odpad a použité jednorázové předměty je nutno skladovat v označených červených nádobách určených pro infekční materiál. [1,4,5]

Pokud je o pacientovi známo, nebo pokud existuje podezření na onemocnění infekcí, musí být izolován v samostatném pokoji. Při dveřích pozitivního pacienta by měl být dezinfekční roztok nebo hadr ním napuštěn, aby se zamezilo výnosu nákazy ven z pokoje obuví. Veškerá použitá bariérová ochrana musí být vyhozena do výše zmiňovaných červených nádob. Pobyt s infikovaným pacientem se musí omezovat na nevyhnutné minimum. Veškerý materiál potencionálně infikovaný touto nemocí musí být označen nápisem MRSA. [1,26]

## 6. PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část hodnotí screeningové odběry vzorků z vyšetření provedených na ÚKM v průběhu čtyř let (2019-2022). Hodnotí se poměr pozitivních a negativních pacientů a testů v celkovém období, i po jednotlivých letech, místa odběru vzorků, věk, pohlaví pacientů a jejich souvis na onemocnění nákazou, a prevalenci choroby na odděleních po jednotlivých letech a v celku.

Vzorky na vyšetření byly odebírány nejčastěji z výtěrů krku, nosu, perinea a axily. Je nutné dodržet podmínky správného odběru s dostatečným množstvím materiálu, proto musely být popsány postupy odběru vzorků s podrobnými pokyny k odběru vzorků. Zdravotnický personál, který vzorky odebírá, by měl být řádně proškolen. Pro správný odběr materiálu z výtěru krku by pacient neměl hodinu před odběrem jíst, ideálně by měl být na lačno, doporučuje se neprovádět ústní hygienu před vyšetřením. Výtěr se provádí ze zadní stěny hrdla, ne z úst. Pro každý výtěr z nosu by mělo být použito jiné výtěrové místo. Výtěr se provádí sterilním tamponem na špejli, krouživým pohybem, potočí se tři krát kolem vnější části každé nosní dírky, další kožní výtěry se provádějí velice podobně. Odběry na špejličce se posílají do laboratoře zalomené a uzavřené ve sterilním obalu. Při odběru moči na kultivační vyšetření se odebírá střední část z prvního proudu, aby se zamezilo kultivaci bakterií usazených v močovém měchýři bez přítomnosti onemocnění. MRSA se vyšetřuje při podezření na sepsi krve z hemokultury při vzestupe teploty před zahájením antibiotické léčby pacienta. [6]

Vzorky se musí po příchodu do laboratoře řádně zpracovat. Každý typ vzorku se zpracovává trochu jinak. Pevné či polopevné nehomogenní vzorky se musí homogenizovat, jiné se musí centrifugovat. Pro bakteriologii se výtěry transportují v transportním médiu, které živí bakterie a zabraňuje tak úmrtí, materiál pro PCR je odebírán metodou suchého výtěru. Vzorky pro vyšetření z rány se očkují na tekuté i tuhé půdy, výtěry z krku se nepomnožují, rovnou se očkují na pevné půdy. Močový sediment se po centrifugaci očkuje na příslušné kultivační plotny (krevní agar s přídavkem NaCl, chromový agar), následuje odečet, kultivace při 37 °C / 24 hodin případně další izolace materiálu. [6]

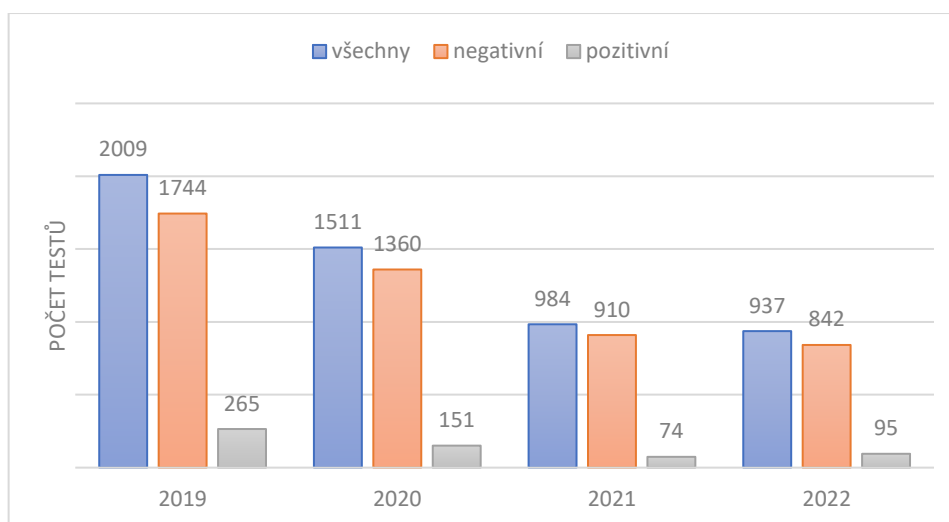
Pro detekci onemocnění, nosičství či pro včasné zachycení onemocnění a prevenci je důležité provádět screening, který odehrává velikou roli v preventivní medicíně. Screening na přítomnost MRSA se provádí u hospitalizovaných pacientů. V některých zemích je dobrovolný, jinde zase povinný. Screening se může provádět i před hospitalizací na jednotku intenzivní péče, což výrazně snižuje zanesení kmenů CA-MRSA do nemocničního prostředí. [5]

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 Provedené testy

Počty vyšetření se na onemocněním MRSA v průběhu let prokazatelně snižovaly. Průměrná pozitivita testů byla 10,22 % z celkového počtu 5441 všech vyšetřených vzorků za časové období 2019-2022.

**Graf 1 - Počet provedených testů pro screening MRSA**



*Zdroj: autorka bakalářské práce*

V roce 2019, před vypuknutím pandemie COVID-19, bylo z celkem 2009 provedených testů 86,8 % negativních, pozitivní testy tvořili necelou čtvrtinu provedených testů (13,2 %). V roce 2020 bylo vykonáno o 25 % testů méně, z 1511 provedených testů bylo 10,0 % pozitivních. V roce 2022 byla v porovnání s rokem 2019 vyšetřena jenom necelá polovina vzorků. Pozitivních bylo 7,52 %. Rok 2022 byl statisticky podobný roku 2021, pozitivita se ale zvýšila na 10,15 %.

