

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Doktorský studijní program  
**Lékařská mikrobiologie**

Výskyt LA-MRSA a CA-MRSA v populaci s vyšším rizikem  
nosičství

Occurrence of LA-MRSA and CA-MRSA in a population at  
higher carriage risk

**MUDr. Kateřina Neradová**

Školitel: doc. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.

## 1. Obsah

1. Obsah.....	3
2. Seznam použitých zkratk.....	7
3. Souhrn .....	10
4. Úvod.....	12
5. Cíle disertační práce.....	13
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
6. Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
6.1. Genetický podklad oxacilinové rezistence .....	15
6.2. Mikrobiologická charakteristika.....	15
6.3. Nosičství a epidemiologie .....	18
7. Přehled terapie infekcí způsobených MRSA .....	30
8. Prevence výskytu MRSA v nemocničním prostředí.....	31
<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>33</b>
9. Materiál.....	33
9.1. Vyjádření etické komise.....	33
9.2. Studovaná populace.....	33
9.3. Sběr vzorků .....	33
9.4. Kultivační a transportní média .....	34
10. Metodika .....	35
10.1. Bakteriální kmeny .....	35
10.2. Testování citlivosti k antibiotikům.....	35
10.3. Počítačové programy.....	36
10.4. Přístroje .....	36
10.5. Pomůcky.....	36
10.6. Molekulárně-biologická analýza .....	38
10.6.1. Postup izolace bakteriální DNA .....	39

10.6.2.	<i>Spa</i> typizace a BURP analýza .....	40
10.6.3.	Multilokusová sekvenční typizace .....	42
10.6.4.	PCR detekce genu <i>mec</i> a <i>SCCmec</i> typizace.....	43
10.7.	Nomenklatura MRSA.....	44
10.8.	Statistická analýza .....	44
<b>11.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>45</b>
11.1.	Základní charakteristika souboru .....	45
11.2.	Výsledky kultivačního vyšetření .....	49
11.3.	Výsledky fenotypového vyšetření citlivosti k antibiotikům .....	50
11.4.	Molekulárně-biologická analýza .....	52
11.4.1.	Výsledek <i>spa</i> typizace a BURP analýzy .....	52
11.4.2.	Výsledek multilokusové sekvenční typizace.....	53
11.4.3.	Výsledky detekce genu <i>mec</i> a <i>SCCmec</i> typizace .....	53
<b>12.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>57</b>
<b>13.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>63</b>
<b>14.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>64</b>
<b>15.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>76</b>
15.1.	Příloha 1. Stanovisko Etické komise Fakultní nemocnice v Hradci Králové .....	76
15.2.	Příloha 2. Seznam tabulek.....	79
15.3.	Příloha 3. Seznam obrázků.....	80
15.4.	Příloha 4. Seznam grafů .....	81

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Hradci Králové, 2020

MUDr. Kateřina Neradová

## Poděkování

---

### Poděkování:

V úvodu děkuji především školitelce doc. MUDr. Heleně Žemličkové, Ph.D., která stála u počátků této vědecké práce a byla vždy ochotnou rádkyní v průběhu celého studia. Poděkování patří prim. MUDr. Lence Ryškové, Ph.D. za organizační pomoc a vytvoření vstřícných podmínek vedením Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, bez kterých by bylo obtížné příslušná data shromažďovat a hodnotit. Dík také patří kolektivu pečlivých laborantek za asistenci se zpracováním vzorků. Současně děkuji pracovníkům Národní referenční laboratoře pro antibiotika Státního zdravotního ústavu v Praze, jmenovitě Mgr. Vladislavu Jakubů a Mgr. Kataríně Pomorské za cennou asistenci a pomoc s analýzou dat a s přípravou publikace. Poděkování za spolupráci při organizaci sběru vzorků na veterinární konferenci patří MVDr. Zuzaně Čermákové, Ph.D. a MVDr. Zdeňku Hanzálkovi, Ph.D. Za cenné rady a statistické zpracování výsledků děkuji RNDr. Evě Čermákové z Výpočetního střediska Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Práce byla podpořena výzkumným projektem SVV 260398/2017.

## 2. Seznam použitých zkratk

BURP	Based upon repeat pattern
CA-MRSA	meticilin-rezistentní kmeny <i>S. aureus</i> vyskytující se v komunitním prostředí (Community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
CC	klonální komplex odvozený od výsledků MLST (Clonal complex)
CI	interval spolehlivosti (Confidence interval)
CIP	antibiotikum ciprofloxacín
CLI	antibiotikum klindamycin
CMP	antibiotikum chloramfenikol
CMRSA-5	Canadian epidemic MRSA-5
CXT	antibiotikum cefoxitin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
EARS-net	Evropská síť dohledu nad antimikrobiální rezistencí (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (European Centre for Disease Prevention and Control)
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EMRSA	meticilin-rezistentní <i>S. aureus</i> epidemický klon (Epidemic MRSA)
ERY	antibiotikum erytromycin
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
EU/EAA	Evropská Unie/Evropský hospodářský prostor (European Union/European Economic Area)
GEN	antibiotikum gentamicin
HA-MRSA	meticilin-rezistentní kmeny <i>S. aureus</i> vyskytující se v nemocničním prostředí (Hospital-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
IUMS	Mezinárodní unie mikrobiologických společností (International Union of Microbiology Societies)
J-region	Joining-region, součást stafylokokové chromozomální kazety <i>mec</i>

LA-MRSA	meticilin-rezistentní kmeny <i>S. aureus</i> vyskytující se u zvířat (Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
LNZ	antibiotikum linezolid
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (Minimum inhibitory concentration)
MLST	multilokusová sekvenční typizace (Multilocus sequence typing)
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
MSSA	meticilin-citlivý <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> )
NT MRSA	MRSA netytizovatelný pulzní gelovou elektroforézou (Non-typeable MRSA)
PBP	penicilin vázající protein (Penicillin-binding protein)
PBP2a	penicilin vázající protein 2a (Penicillin-binding protein 2a)
PBP2c	penicilin vázající protein 2c (Penicillin-binding protein 2c)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (Pulsed-field gel electrophoresis)
PEN	antibiotikum penicilin
pH	vodíkový exponent (Potential of hydrogen, lat. <i>pondus hydrogenia</i> )
PVL	Panton-Valentinův leukocidin (Panton-Valentine leukocidin)
R	rezistentní k testovanému antibiotiku (resistant)
C	citlivý k testovanému antibiotiku (susceptible)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
SCCmec	stafylokoková chromozomální kazeta <i>mec</i> (Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> )
SLV	jednolokusová varianta (Single locus variant)
<i>Sma</i> I	enzym restrikční endonukleáza
<i>spa</i> -CC	<i>spa</i> -klonální komplex, výsledek BURP analýzy ( <i>spa</i> -clonal complex)
SSTI	infekce kůže a měkkých tkání (Skin and soft tissue infection)



ST	sekvenční typ (Sequence type)
SXT	antibiotikum kotrimoxazol, trimethoprim/sulfamethoxazol
t	<i>spa</i> typ
TE roztok	roztok s vlastnostmi pufru, obsahuje 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8
TET	antibiotikum tetracyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminometan
VAN	antibiotikum vankomycin
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

### Vysvětlení významu genů používaných v této práci

gen <i>arcC</i>	karbamát kináza (Carbamate kinase)
gen <i>aroE</i>	shikimát dehydrogenáza (Shikimate dehydrogenase)
gen <i>blaZ</i>	gen kódující betalaktamázu udílející rezistenci k penicilinu
gen <i>ccr</i>	gen pro rekombinázu podílející se na stavbě <i>SCCmec</i>
gen <i>glpF</i>	glycerol kináza (Glycerol kinase)
gen <i>gmk</i>	guanylát kináza (Guanylate kinase)
gen <i>mecA</i>	gen kódující PBP2a udílející rezistenci k meticilinu
gen <i>mecC</i> ( <i>mecA<sub>ALGA251</sub></i> )	gen kódující PBP2c udílející rezistenci k meticilinu
gen <i>pvl</i>	gen kódující Panton-Valentinův leukocidin
gen <i>pta</i>	fosfát acetyltransferáza (Phosphate acetyltransferase)
gen <i>spa</i>	gen kódující protein A - součást buněčné stěny
gen <i>tetM</i>	gen udílející rezistenci k tetracyklinu
gen <i>tpi</i>	triózafosfát izomeráza (Triosephosphate isomerase)

### 3. Souhrn

Bakteriální rezistence patří k nejzávažnějším fenoménům moderní medicíny. *Staphylococcus aureus* je jednou z bakterií, u kterých výskyt antibiotické rezistence představuje závažnou komplikaci při účinné léčbě infekčních onemocnění. Klasicky se meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) vyskytuje v nemocničním prostředí, kde působí infekční komplikace u hospitalizovaných pacientů. Od typických nemocničních kmenů můžeme odlišit kmeny komunitní, které mají odlišnou genetickou charakteristiku. Vyskytují se u mladých lidí bez anamnestické vazby na zdravotnická zařízení. U zvířat byla prokázána třetí, odlišná skupina MRSA, která představuje pro člověka další epidemiologické riziko.

Je prokázáno, že MRSA s vyšší frekvencí kolonizuje jisté skupiny obyvatel. Těsný a častý kontakt se zvířaty činí takovou rizikovou skupinou nejen farmáře a chovatele zvířat, řezníky a zaměstnance jatek, ale i pracovníky ve veterinárním lékařství.

Cílem této studie bylo zjistit prevalenci kolonizace MRSA u veterinárních odborníků. Na přítomnost MRSA bylo testováno celkem 134 nosních výtěrů od zdravých účastníků veterinární konference konané v Hradci Králové v České republice. Získané kmeny byly dále fenotypově a genotypově charakterizovány.

Devět izolovaných kmenů MRSA bylo charakterizováno sekvenčním typem (ST, Sequence type), *spa* typem (t) a typem stafylokokové chromozomální kazety *mec* (SCC*mec*, Staphylococcal cassette chromosome *mec*). Bylo zachyceno pět různých genotypů, včetně ST398-t011-IV (n = 5), ST398-t2330-IV (n = 1), ST398-t034-V (n = 1), ST225-t003-II (n = 1) a ST4894-t011-IV (n = 1). Nosičství zvířecího kmene MRSA bylo potvrzeno v 8 případech, charakteristiky jednoho izolátu odpovídaly pravděpodobnému nozokomiálnímu původu. Mezi zvířecími kmeny byly popsány tři *spa* typy (t011, t034, t2330) patřící do jednoho dominantního *spa*-klonálního komplexu 11 (*spa*-CC, *spa*-clonal complex).

Podle výsledků této práce je prevalence nosičství MRSA u veterinárního personálu 6,7 %. I když to znamená nárůst ve srovnání s výsledky předchozí studie z roku 2008, prevalence v České republice zůstává stále nižší, než uvádí obdobné studie ze sousedních evropských zemí.

**Klíčová slova:** MRSA – LA-MRSA – CA-MRSA – nosičství

## Summary

Bacterial resistance is one of the most serious phenomenon of modern medicine. *Staphylococcus aureus* is one of the bacteria in which the incidence of antibiotic resistance is a serious complication in the effective treatment of infectious diseases. Typically, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) occurs in a hospital settings where infectious complications appear in hospitalized patients. Community strains can be distinguished from typical nosocomial strains, which affect young people without anamnestic link to health care facilities and have different genetic characteristics. In livestock, a third distinct group of MRSA has been identified and now represents an epidemiological risk to humans.

Cases of colonization or infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are frequently reported in people who work with animals, including veterinary personnel. The aim of this study was to determine the prevalence of MRSA colonization among veterinary professionals. A total of 134 nasal swabs from healthy attendees of a veterinary conference held in Hradec Kralove in the Czech Republic were tested for presence of MRSA. The strains were further genotypically and phenotypically characterized.

Nine isolated MRSA strains were characterized with sequence type (ST), *spa* type (t) and Staphylococcal cassette chromosome *mec* type (SCC*mec* type). Five different genotypes were described, including ST398-t011-IV (n = 5), ST398-t2330-IV (n = 1), ST398-t034-V (n = 1), ST225-t003-II (n = 1) and ST4894-t011-IV (n = 1). The carriage of the animal MRSA strain was confirmed in 8 cases, characteristics of one isolate corresponded to the possible nosocomial origin. Among animal strains were described three *spa* types (t011, t034, t2330) belonging into one dominating clonal complex 11 (*spa*-CC11).

According to results of this study, the prevalence of nasal carriage of MRSA in veterinary personnel is 6.7%. Although this means an increase compared to the results of previous study (year 2008), the prevalence in the Czech Republic is still remaining lower than reported from neighboring countries.

**Key words:** MRSA – LA-MRSA – CA-MRSA – carriage

#### 4. Úvod

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je klasický zástupce grampozitivních koků, který se formuje do charakteristických shluků. Jedná se o kultivačně nenáročnou, fakultativně anaerobní bakterii. Typické je pro něho zlatavé zbarvení kolonií obklopených zónou hemolýzy. To spolu s pozitivním průkazem koagulázy a katalázy usnadňuje jeho identifikaci.

Všeobecně rozšířený *S. aureus* je vybaven faktory virulence, které ho činí významným lidským patogenem. Spektrum stafylokokových infekcí je široké. Kromě toxinóz také působí hnisavá onemocnění kůže a měkkých tkání (SSTI, infekce kůže a měkkých tkání, Skin and soft tissue infection), vyvolává purulentní komplikace ran a popálenin, a to zejména u imunitně oslabených, predisponovaných jedinců. Způsobuje osteomyelitidy, artritidy i infekční endokarditidy, může vyvolat infekce močových cest nebo pneumonie. Takové infekce jsou často spojené s invazí bakterií do krevního řečiště, tedy s bakteriemií a sepsí.

Použití penicilinu v terapii stafylokokových infekcí znamenalo začátek antibiotické éry. *S. aureus* vůči němu brzy vyvinul rezistenci tvorbou penicilinázy, která rozkládá betalaktamovou strukturu tohoto antibiotika. Podkladem její tvorby je gen *blaZ*, který se díky svému umístění na plazmidu mezi stafylokoky velmi rozšířil. Penicilináze odolný meticilin byl posléze nahrazen oxacilinem či jinými isoxasolylniciliny (flukloxacilin, kloxacilin, dikloxacilin) s výhodnějšími farmakokinetickými vlastnostmi. V našich podmínkách se oxacilin osvědčil jako lék první volby u závažných stafylokokových infekcí. Nicméně k meticilinu a příbuzným látkám vznikla velmi brzy rezistence, když *S. aureus* získal gen *mec*. Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) se rozšířil zejména v nemocničních zařízeních, kde se stal důležitým původcem závažných nozokomiálních infekcí. Proto také zůstává MRSA po několik desetiletí stálým předmětem výzkumných aktivit. Důraz je kladen na správné porozumění mechanismům a genetickému podkladu rezistence spolu s popisem molekulární epidemiologie v lokálním i globálním kontextu. To pak přispívá k nastavení účinných preventivních opatření a k eliminaci rizik pro pacienty.