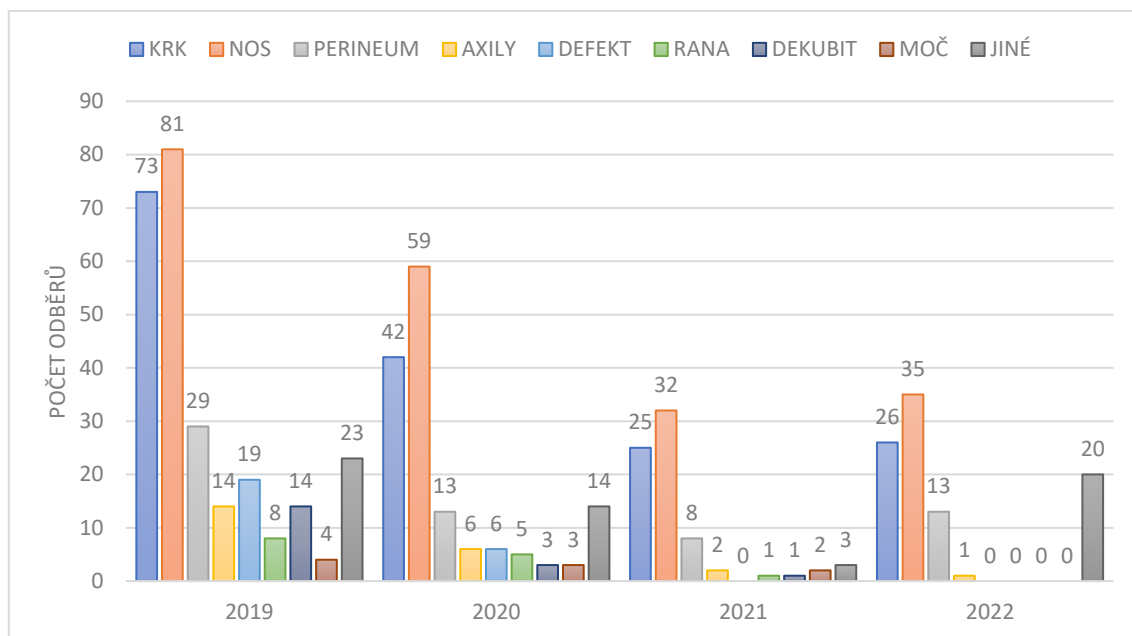
Celkově bylo vyšetřeno 1578 lidí. Negativita byla v průměru 79,28 %. Větší část pozitivně vyšetřených pacientů tvořili muži, s výjimkou v roce 2021, kdy bylo více pozitivních žen.

### 7.2 Místa odběru

Materiál byl nejčastěji odebírán z výtěrů z krku a nosu. V roce 2019 představoval výtěr z nosu 30,56 % všech odběrů, výtěr z krku 27,55 %. Další místa odběru jsou znázorněna v grafu. K jiným místům výtěrů patřil například kotník, koleno, třísla, hýždě a dolní končetina. V roce 2020 byly místa odběru velmi podobné předešlému roku. V roce 2022 se odběr materiálu omezil na ověřené

místa odběru jako je krk, nos, perineum. V roce 2023 byly vykonávané odběry jenom z těchto materiálů. Z roku 2023 bylo 20 vzorků neurčeného původu.

**Graf 2 - Místa odběru materiálu u pozitivních pacientů**

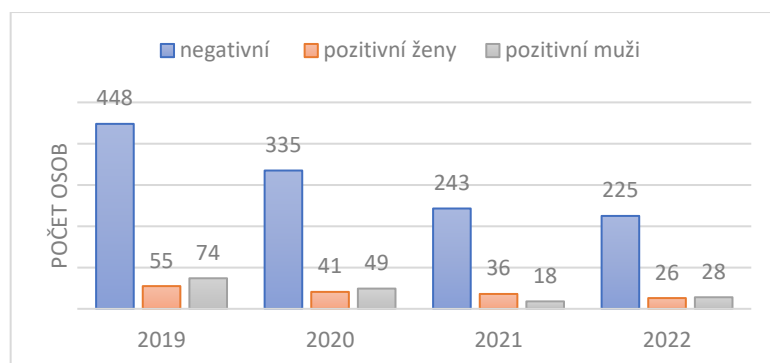


Zdroj: autorka bakalářské práce

### 7.3 Počet a pohlaví pacientů

Některé osoby byly za toto období testované více krát. V roce 2019 bylo testováno 577 osob ze kterých bylo 77,64 % negativních. Více bylo pozitivních mužů (12,8 %). Rok 2020 přinesl menší množství vyšetřených vzorků a s tím i menší množství pozitivních pacientů. Ze 425 všech testovaných osob bylo negativních 78,83 %, pozitivní byli více muži (11,53 %). V roce 2021 z celkového počtu 297 vyšetřovaných osob bylo negativních 81,81 %, větší počet pozitivních pacientů tvořily ženy (12,12 %). Negativita pacientů z celkového počtu 279 provedených screeningových testů v roce 2022 dosáhla 80,65 %, pozitivních zde bylo o něco více mužů než žen (10,03 %).