## 5. Cíle disertační práce

Kolonizace MRSA je běžně přítomna i ve zdravé populaci, nepůsobí svému nosiči klinické obtíže a většinou ji nepocítuje. Jedná se ale o významný rizikový faktor pro vznik endogenní infekce a možné epidemiologické riziko pro predisponované osoby. Někteří lidé jsou ve zvýšeném riziku kolonizace touto bakterií, ať už z důvodu předcházející hospitalizace nebo výkonu své profese. U takových lidí je třeba na možné riziko pomýšlet, zejména pokud dojde ke změně zdravotního stavu nebo k naplánování chirurgického zákroku.

Cílem disertační práce bylo stanovit prevalenci nosičství MRSA u veterinárních pracovníků, tedy skupiny obyvatel s předpokládaným vyšším rizikem kolonizace touto bakterií. Výsledky byly porovnány s literárními údaji z jiných evropských zemí. Získané kmeny byly charakterizovány fenotypově (profil antibiotické rezistence) a genotypově (sekvenčním typem, typem *SCC<sub>mec</sub>*, *spa* typem).

Informace, získané sledováním prevalence nosičství u rizikových skupin, je možné použít při formulaci lokálních doporučených postupů pro prevenci nemocničních nákaz. Molekulárně-genetická analýza získaných kmenů podá přehled o výskytu a šíření epidemiologicky významných kmenů v lokálním i globálním kontextu.

## TEORETICKÁ ČÁST

### 6. Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

Již v roce 1897 si všiml francouzský vojenský lékař *Ernest Duchesne* (1874-1912) antagonistického působení plísňe *Penicillium glaucum* na bakterie *Escherichia coli*. Jeho objev ale nebyl dál rozvíjen až do roku 1928, kdy obdobný úkaz zaregistroval *Alexander Fleming* (1881-1955). Náhodný objev baktericidního účinku produktu plísňe *Penicillium notatum* z roku 1928 se stal jedním z milníků moderní medicíny. Vývoji léku použitelného v humánní medicíně se věnovali *Howard Florey* (1898-1968) a *Ernst Boris Chain* (1906-1979). S jeho celosvětovým rozšířením a používáním se ale objevily první rezistentní kmeny a po roce 1960 vykazovalo penicilinovou rezistencí až 80 % kmenů *S. aureus* (2). Podkladem je tvorba betalaktamázy (tzv. penicilináza), která hydrolyzuje betalaktamový kruh antibiotika. Za produkci enzymu je zodpovědný gen *blaZ*, lokalizovaný na mobilním genetickém elementu (plazmidu), který se velmi snadno vertikálně i horizontálně šíří (3). V roce 1959 mělo vyřešit problémy s narůstající rezistencí nové semisyntetické betalaktamové antibiotikum meticilin, odolné vůči penicilináze. Svým účinkem působí inaktivačně na transpeptidázy (neboli PBP proteiny, penicilin-vázající protiny, Penicillin-binding proteins) a inhibuje tak syntézu peptidoglykanu buněčné stěny. Ale již o dva roky později, v roce 1961, byl ve Velké Británii poprvé zachycen kmen *S. aureus* rezistentní k tomuto antibiotiku (4). Produkt genu *mecA* je změněná transpeptidáza, označovaná PBP2a (penicilin-vázající protein 2a, Penicillin-binding protein 2a), na kterou se antibiotikum neváže a je neúčinné (5). V roce 2010 byl popsán gen *mecC* (*mecA*<sub>LGA251</sub>), jehož produktem jsou penicilin-vázající proteiny 2c (PBP2c, Penicillin-binding proteins 2c). Výskyt této varianty byl posléze potvrzen v celé Evropě nejen u lidí, ale také u divokých, hospodářských i domácích zvířat (6). Pro svoji nízkou stabilitu a vyšší frekvenci nežádoucích účinků (intersticiální nefritida) se meticilin v klinické praxi přestal užívat, byl nahrazen jinými zástupci isoxazolympenicilinů (oxacilin, kloxacilin, flukloxacilin) s výhodnějším bezpečnostním profilem. Ale termín meticilin-rezistentní se používá dodnes, jako označení pro kmeny *S. aureus* odolné vůči syntetickým betalaktamovým antibiotikům.

## 6.1. Genetický podklad oxacilinové rezistence

Původ nynějších celosvětově rozšířených klonů MRSA se dnes přepokládá v několika úspěšných liniích meticilin-citlivých *Staphylococcus aureus* (MSSA, Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*). Ty nezávisle na sobě získaly přenosnou stafylokokovou chromozomální kazetu *mec* (SCC*mec*, Staphylococcal cassette chromosome *mec*) od koaguláza-negativních stafylokoků (7). Jedná se o úsek genomové deoxyribonukleové kyseliny (DNA, Deoxyribonucleic acid) dlouhý 21 až 67 kb, dosud bylo u stafylokoků popsáno 13 typů (8). Základní struktura SCC*mec* zahrnuje repeticce a komplexy genů. Geny *ccr* kódují rekombinázy, které zprostředkovávají přesné začlenění nebo vystřížení SCC*mec* (9). Na základě rozdílů v oblasti tzv. J-regionu (Joining-region) se jednotlivé typy SCC*mec* rozdělují do subtypů, mohou se zde také vyskytovat integrované plazmidy nebo transpozony obsahující geny pro rezistenci (10). Nejvýznamnější součástí je 2,1 kb gen *mec*, který je genetickým podkladem rezistence k betalaktamovým antibiotikům. Kóduje tvorbu alterovaného penicilin-vázacího proteinu, známého pod označením PBP2a, který má nižší vazebnou afinitu pro oxacilin a brání tak jeho účinku (5).

## 6.2. Mikrobiologická charakteristika

Meticilin-rezistentní *S. aureus* tvoří grampozitivní koky o průměru 1  $\mu\text{m}$ , formující se typicky do nepravidelných shluků tvaru hroznů. V klinickém materiálu je často najdeme uspořádané i jednotlivě, v párech, tetradách či krátkých řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní, nepohyblivé, koagulázapozitivní, katalázapozitivní a oxidázanegativní, netvoří spory.

Bakterie je kultivačně nenáročná, roste v širokém rozmezí teplot (7-46 °C) i hodnot pH 4,2-9,3. K izolaci se používá nejčastěji krevní agar s přidavkem 5 % beranních erytrocytů a játrový nebo thioglykolátový bujon. Kolonie jsou hladkého povrchu a rovných okrajů, krémové konzistence, neprůhledné a pigmentované. Mají smetanovou, někdy zlatožlutou až naoranžovělou barvu, v okolí s hemolýzou. Růst v tekuté půdě se projevuje zákalem a tvorbou sedimentu (1).

Podle pouhých morfologických charakteristik a růstu na krevním agaru nelze odlišit kmen MSSA od MRSA (Obrázek 1). Přesnou, rychlou ale poměrně drahou metodou je průkaz genů *mecA* nebo *mecC*, které kódují oxacilinovou rezistenci (11). Kmeny MRSA nesoucí gen *mecC* nelze identifikovat pomocí molekulárních technik používaných pro detekci samotného

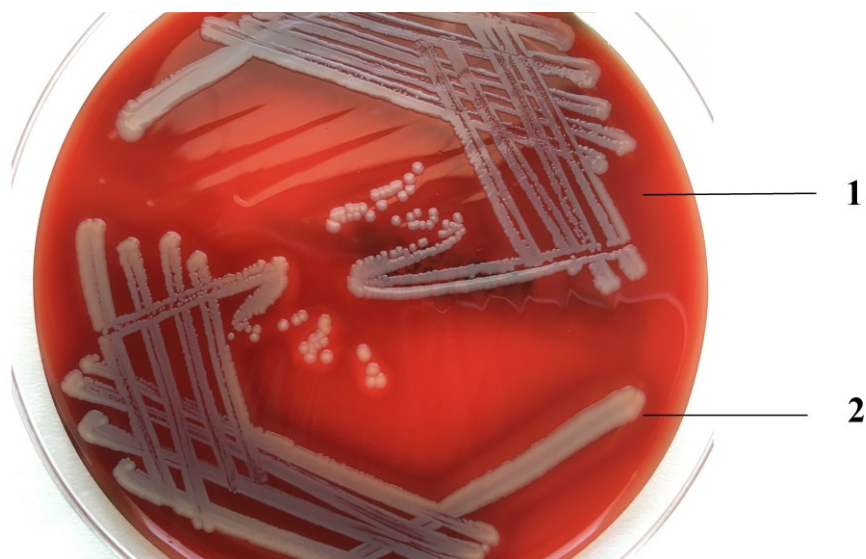
genu *mecA*, ani komerčními testy zaměřenými na průkaz pouze PBP2a. Výsledek takového průkazu pak může být falešně negativní. Metody in-house polymerázové řetězové reakce (PCR, Polymerase chain reaction) umožňují rychlou a spolehlivou detekci *mecC* genu (11).

Fenotypové vyšetření oxacilinovou rezistenci spolehlivě odhalí, ať je způsobena přítomností kteréhokoliv z genů. Diskovou difúzní metodou (Obrázek 2) se vyšetřuje citlivost k antibiotiku cefoxitinu 30 µg (12). Výsledek lze snadno interpretovat a je citlivější pro detekci rezistence zprostředkované geny *mecA* nebo *mecC*, než by bylo vyšetření citlivosti k antibiotiku oxacilinu (13).

Chromogenní agary využívají štěpení specifických substrátů kmeny *S. aureus*, které jeho koloniím propůjčí definované zbarvení. V půdě obsažený cefoxitin inhibuje růst MSSA, MRSA v jeho přítomnosti roste. Další začleněná selektivní činidla potlačují růst gramnegativních bakterií, kvasinek a některých grampozitivních koků (Obrázek 3). Výsledek je dostupný za 24 hodin kultivace. Jiné rychlé testy detekují produkt *mecA* genu, PBP2a na membráně MRSA, a to latexovou aglutinací nebo imunochromatograficky (Obrázek 4). Vždy by mělo následovat konfirmační vyšetření rezistence k cefoxitinu diskovou difúzní metodou nebo diluční bujónovou metodou testování minimální inhibiční koncentrace (MIC, Minimum inhibitory concentration).

### Obrázek 1. Růst na krevním agaru

Růst MRSA (1) a MSSA (2) na krevním agaru. Kolonie jsou si velmi podobné a podle morfologického obrazu nelze oxacilinovou rezistenci rozpoznat.

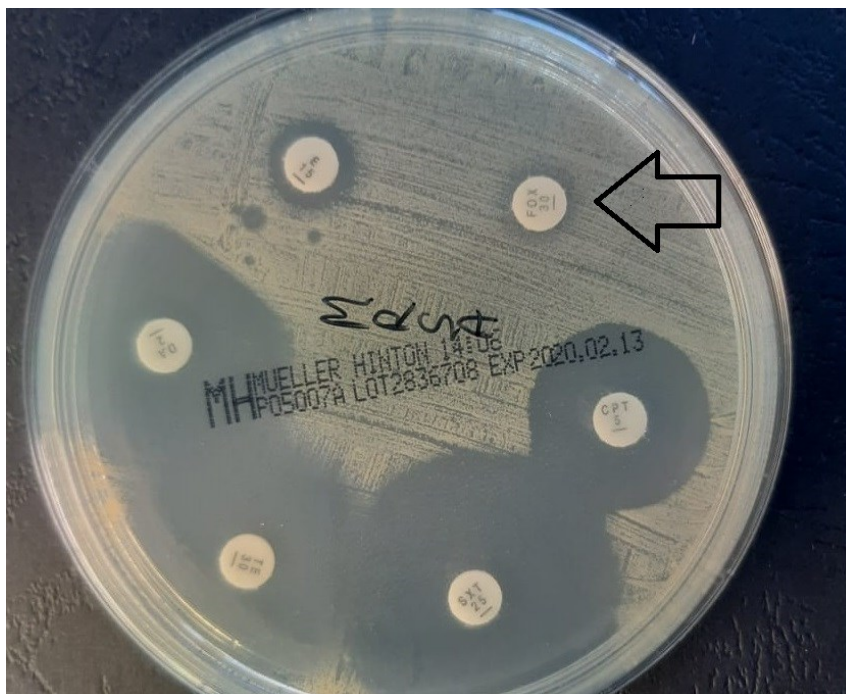


Autor: K. Neradová



## Obrázek 2. Diskový difúzní test – fenotypové vyšetření citlivosti k cefoxitinu 30 µg

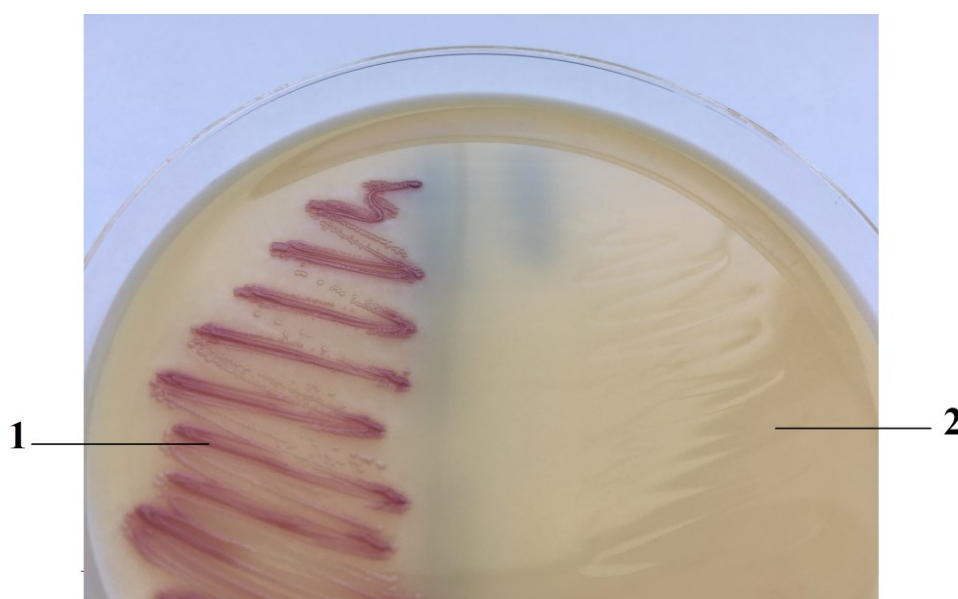
Šipka označuje nepřítomnost inhibiční zóny v okolí disku s cefoxitinem, tedy MRSA fenotyp.



Autor: M. Fajfr

## Obrázek 3. Růst na chromogenním agaru

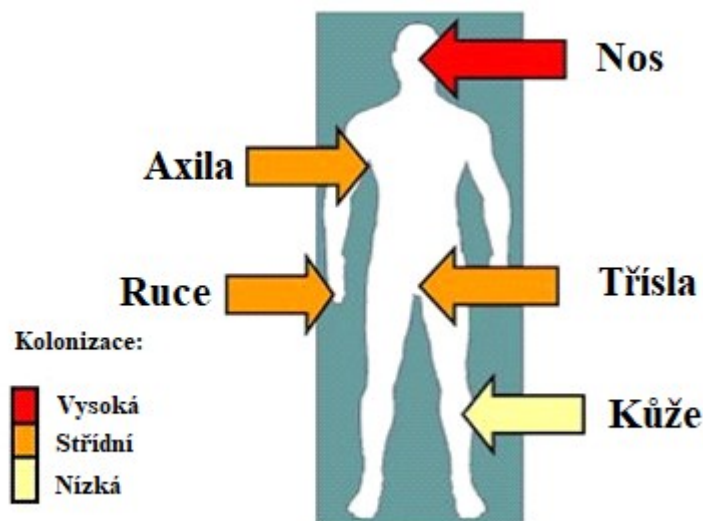
Růst MRSA (růžově, 1) a inhibice růstu MSSA (2) na MRSA selektivním chromogenním agaru, který je vhodný zejména jako screeningové vyšetření klinického materiálu.