**Graf 3 – Počet a pohlaví testovaných osob**

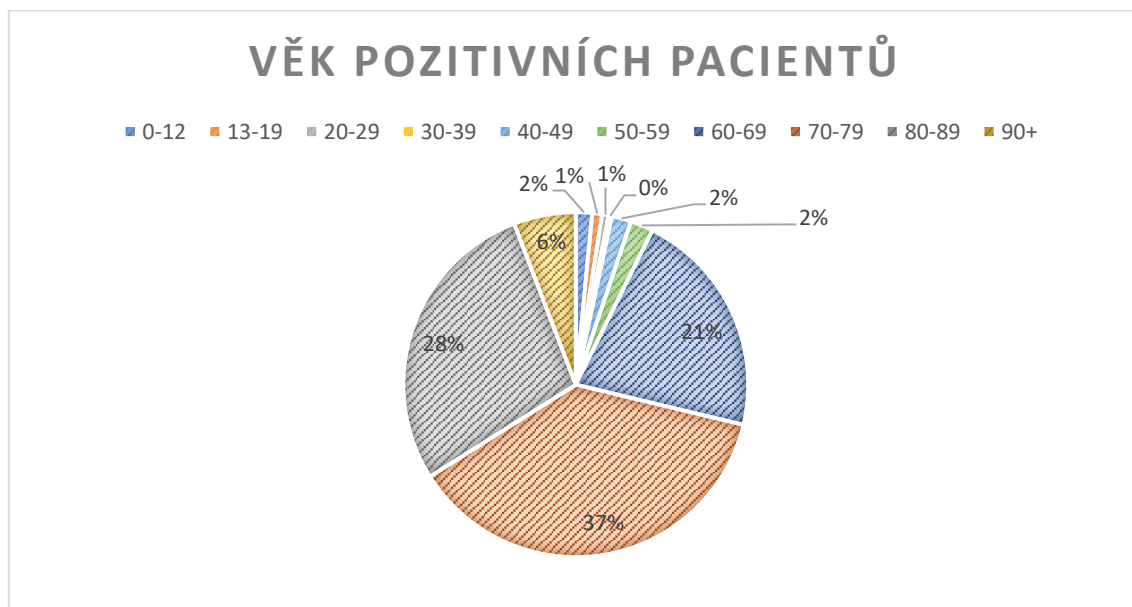


Zdroj: autorka bakalářské práce

## 7.4 Věk pacientů

Rizikovým faktorem pro onemocnění rezistentní bakterií MRSA je věk nad 50 let. Fakt byl potvrzen i zpracováním výsledků kdy celkový počet lidí nad 50 let určen na 94,80 %. Nejlépe obstála skupina od 30 do 39 let s pozitivitou 0,3 %.

**Graf 4 – Věk pozitivních pacientů**



Zdroj: autorka bakalářské práce

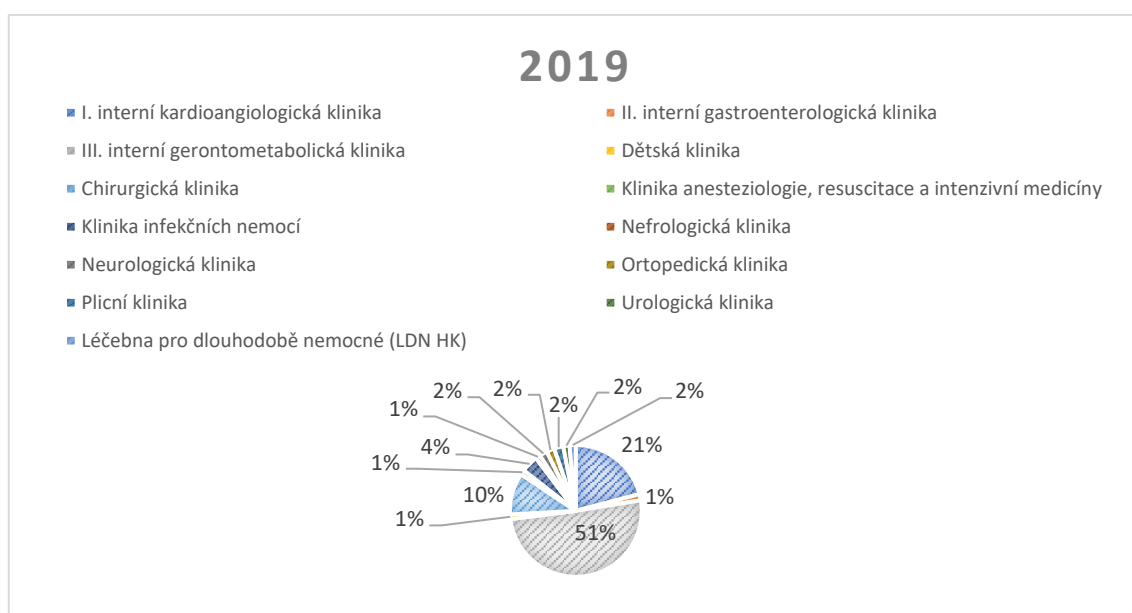
Za celé časové období bylo pozitivních 327 lidí. Až 122 pozitivních lidí patřilo do věkové skupiny od 70 do 79 let. Druhá nejpočetnější skupina s počtem 92 byli pacienti od 80 do 89 let. Třetí nejpočetnější skupina s počtem 70 pozitivních byli lidé ve věku 60 až 69 let. Více bylo i lidí s věkem nad 90 let s počtem 19 pozitivních. Ostatní věkové skupiny měly podobné hodnoty.

Pozitivita u lidí ve věkové skupině od 50 do 59 let byla zachycena sedmkrát, u lidí s věkem 40 až 49 let šestkrát. Děti do 12 let bylo pozitivních pět, teenagerů od 13 do 19 let tři. Nejlépe na tom byla skupina mladých dospělých od 20 do 29 let kdy byly pozitivní dva lidé a skupina od 30 do 39 let s jenom jedním pozitivním pacientem.

## 7.5 Pozitivita na odděleních

Za roky 2019 až 2022 bylo společně zaznamenáno celkem 586 pozitivních případů MRSA. Nejvíce z nich bylo zasláno do laboratoře z oddělení III. interní gerontometabolické kliniky s celkovým počtem 273 vzorků (46,66 %). Druhým oddělením s největším výskytem MRSA je I. interní kardiologická klinika s počtem 92 pozitivních případů (15,73 %). Na třetím místě se umístila chirurgická klinika s 53 pozitivními případy (9,06 %). Mezi další oddělení se zvýšeným výskytem nad 2 % všech případů patří I. interní kardiologická klinika, II. interní gastroenterologická klinika, klinika infekčních nemocí, nefrologická klinika, ortopedická klinika, plicní klinika a urologická klinika. Za toto časové období nebyly zaznamenány žádné případy onemocnění na infekci MRSA v následujících odděleních: klinika dětské chirurgie a traumatologie, klinika urgentní medicíny, oční klinika, porodnická a gynekologická klinika, tkáňová ústředna, dialyzační středisko INMED, hradecké oční sanatorium a plastická a estetická chirurgie. Následující grafy vyjadřují počty pozitivně testovaných vzorků přijatých z jednotlivých oddělení nemocnic za roky 2019-2022.