Autor: K. Neradová



**Obrázek 5. Místa nejčastější kolonizace MRSA na lidském těle**



Upraveno podle <https://mrsatopic.com/>.

Během let 1970-1980 došlo k rozšíření MRSA nejprve v nemocničním prostředí, proto tyto kmeny dostaly označení nozokomiální (HA-MRSA, Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Hospitalizovaní pacienti i zdravotnický personál jsou frekventněji exponováni touto bakterií a jsou z hlediska vzniku kolonizace ve zvýšeném riziku. U zdravotnických pracovníků prevalence vykazuje i geografickou závislost a pohybuje se < 1 % v severovýchodních zemích až po > 40 % v jižní a západní Evropě (15). U hospitalizovaných pacientů se kolonizace popisuje v Evropě od 1-24 %, také v závislosti na zeměpisné lokalitě (16).

Meticilin-rezistentní *S. aureus* typickým původcem nozokomiálních infekcí. Jedná se o onemocnění vzniklá v souvislosti s pobytem či zákrokem ve zdravotnickém zařízení. Nemocniční kmeny MRSA se ve zdravotnických zařízeních snadno šíří, zejména důsledkem nedostatečné hygieny rukou. Šíření usnadňují i přesuny kolonizovaných pacientů mezi jednotlivými zdravotnickými nebo pečovatelskými zařízeními. Pouze důsledné dodržování hygieny, screening nosičů a izolační opatření mohou proces rozsevu omezit. Infekční komplikace vyvolané MRSA zvyšují nemocnost i úmrtnost, prodlužují a prodražují průběh hospitalizace. V nebezpečí jsou zejména imunosuprimovaní pacienti nebo pacienti po chirurgických výkonech. Lidé starší 65 let, kteří často trpí závažnými komorbiditami, bývají často hospitalizováni a vystaveni tak možnosti nozokomiální nákazy. Riziko infekce se také zvyšuje s délkou pobytu v nemocničním zařízení. MRSA pak způsobuje zejména purulentní

komplikace chirurgických ran a popálenin, pneumonie, často s invazí do krevního řečiště, bakterémie a sepse.

Molekulární analýza velkého souboru nemocničních izolátů MRSA z různých světových lokalit umožnila identifikovat 5 pandemických MRSA linií (CC, klonální komplex, Clonal complex), jak ukazuje Tabulka 1. Původní evropský genotyp ST250-MRSA-I vznikl z kmenů MSSA cirkulujících v dánských nemocnicích po roce 1950, tedy krátce před zavedením meticilinu do klinické praxe. Archaický klon se šířil Evropou do počátku 70. let, kdy byl postupně nahrazen dalšími úspěšnými klony (17). Pandemické klony zobrazuje Tabulka 1.

Stejně jako jinde v Evropě, také v České republice není výskyt klonálních komplexů MRSA konstantní a v průběhu let můžeme pozorovat dynamické změny. Od počátku monitorování v letech 1996-1997 byly u nás rozšířeny dva multirezistentní klony náležící do CC8. Tehdy převládali Brazilský/Maďarský klon ST239-III popsáný v Portugalsku a Iberijský klon ST247-IA, který pocházel pravděpodobně ze Španělska (18). V roce 1999 byl dosud dominantní klon nahrazen variantou ST239-IIIa. Nepřítomnost integrovaného plazmidu pT181 byl hlavní znak tohoto klonu, který byl typický pro Českou republiku (19). Iberijský klon si nadále udržel svoji četnost (20). Po roce 2001 se po celé zemi rozšířil epidemický kmen ST22-IV, známý jako EMRSA-15, náležící do CC22 (20). Dominance CC5 a kmene ST225-t003-II (66 %, 34/51) začala na přelomu let 2006/2007 (21). Současná epidemiologická situace pravděpodobně odpovídá situaci popsané v roce 2014, kdy byla v Praze popsána lokální epidemie způsobená kmeny ST225-t003-II a ST225-t014-II, které jsou úzce geneticky příbuzné (22). Také studie provedená v 11 nemocnicích z celé České republiky v letech 2017/2018 potvrdila trvajících predominanci CC5/ST225-MRSA-II (*spa* typy t003, t014). Zajímavý je průkaz nově se objevujícího *spa* typu t586, který je oběma předešlým blízké příbuzný. Nyní nabývá na významu a šíří se Českou republikou (23).

Podle dat Evropské sítě dohledu nad antimikrobiální rezistencí (EARS-Net, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) je prevalence MRSA u *S. aureus* izolovaných z krve v České republice dlouhodobě stabilní a osciluje kolem 13 % ( $\pm 2$  %; Graf 1). Tato hodnota je nižší, než evropský populační vážený průměr 16,4 % (24). Prevalence invazivních infekcí MRSA vykazuje v Evropě geografickou závislost (Obrázek 6).

Situaci ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové lze posuzovat z výsledků, které každoročně publikuje Antibiotické centrum Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Na začátku sledování v roce 2010 byl podíl MRSA na invazivních infekcích způsobených *S. aureus* nejvyšší, tedy 18 % (17 izolátů MRSA mezi 77 izoláty *S. aureus*). V následujících letech dochází k poklesu na 8 % v roce 2016 (7 izolátů MRSA z 90 izolátů *S. aureus*) až na 2,4 %

v roce 2018 (25). Od roku 2010 je zřejmé trvalé snižování výskytu MRSA působících infekce krevního řečiště, jak zobrazuje Graf 2. Genotypová charakteristika invazivních MRSA kmenů ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové odpovídá situaci popsané v České republice. Dle studie z let 2010-2016 se nejčastěji vyskytovaly tři úzce příbuzné genotypy, ST225-t003-II, ST5-t002-II a ST225-t014-II (26).