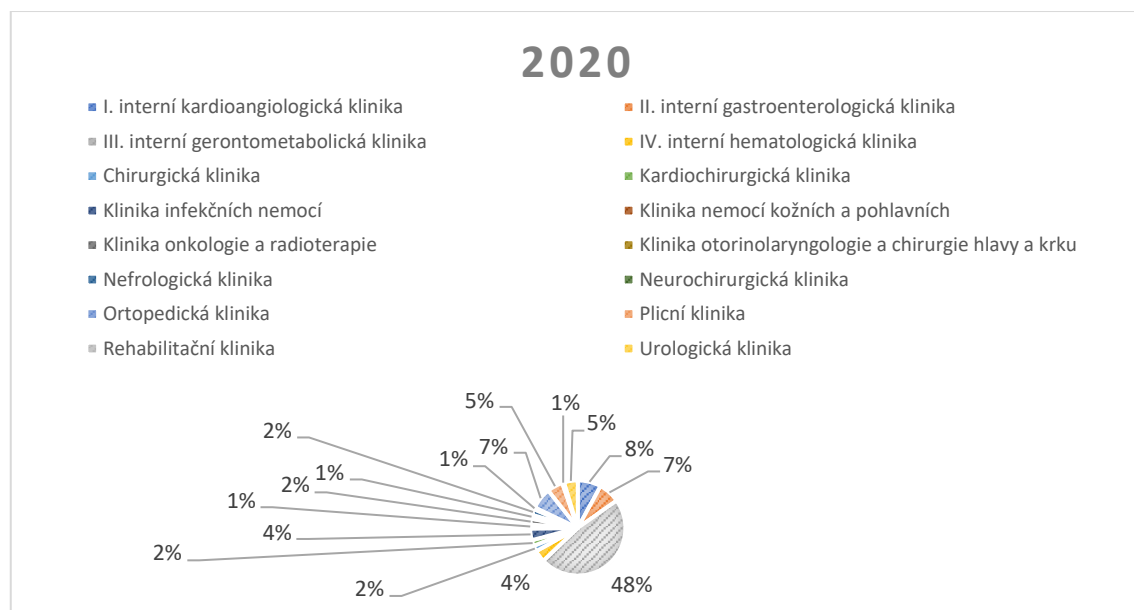
**Graf 5 – Prevalence pozitivivity na odděleních v roce 2019**



Zdroj: autorka bakalářské práce

Ze 265 pozitivně testovaných vzorků pocházelo až 133 z oddělení III. Interní gerontometabolické kliniky. Z oddělení I. Interní kardioangiologické kliniky bylo pozitivních 55 vzorků, chirurgické oddělení mělo 27 pozitivních a klinika infekčních onemocnění 11 pozitivních vzorků. MRSA byla dále přítomná i na plicním oddělení (6), neurologické klinice (5), ortopedické klinice (5), II. Interní gastroenterologické klinice (4), urologické klinice (4), dětské klinice (3), klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (3), nefrologické klinice (3). Lépe na tom byla klinika onkologie a radioterapie a psychiatrická klinika, ty měly obě po jednom pozitivním pacientovi. V roce 2019 nebyl zaznamenán ani jeden případ ze IV. Interní hematologické kliniky, kardiochirurgické kliniky, kliniky nemocí kožních a pohlavních, kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, neurochirurgické kliniky ani z rehabilitační kliniky. Čtyři pozitivní případy byly potvrzeny i ze vzorků pocházejících z léčebny pro dlouhodobě nemocné (LDN HK), která však nepatří pod nemocnici.

**Graf 6 – Prevalence positivity na odděleních v roce 2020**

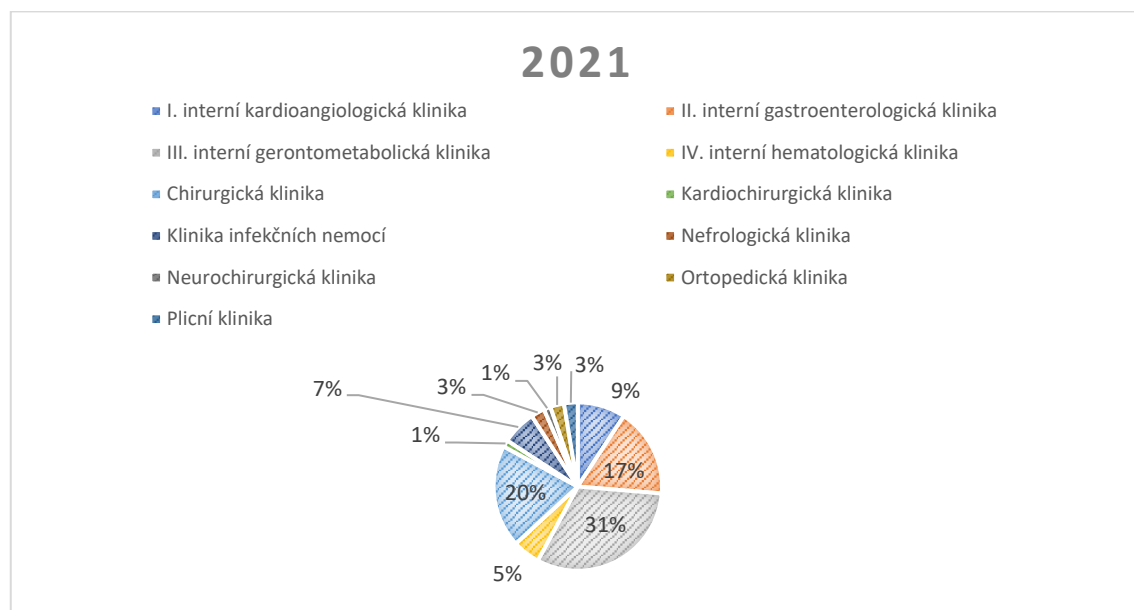


*Zdroj: autorka bakalářské práce*

V roce 2020 byl počet pozitivně diagnostikovaných vzorků 151. Z nich pocházelo 72 z oddělení III. Interní gerontometabolická kliniky, dvanáct z I. interní kardioangiologické kliniky, II. interní gastroenterologická klinika a ortopedická klinika měly stejný počet jedenácti pozitivních pacientů. MRSA byla dále pozitivní na odděleních plicní kliniky (8), urologické kliniky (7), IV. interní hematologické kliniky (6), kliniky infekčních onemocnění (6), chirurgické, kardiochirurgické. Nefrologická klinika a klinika onkologie a radioterapie měly stejný počet