**Tabulka 1. Přehled pandemických HA-MRSA klonů se zaměřením na výskyt v České republice**

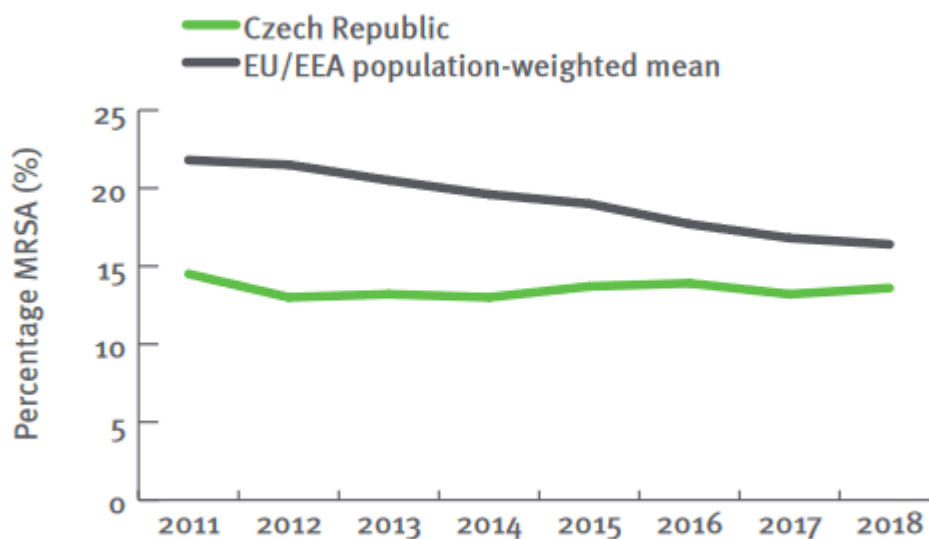
Klonální komplex	Označení klonu	Název klonu	Celosvětový výskyt	Výskyt v České republice
CC5	ST5-MRSA-I	EMRSA 3	Evropa, Jižní Amerika	
	ST5-MRSA-II	New York/Japonsko (USA100)	Evropa, USA, Japonsko, Kanada, Jižní Korea, Austrálie	
	ST5-MRSA-IV	Pediatrický (USA800)	Evropa, USA, Jižní Amerika	
	ST228-MRSA-I	Italský/Southern Germany	Evropa	
	ST225-MRSA-II		Evropa	Od roku 2006 dosud (22), (21), (23)
CC8	ST8-MRSA-IV	UK EMRSA 2/6 (USA 00)	Evropa, Austrálie, Kanada, USA	
	ST8-MRSA-II	Irský 1	Evropa, USA	
	ST247-MRSA-I	Iberijský / EMRSA 5/ Římský	Evropa, USA	1996-1997 (18)
	ST239-MRSA-III	Brazilský/ Maďarský/ EMRSA 1/4/11	Evropa, Asie, Austrálie, Afrika, Jižní Amerika	1996-1997 (18) 1999 (19)
CC22	ST22-MRSA-IV	EMRSA 15, Barnim	Evropa, Austrálie, Kanada, Indonésie	2001 (20)

<b>CC30</b>	ST36-MRSA-IV	EMRSA 16 (USA200)	Evropa, USA, Austrálie, Kanada
<b>CC45</b>	ST45-MRSA-IV	Berlínský (USA600)	Evropa, USA

Upraveno podle Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovarova V, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Types in the Czech Republic. J Clin Microbiol. 1999;37(9):2798–803.

### Graf 1. Populační vážený průměr u invazivních MRSA izolátů

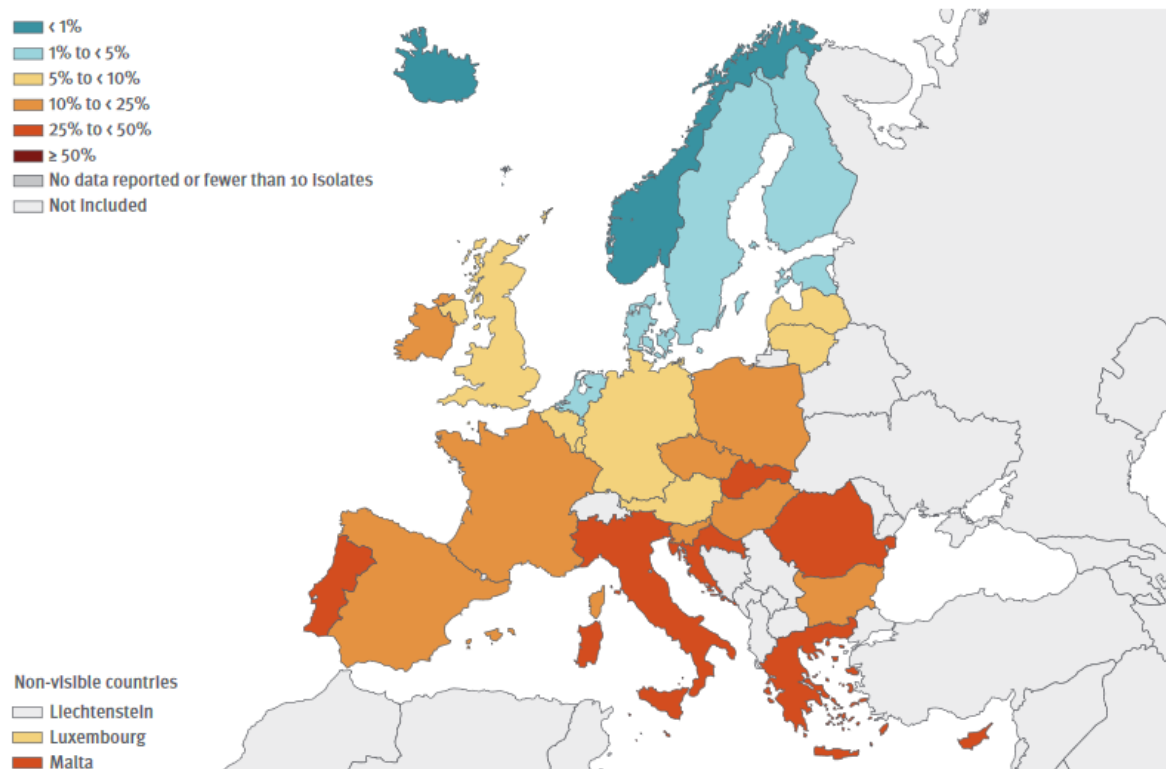
Srovnání procenta (%) invazivních izolátů MRSA v České republice se státy Evropské Unie/Evropského hospodářského prostoru (EU/EEA, European Union/European Economic Area). V grafu je vyneseno populační vážený průměr v letech 2011-2018.



Převzato z European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2019. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>

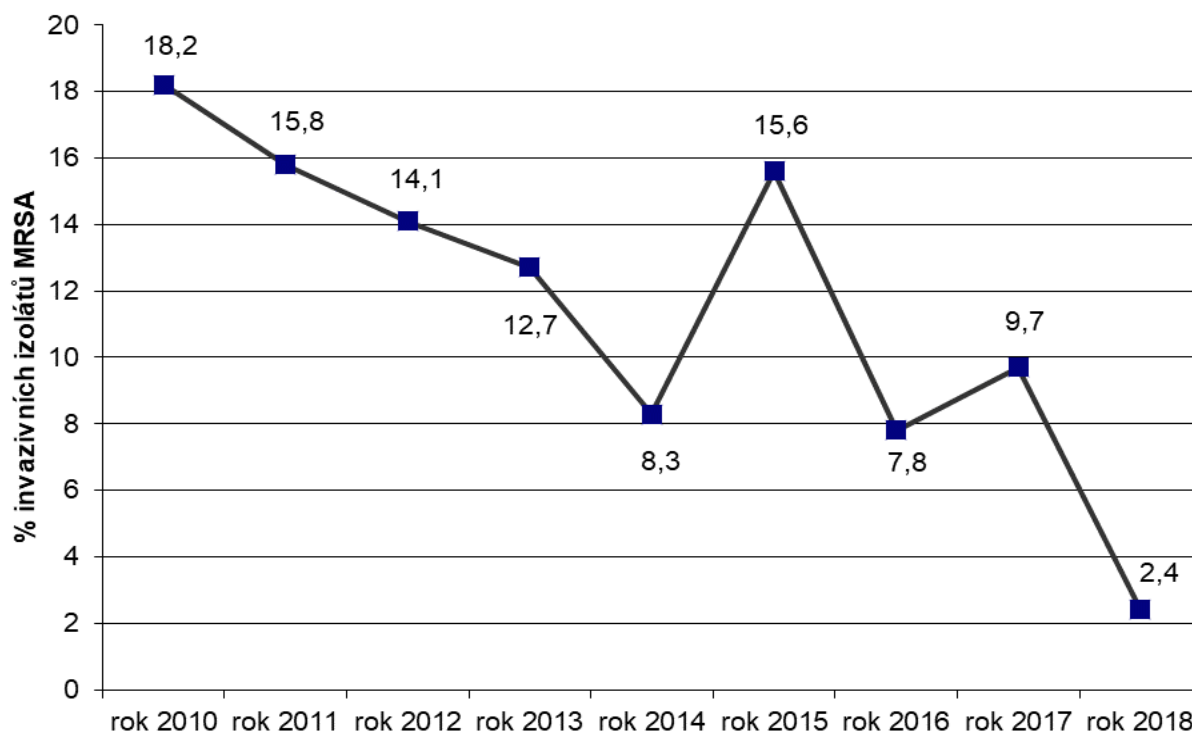
## Obrázek 6. Výskyt invazivních MRSA v Evropě

Procento (%) invazivních izolátů MRSA v jednotlivých evropských zemích v roce 2018. Tradičně patří mezi státy s nejnižší prevalencí MRSA země severní Evropy (vyznačeno modře). Česká republika patří dlouhodobě mezi státy se středními hodnotami prevalence (vyznačeno oranžově). Směrem na jih se prevalence zvyšuje, s největšími problémy se potýkají středomořské státy (vyznačeno červeně).



Převzato z European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2019. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>

**Graf 2. Invazivní infekce (%) způsobené MRSA ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v letech 2010-2018**



Upraveno podle Paterová P, Žemličková H. Přehled rezistence bakterií na antibiotika Fakultní nemocnice Hradec Králové 2018. Dostupné z: [https://intra1.fnhk.cz/data-intra/adresare/9831\\_1.pdf](https://intra1.fnhk.cz/data-intra/adresare/9831_1.pdf)

Jak vyplývá z uvedených genetických charakteristik, nemocniční kmeny MRSA typicky obsahují SCC $mec$  typu II, I nebo III, které jsou větší a obsahují také geny kódující rezistenci k antibiotikům jiných skupin, jako jsou např. fluorochinolony, makrolidy, linkosamidy, aminoglykosidy, kotrimoxazol (27).

V 90. letech 20. století došlo v USA k rozšíření klonu USA300 (ST8-MRSA-IV), který je variantou MRSA linie CC8 a často nese geny pro produkci exotoxinu (PVL, Panton-Valentine leukocidin, Panton-Valentinův leukocidin). Epidemie způsobená tímto typicky komunitním klonem MRSA (CA-MRSA, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), vedla v USA k prudkému nárůstu infekcí. Jednalo se zejména rekurentní SSTI a závažné nekrotizující pneumonie (28). Klon USA300 se nejprve šířil mezi mladými lidmi, zejména v kolektivech (například sportovci, vojáci apod.). Později se začal uplatňovat v nemocničním prostředí, kde nahradil původní nozokomiální kmeny a působil invazivní infekce (29). Ze Severní Ameriky došlo pak k opakovanému zavlečení tohoto klonu do Evropy (30), kde nyní s největší prevalencí nalezneme příbuzný CC8/ST80-MRSA-IV (31).



Izoláty CA-MRSA typicky obsahují SCC<sub>mec</sub> typu IV, V, VII neb VIII, které jsou menší a kromě *mecA* obvykle nenesou žádné další geny antibiotické rezistence (32).

Nosiči mají zvýšené riziko komplikací po chirurgickém zákroku. Zejména kolonizace perinea, genitálu a hýždí vede k častějším infekcím v těchto oblastech (33). Prevalence CA-MRSA jako původce infekce se geograficky velmi liší. V některých částech USA dosahuje až 60 %, v jižní Evropě 40 %, ale v severní Evropě < 1 % (34).

Nejnoveji popsanou rizikovou skupinou jsou veterinární pracovníci, řezníci a pracovníci na jatkách, farmáři, chovatelé hospodářských zvířat, která jsou významným rezervoárem zvířecích kmenů MRSA (LA-MRSA, Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; 35). Pravděpodobnost kolonizace člověka závisí na frekvenci i intenzitě kontaktu se zvířaty a na délce expozice. Předpokládá se totiž, že hospodářská zvířata jsou kolonizována spíše přechodně, než trvale (36). Perzistentní kolonizace člověka je tedy silně vázána na rizikovou expozici, v období bez kontaktu se zvířaty často vymizí (37, 38). Typicky jsou ohroženy osoby pracující s prasaty, kde je prevalence nosičů nejvyšší, kolonizace byla popsána u 24-86 % chovatelů těchto zvířat (39, 40). MRSA byla prokázána i u osob v kontaktu s ostatními hospodářskými zvířaty. U 31-37 % chovatelů skotu (41, 38) a také u 9-37 % chovatelů drůbeže (41, 42). Nejvíce studií pochází tradičně ze zemí s rozvinutou živočišnou výrobou, jako jsou Dánsko, Německo a Nizozemí. Další příklady uvádí Tabulka 2.

**Tabulka 2. Prevalence nasální kolonizace MRSA u pracovníků v rizikovém kontaktu se zvířaty v evropských zemích**

Země	Rok studie	Expozice zvířatům	Zaměstnání	Počet nosičů MRSA / počet účastníků studie	Literatura
Německo	2007/ 9	prasata	chovatel	97/113 85,8 %	(40)
Nizozemí	2008	prasata	chovatel	33/139 23,7 %	(39)
Německo	2008	skot	chovatel	19/ 51 37,3 %	(38)
Nizozemí	2009	prasata	zaměstnanec jatek	14/249 5,6 %	(43)
Nizozemí	2009	různá	chovatel	13/ 49 26,5 %	(43)
Německo	2009	krocani	chovatel	22/ 59 33,7 %	(42)
Nizozemí	2009/10	prasata	zaměstnanec jatek	11/341 3,2 %	(44)

Itálie	2010	skot	chovatel	40/113	35,4 %	(45)
Nizozemí	2010	drůbež	zaměstnanec jatek	46/466	5,6 %	(46)
Nizozemí	2010/11	prasata	chovatel	42/110	38,2 %	(47)
Německo	2011	prasata	chovatel	237/ 35	77,0 %	(48)
Nizozemí	2011	drůbež	chovatel	5/ 56	8,9 %	(49)
Španělsko	2012	prasata	zaměstnanec jatek	2/ 25	8,0 %	(50)
Nizozemí,	2011	prasata	chovatel	16/289	5,5 %	(51)
Belgie						
Belgie	2012	různá	chovatel	36/138	26,1 %	(52)
Německo	2013	prasata	chovatel	20/ 36	56,0 %	(41)
Německo	2013	skot	chovatel	0/ 25	0,0 %	(41)
Německo	2013	drůbež	chovatel	0/ 17	0,0 %	(41)
Španělsko	2014/15	prasata	chovatel	81/140	57,9 %	(53)
Itálie	2016	prasata	chovatel	29/396	7,3 %	(54)
Itálie	2017/18	ovce	chovatel	3/275	1,1 %	(55)
Nizozemí	2018	skot	chovatel	41/131	31,3 %	(56)
Itálie	2018	prasata	chovatel	19/ 88	21,6 %	(57)

Upraveno podle Goerge T, Lorenz MB, van Alen S, Hübner NO, Becker K, Köck R. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. *Vet Microbiol.* 2017;200:6–12.