pozitivních pacientů, kde se jednalo o tři nálezy. Klinika kožních a pohlavních onemocnění a klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku měly po dvou pozitivních pacientech. Jeden pozitivní pacient byl z neurochirurgické kliniky a jeden z rehabilitační kliniky. V roce 2020 nebyly žádné případy zaznamenány na odděleních dětské kliniky, kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, neurologické kliniky, psychiatrické kliniky ani v léčebně pro dlouhodobě nemocné.

**Graf 7 – Prevalence pozitivity na odděleních v roce 2021**

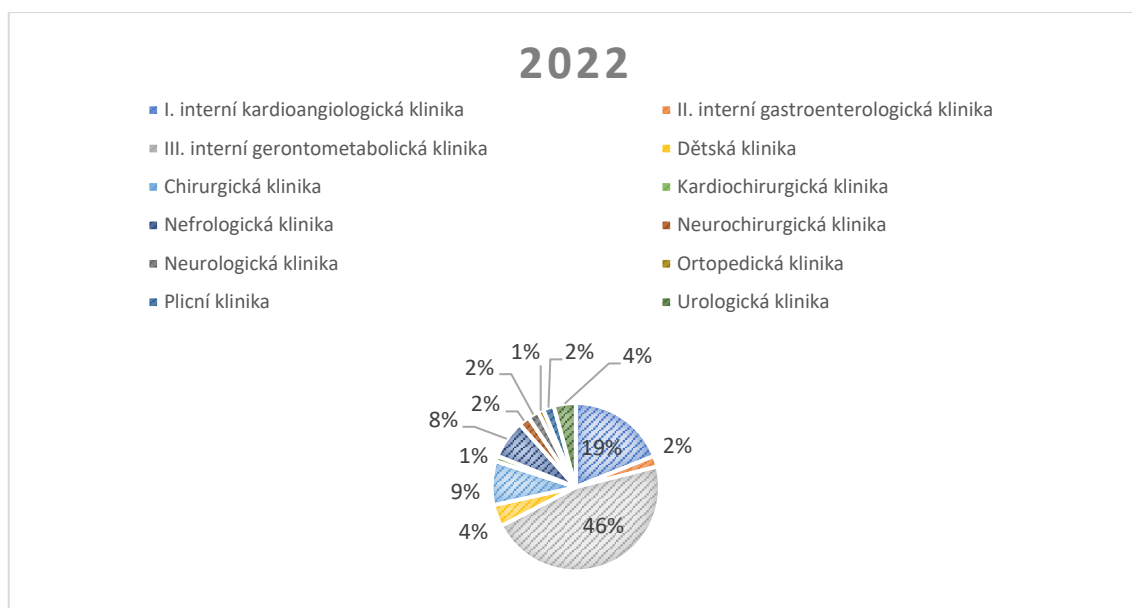


*Zdroj: autorka bakalářské práce*

V roce 2021 bylo pozitivních 74 pacientů. MRSA se nejvíc vyskytovala v III. interní gerontometabolické klinice s počtem 24 případů, na chirurgické klinice (15), II. interní gastroenterologické klinice (13), dále na odděleních I. interní kardiologické klinice (7), klinice infekčních nemocí (5) a IV. interní hematologické klinice (4). Stejný počet dvou pozitivních pacientů měly kliniky nefrologické, ortopedické a plicní. Kardiologická a neurochirurgická klinika měly každá jednoho pozitivního pacienta. Ani jeden případ MRSA nebyl zaznamenán na oddělení dětské kliniky, klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, klinice nemocí kožních a pohlavních, onkologie a radioterapie, klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, neurologické, psychiatrické, rehabilitační ani urologické. Rovněž nebyl zaznamenán případ v léčebně pro dlouhodobě nemocné.



**Graf 8 – Prevalence pozitivita na odděleních v roce 2022**



*Zdroj: autorka bakalářské práce*

Celkový počet pozitivních případů v roce 2022 byl 95. Největší počet pozitivních případů pocházel z oddělení III. interní gerontometabolické kliniky s celkovým počtem 44 případů a z oddělení I. interní kardiologické kliniky v počtu 18 případů. Dále byla MRSA pozitivní na chirurgické klinice (8), nefrologické klinice (7), dětské klinice (4) a urologické klinice (4). Dva případy byly zaznamenány na neurochirurgické klinice, II. interní gastroenterologické, neurologické a plicní klinice. Jeden pozitivní případ byl zaznamenán na kardiologické a ortopedické klinice. V tomto roce nebyl zaznamenán případ infekce na oddělení IV. interní hematologické kliniky, kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, kliniky infekčních nemocí, kožních a pohlavních nemocí, otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, onkologie a radioterapie, psychiatrické ani rehabilitační klinice. Léčebna pro dlouhodobě nemocné byla rovněž bez případu MRSA.

## 8. DISKUSE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou rezistence meticilin rezistentního stafylokoka aurea. V posledních 10 letech byl prokázán na území Evropy významný nárůst MRSA. Jedná se o jednu z nejčastějších příčin infekcí v Evropě. Většina kmenů přítomná na území ČR je multirezistentní. V České republice převládají kmeny rezistentní na erytromycin, klindamycin a ciprofloxacín. Dominantní typy stafylokoků jsou t003 a t014. Studie z roku 2017-2018 poukazuje na fakt, že typ t003 tvoří 90 % všech infekcí v ČR, zároveň je druhým nejčastějším typem vyskytujícím se v Evropě. Převládá více na východu a severovýchodu ČR, kvůli výskytu v jižním Polsku se uvažuje o možnosti přeshraničního přenosu tohoto typu. Na severu převládá typ t586, typ t014 spojený s původem HA-MRSA zase převládá ve středu a na západě krajiny. Na území ČR provádí od roku 2017 screening MRSA Národní referenční laboratoř. [11,27]

Cílem praktické části bylo získat data o provedeném screeningu MRSA u pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové v období čtyř let (2019-2022), z Ústavu Klinické Mikrobiologie. Z ÚKM mi byl poskytnut za toto časové období soubor prováděných testů v celkovém počtu 5441 výsledků. Vyšetřovaní pacienti pocházeli z téměř všech oddělení nemocnice, lišili se jak věkem, tak pohlavím.

Podle studie, která probíhala mezi zářím 2017 a lednem 2018 v jedenácti mikrobiologických odděleních po celé ČR, bylo získáno 441 izolátů MRSA, většina byla od hospitalizovaných pacientů (303) a ambulantních pacientů (136). Původ dvou izolátů nebyl známý. HA-MRSA tvořila 70,52 % všech pozitivních vzorků, vyskytovala se u pacientů s vyšším věkem, CA-MRSA tvořila z celkového počtu 16,78 %. Podle údajů EARS-Net prevalence izolátů MRSA z krve je od roku 2005 kolem 14 %, v předchozích letech byl nižší, od 4,3 % do 8,5 %. Ve FNHK bylo v období od ledna 2019 do prosince 2022 zaznamenáno celkem 585 (10,75 %) MRSA pozitivních vzorků od hospitalizovaných pacientů. Největší počet vzorků byl vyšetřen v roce 2019 s pozitivitou 13,2 %, od tohoto roku se počet vyšetření na onemocnění MRSA snižoval, což mohlo být způsobeno i pandemickým onemocněním Covid-19, na který se začal klást větší důraz. V roce 2020 klesl počet vyšetřovaných vzorků o 25 %, prevalence onemocnění se snížila na 10,0 %. V roce 2022 se vyšetřila v porovnání s rokem 2019 jenom necelá polovina vzorků, prevalence tak činila 7,52 %. V roce 2022 se s částečným odchodem onemocnění Covid-19 prevalence zvýšila na 10,15 %. [11,27]

Za období čtyř let bylo vyšetřeno celkem 1578 osob z kterých bylo 77,64 % negativních. Za celé období bylo pozitivních 327 lidí. Větší počet pozitivních vzorků byl kromě roku 2021 zjištěn u pacientů mužského pohlaví (10,71 %), žen bylo o něco méně (10,01 %). Odchytky mezi pohlavími nejsou statisticky významné, onemocnění se podle screeningových výsledků primárně

neváže více na jedno pohlaví, i když některé zdroje tvrdí opak. Studie z let 2016 až 2018 udává procento nakažených mužů až 64,40 % (284), co potvrzuje informaci z některých zdrojů o vyšší prevalenci onemocnění u mužů. V Evropských zemích záleží míra prevalence na geografické poloze, pohybuje se od 1 % do 24 %. Míra prevalence v České republice byla 22,36 %. [11]

Velkým rizikovým faktorem je věk pacienta. Střední věk pacientů ze studie z let 2017-2018 byl 67,06 let (stáří pacientů bylo 1 den až 107 let). Hospitalizovaní pacienti byly průměrově starší než ambulantní. Fakt byl potvrzen i ve výsledcích z ÚKM FNHK, kdy 94,80 % všech pacientů, u kterých byla prokázána MRSA, byli starší 50 let. Skupinou s nejčastějším výskytem MRSA byly lidé od 70 do 79 let (37,31 %), následovali lidé ve věku 80 až 89 let (28,13 %) a lidé se stáří 60 až 69 let (21,41 %). Lidé nad 90 let tvořili 5,81 % z celkového počtu nemocných za 4 roky. Nejmenší výskyt měla MRSA u pacientů ve věku 30-39 let s výskytem jenom 0,3 %. Věk pacientů se s lety významně nelišil. [11]

Největší výskyt patogenu za celé časové období, byl ve výtěrech z nosu kde se rovnal 35,21 %, následoval výtěr z krku s počtem 28,38 %. Tyto místa odběrů patří k nejčastějším i u prováděných průzkumů a studií pro vyšší pravděpodobnost záchytu asymptomatických nosičů. Další vzorky pocházely z výtěrů perinea, axil, defektů, ran, moči ale i jiných míst. V roce 2019 se prováděly odběry z různých částí těla, na konci období v roce 2022 byl nejčastější odběr z krku a nosu. V studiích byly patogeny nejčastěji zachyceny z měkkých tkáňových infekcí, infekcí dýchacích cest, močových cest, kůže a u asymptomatické kolonizace. Asymptomatictí nosiči byly výrazně mladší. [11]

S narůstajícím věkem klesá metabolická schopnost těla. Každý rok nejvíce pozitivních pacientů – až 46,84 %, pocházelo z oddělení III. Interní gerontometabolické kliniky. Počet pacientů z tohoto oddělení klesal s poklesem provedených testů. Druhým oddělením s nejčastějším výskytem bylo oddělení I. Interní kardioangiolytické kliniky, z kterého pocházelo každý rok až 15,90 % pacientů. Další oddělení s přítomnou infekcí byly chirurgické (9,06 %) a klinika infekčních nemocí která z pozitivity 4,15 % z roku 2019 klesla na 0 % v roce 2022. Stejně jak prokázali studie prováděné v Evropě i jiné studie z České republiky, i ve FNHK má výskyt MRSA na jednotlivých odděleních klesající trend.

## 9. ZÁVĚR

Rezistence bakterií nabývá na stále větším významu. Rezistentní bakterie se přizpůsobují selekčnímu tlaku antibiotika, které je letální pro citlivé bakterie, čímž umožňuje růst novým rezistentnějším kmenům. Omezená možnost terapie a pomalý vývoj dalších antibiotik jen přidává na závažnosti celé situace. Citlivé i rezistentní druhy rodu *Staphylococcus aureus* budou i nadále v budoucnosti hrát jednu z hlavních rolí původců lidských onemocnění jak v nemocnicích, tak i v prostředí každodenního života.

Tato práce měla stanoveny hned několik cílů, které se podařilo naplnit, a to: poskytnutí a ze sumarizování dostatečného množství různých informací z odborných publikací o citlivém i rezistentním zlatém stafylokokovi, popsat aspekty a mechanismy antibiotické rezistence bakterie, původ v ČR i ve světě, představit možnosti diagnostiky i kontrolních opatření a screeningu pro prevenci a monitoring dalšího šíření.

V praktické části bylo spolu zhodnoceno 5441 screeningových výsledků screeningu MRSA v období 2019 až 2022 poskytnuté z ÚKM FNHK. Hodnotila se místa odběru, podíl pozitivních pacientů a vzorků, věk, počet a pohlaví pacientů i výskyt na jednotlivých odděleních. Výsledky screeningu byly porovnány s další odbornou literaturou.

MRSA má ve Fakultní nemocnici statisticky nevýznamný klesající trend. Významně k tomu přispělo zavedení a dodržování preventivních hygienických opatření, kontrolované antibiotické restriktce a provádění mikrobiologické surveillace. Prevalence mezi odděleními se liší, nejvyšší je výskyt na oddělení III. Interní gerontometabolické kliniky. V letech 2019 až 2022 se významně snížil počet prováděných testů, což vedlo i k významnému poklesu pozitivních případů MRSA.

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
ATB	<i>Antibiotics</i>	antibiotikum
CA-MRSA	<i>Community associated MRSA</i>	MRSA získána z komunity
COVID-19	<i>Coronavirus disease</i>	Kovid
CRP	<i>C-reactive protein</i>	C-reaktivní protein
ČR	<i>Czech republic</i>	Česká republika
DNA	<i>Deoxyribonucleotid acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
EARS	<i>European antimicrobial resistance surveillance</i>	Evropská síť antibiotické rezistence
ESCMID	<i>European society of clinical microbiology</i>	Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii
FNHK	<i>Faculty hospital of Hradec Kralove</i>	Fakultní nemocnice v Hradci Králové
HA-MRSA	<i>Healthcare acquired MRSA</i>	MRSA získána z nemocničního prostředí
HIV	<i>Human papilloma virus</i>	Lidský papilomavirus
ICC	<i>International society of antimicrobial chemotherapy</i>	Mezinárodní společnost pro antimikrobiální chemoterapii
KNS	<i>Koagulase negative staphylococcus</i>	Koaguláza negativní stafylokok
KPS	<i>Koagulase positive staphylococcus</i>	Koaguláza negativní stafylokoky
LA-MRSA	<i>Livestock associated MRSA</i>	MRSA od hospodářských zvířat
LDN HK	<i>Sanatorium</i>	Léčebna pro dlouhodobě nemocné HK
m-RNA	<i>Messenger RNA</i>	Mediátorová RNA
MRSA	<i>Meticillin resistant Staphylococcus aureus</i>	Meticilin rezistentní Stafylokok aureus
NaCl	<i>Sodium chloride</i>	Chlorid sodný, sůl
PBP 2a	<i>Penicillin binding protein 2 alternative</i>	Alternativní penicilin vázoucí protein 2
PCR	<i>Polymerase continuous reaction</i>	Polymerázová řetězová reakce
PVL	<i>Panton-Valentin leukocidin</i>	Panton-Valentinův leukocidin
PYRA test	<i>Pyrrolidonyl aminopeptidase test</i>	Pyrrolidonyl arylamidázový test
RNA	<i>Ribonucleotid acid</i>	Ribonukleová kyselina
rt-PCR	<i>Real-time PCR</i>	PCR v reálném čase
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>	Stafylokokový kazetový chromozom mec
SPA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Zlatý stafylokok
<i>TNF α</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	Tumor nekrotizující faktor
t-RNA	<i>Transfer RNA</i>	Transferová RNA
TSS	<i>Toxic shock syndrome</i>	Syndrom toxického šoku
TSST 1	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>	Toxin syndromu toxického šoku
ÚKM	<i>Institute of clinical mikrobiology</i>	Ústav klinické mikrobiologie
UV	<i>Ultra violet</i>	Ultra fialové
VISA	<i>Vankomycin intermediate Staphylococcus aureus</i>	Částečně vankomycin rezistentní SPA
VP test	<i>Voges-Proskauer test</i>	Vogesův Proskauerův test
VRSA	<i>Vancomycin resistant Staphylococcus aureus</i>	Vankomycin rezistentní SPA

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Multiplexní PCR pro typizaci SCCmec.....	19
Obrázek 2 – Multiplexní PCR pro detekci genů nuc, mecA a PVL.....	37
Obrázek 3 – Rozdělení nemocnic účastnících se studie.....	40

## 12. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Počet provedených testů pro screening MRSA .....	43
Graf 2 - Místa odběru materiálu u pozitivních pacientů .....	44
Graf 3 – Počet a pohlaví testovaných osob .....	45
Graf 4 – Věk pozitivních pacientů .....	45
Graf 5 – Prevalence positivity na odděleních v roce 2019 .....	46
Graf 6 – Prevalence positivity na odděleních v roce 2020 .....	47
Graf 7 – Prevalence positivity na odděleních v roce 2021 .....	48
Graf 8 – Prevalence positivity na odděleních v roce 2022 .....	49

## 13. POUŽITÁ LEITERATURA

- 1) *Remedia - Klinická mikrobiologie: interdisciplinární časopis pro diagnostiku, kliniku a terapii mikrobiálních infekcí Společnosti pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti J. Ev.Purkyně.* Praha: PANAX, 2000. ISSN 1211-7684.
- 2) KARMAKAR, Amit, Parimal DUA a Chandradipa GHOSH. Biochemical and Molecular Analysis of Staphylococcus aureus Clinical Isolates from Hospitalized Patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2016, **2016**, 1-7. ISSN 1712-9532. Dostupné z: doi:10.1155/2016/9041636
- 3) *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství: interdisciplinární časopis Společnosti pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně ve spolupráci se Společností infekčního lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.* Praha: Svoboda, 1995-. ISSN 1211-264X.
- 4) CHMEL, Ladislav. *KOŽNÉ A POHLAVNÉ CHOROBY: Učebný text pre zdravotnicke školy.* Třetí. Vydavatel'stvo Osveta, 1961. 2511/1960 - VI/4 , 301 08.
- 5) SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- 6) *Mikrobiológia a epidemiológia: učeb. text pre stredné zdravotnicke školy, odbor zdrav. laborant.* Martin: Osveta, 1991. Učebnice pre stredné zdravotnicke školy. ISBN 80-217-0326-1.
- 7) GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN, Ivan M. ROITT a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie. 5. vydání.* Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- 8) LOWY, Franklin D. Staphylococcus aureus Infections. *New England Journal of Medicine*. 1998, 339(8), 520-532. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- 9) *Cellular Microbiology*. 14. 2012. ISSN 14625814. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2012.01832.x>

- 10) Lee, A., de Lencastre, H., Garau, J. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- 11) TKADLEC, Jan, Vaclav CAPEK, Marie BRAJEROVA, et al. The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Czech Republic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021, 76(1), 55-64. ISSN 0305-7453. Dostupné z: [doi:10.1093/jac/dkaa404](https://doi.org/10.1093/jac/dkaa404)
- 12) RODVOLD, K. A., K. W. MCCONEGHY, Marie BRAJEROVA, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 58(suppl 1), S20-S27. ISSN 1058-4838. Dostupné z: [doi:10.1093/cid/cit614](https://doi.org/10.1093/cid/cit614)
- 13) KISTLER, Justin M., Colin M. VROOME, Frederick V. RAMSEY, et al. Increasing Multidrug Antibiotic Resistance in MRSA Infections of the Hand: A 10-Year Analysis of Risk Factors. *HAND*. 2020, 15(6), 877-881. ISSN 1558-9447. Dostupné z: [doi:10.1177/1558944719837693](https://doi.org/10.1177/1558944719837693)
- 14) PETERS, Claudia, Madeleine DULON, Olaf KLEINMÜLLER, et al. MRSA Prevalence and Risk Factors among Health Personnel and Residents in Nursing Homes in Hamburg, Germany – A Cross-Sectional Study: A 10-Year Analysis of Risk Factors. *PLOS ONE*. 2017, 12(1), 877-881. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0169425](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169425)
- 15) SENTHILKUMAR, Kandasamy, Niranjan BISWAL, Sujatha SISTLA, et al. Risk factors associated with Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children: A 10-Year Analysis of Risk Factors. *Indian Pediatrics*. 2015, 52(1), 31-33. ISSN 0019-6061. Dostupné z: [doi:10.1007/s13312-015-0562-9](https://doi.org/10.1007/s13312-015-0562-9)
- 16) KOBUSCH, Iris, Iris SCHRÖTER, Sabrina LINNEMANN, et al. Prevalence of LA-MRSA in pigsties: analysis of factors influencing the (De)colonization process. *Scientific Reports*. 2022, 12(1), 31-33. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-022-21903-z](https://doi.org/10.1038/s41598-022-21903-z)
- 17) *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30. 2007. ISSN 09248579. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857907002579>
- 18) PALAVECINO, Elizabeth L., Iris SCHRÖTER, Sabrina LINNEMANN, et al. Rapid Methods for Detection of MRSA in Clinical Specimens: analysis of factors influencing the (De)colonization process. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols*. New York, NY: Springer US, 2020, 2020-09-16, 30(4), 29-45. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 09248579. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-9849-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_2)



- 19) Mitao M, Hamada T, Hirai G. [Infection route of MRSA to pregnant women and to newborns]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1995 Mar;47(3):231-6. Japanese. PMID: 7699283.
- 20) PALAVECINO, Elizabeth L., Iris SCHRÖTER, Sabrina LINNEMANN, et al. Rapid Methods for Detection of MRSA in Clinical Specimens: analysis of factors influencing the (De)colonization process. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols*. New York, NY: Springer US, 2020, 2020-09-16, 30(4), 29-45. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0246343
- 21) NOUROLLAHOPOUR SHIADEH, Malihe, Mahdi SEPIDARKISH, Abolfazl MOLLALO, et al. Worldwide prevalence of maternal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*. New York, NY: Springer US, 2022, 2020-09-16, 171(4), 29-45. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2022.105743
- 22) FERNANDO, Shelanah A., Timothy J. GRAY, Thomas GOTTLIEB, et al. Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Internal Medicine Journal*. New York, NY: Springer US, 2017, 2020-09-16, 47(12), 1341-1351. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 14440903. Dostupné z: doi:10.1111/imj.13642
- 23) COOKSON, Barry, Marc J.M. BONTEN, Fiona M. MACKENZIE, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): screening and decolonisation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. New York, NY: Springer US, 2011, 2020-09-16, 37(3), 195-201. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.023
- 24) MALIŠOVÁ, Lucia, Vladislav JAKUBŮ, Martin MUSÍLEK, et al. Phenotype and Genotype Characteristics of *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin/Oxacillin Carrying Gene *mecC* in the Czech Republic from 2002 to 2017: screening and decolonisation. *Microbial Drug Resistance*. New York, NY: Springer US, 2020, 2020-09-16, 26(8), 918-923. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 1076-6294. Dostupné z: doi:10.1089/mdr.2019.0319
- 25) POMORSKA, Katarina, Vladislav JAKUBU, Lucia MALISOVA, et al. Antibiotic Resistance, spa Typing and Clonal Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Blood of Patients Hospitalized in the Czech Republic: screening and decolonisation. *Antibiotics*. New York, NY: Springer US, 2021, 2020-09-16, 10(4), 918-923.

Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10040395

- 26) MORALEJO, Donna, Regina EL DIB, Rafaela A PRATA, et al. Improving adherence to Standard Precautions for the control of health care-associated infections: screening and decolonisation. /*Cochrane Database of Systematic Reviews*. New York, NY: Springer US, 2018, 2020-09-16, 2018(2), 918-923. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD010768.pub2
- 27) DULON, Madeleine, Frank HAAMANN, Claudia PETERS, et al. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases*. New York, NY: Springer US, 2011, 2020-09-16, **11**(1), 918-923. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9848-7. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2334-11-138