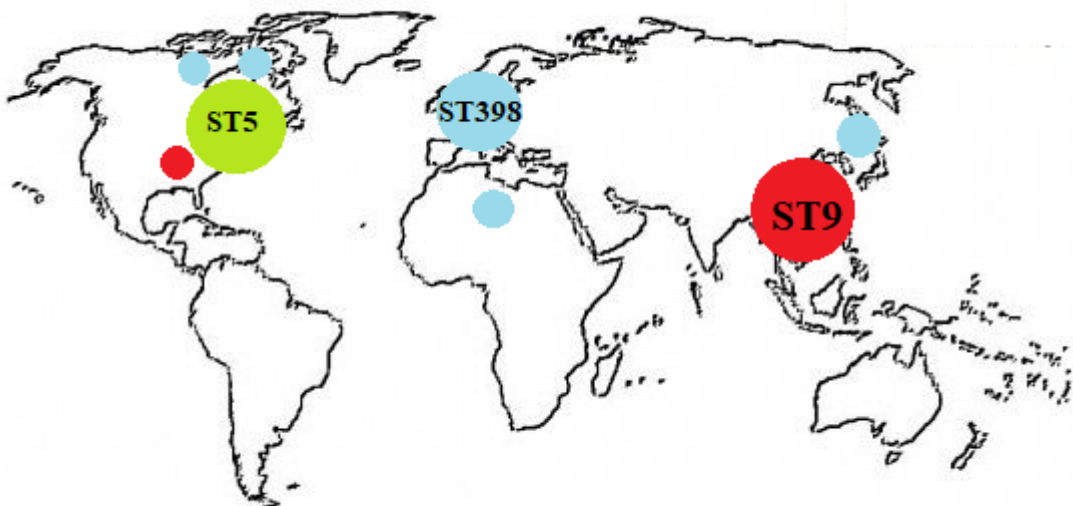
Zvířecí kmeny MRSA byly u člověka poprvé popsány v roce 2005 v Nizozemí (58). Zde byl identifikován nový klon MRSA CC398/ST398. Zdrojem kolonizace byl častý kontakt s prasaty. První záchyt LA-MRSA, dříve známý jako netylizovatelný MRSA (NT MRSA, Non-typeable MRSA), vyjadřoval nemožnost typizovat kmen pulzní gelovou elektroforézou (PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis) a byl omezen na jen na ST398 (58). Predominantním typem *SCCmec* je typ IV a V. Od té doby byla linie prokázána i u jiných živočišných druhů nejen v evropských zemích. Postupně byla zavlečena i do nemocničního prostředí.

Předpokládá se lidský původ kmenů LA-MRSA z klonů MSSA, které se přizpůsobily zvířecím hostitelům. Například ztratily některé typické faktory virulence, jako jsou stafylokokové enterotoxiny a toxiny syndromu toxického šoku (59). Současně kvůli selekčnímu tlaku získaly geny rezistence *tetM*, *mecA* případně *mecC*, které kódují tetracyklinovou a oxacilinovou rezistenci (58, 60). Je pravděpodobné, že v průběhu procesu opětovného přizpůsobení se člověku kmeny LA-MRSA znovu faktory virulence získají.

Kmeny ST398 PVL pozitivní byly již identifikovány jako původce závažných pneumonií u člověka (61). Dynamické změny během readaptace zahrnují také modifikace adhezivních povrchových molekul nebo rekombinace mezi zvířecími a lidskými druhy (62).

Nejdříve popsané kmeny LA-MRSA náležely do CC398, ale další výzkumy ukázaly mnohem širší genetickou variabilitu. Navíc je zřejmé, že šíření MRSA u hospodářských zvířat se liší i geograficky, jak zobrazuje Obrázek 7. Celosvětově nejrozšířenějším klonálním komplexem je ST398, který je nejčastější v Evropě a v USA. I když je občas ST398 zachycen i v Asii (63), převládá tam spíše ST9, který se vyvíjí odlišně (64). V Severní Americe je zase popisován ST5, který má zvýšenou schopnost vyvolávat infekce u lidí (65). ST398 byl příležitostně popsán i v Africe (66).

**Obrázek 7. Světové rozšíření LA-MRSA a distribuce jednotlivých sekvenčních typů**



ST398 - modrá, ST5 – zelená, ST9 - červená

Autor: K. Neradová

MRSA je významným patogenem člověka i zvířat. Asymptomatická kolonizace zřídka kdy vyústí v symptomatickou infekci (67). Škála infekcí způsobených LA-MRSA je obdobná jako u nemocničních nebo komunitních typů, vyvolává zejména bakterémie, SSTI, pneumonie, osteomyelitidy, endokarditidy apod. Spektrum dokumentovaných onemocnění uvádí Tabulka 3. Jejich průběh bývá ale mírnější a výsledky léčby příznivější, na čemž se mohou podílet i odlišné demografické charakteristiky postižených pacientů (68). Data poskytující informace o incidenci infekcí způsobených u člověka jsou shromažďována jen několika

evropskými státy a tradičně pochází z Dánska a Německa, které jsou největšími evropskými producenty prasat. Nicméně incidence infekcí způsobených MRSA CC398 zůstává nízká, odhadovaná v německé a dánské populaci na < 3/100 000 obyvatel za rok (67). Výskyt kmenů LA-MRSA v nemocnicích v České republice dosud systematicky monitorován nebyl, *spa* typizace byla prováděna pouze u vybraných izolátů a výskyt LA-MRSA se neprokázal (69). Dosud nepublikovaná data dokazují výskyt ST398 u pacientů ošetřených ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kdy z 34 vzorků MRSA byly čtyři ST398. Dva náležely *spa* typu t011, jeden nosičský záchyt a druhý izolát pocházel z tracheálního aspirátu od pacienta s nozokomiální pneumonií. Dva byly *spa* t034, jednalo se o rodinný výskyt SSTI u matky a syna, kteří byli ošetřováni ambulantně (70). Anamnestická data týkající se kontaktu se zvířaty u těchto pacientů nejsou dostupná. Alarmující je výskyt nozokomiálního typu infekce u pacienta s pneumonií, který naznačuje možnost zavlečení ST398 do českého nemocničního prostředí.

**Tabulka 3. Některé dokumentované infekce vyvolané LA-MRSA CC398 u osob v kontaktu s hospodářskými zvířaty a jejich účinná terapie**

Infekce	<i>spa</i> typ	Země	Kontakt se zvířaty	Rok studie	Léčba	Lit.
mastitida	t108	Nizozemí	prasata	2004	teikoplanin	(71)
rána kousnutím	t011/t108	Belgie	prasata	2007	vankomycin, linezolid	(72)
ranná infekce	t034	Dánsko	prasata	2007	vankomycin	(73)
celulitida	t899	Itálie	prasata	2007	vankomycin	(74)
infekce kůže	t011	Španělsko	prasata	2009	mupirocin lokálně	(75)
ranná infekce	t034	Dánsko	prasata	2008	vankomycin	(76)
nekrotizující fasciitida	t899	Itálie	skot	2008	teikoplanin, linezolid, klindamycin	(77)
infekce kůže	t011/t108	Španělsko	prasata	2008	mupirocin lokálně	(78)
empyém hrudníku	t011	Španělsko	prasata	2010	linezolid	(78)

infekce kůže	t1451	Španělsko	prasata	2008/ 2010	mupirocin lokálně	(79)
artritida, endokarditida	t011/ t2576	Německo	prasata	2013	daptomycin, linezolid	(76)

Upraveno podle Goerge T, Lorenz MB, van Alen S, Hübner NO, Becker K, Köck R. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. *Vet Microbiol.* 2017;200:6–12.

Jak bylo popsáno výše, na základě epidemiologických a genetických charakteristik lze tradičně rozlišit tři typy MRSA, komunitní, nemocniční a zvířecí (Tabulka 4). Postupem času ale dochází ke stírání rozdílů, kdy například zvířecí kmeny vyvolávají komunitní infekce u lidí a zavlečením původních linií CA-MRSA a LA-MRSA do nemocnic se z nich stávají také obávané nozokomiální patogeny.

**Tabulka 4. Souhrn základních rozdílů mezi třemi epidemiologickými skupinami MRSA**

Charakteristika	HA-MRSA	CA-MRSA	LA-MRSA
<b>Pacienti / nosiči</b>	starší věk (> 65 let)	mladí lidé	mladí lidé
<b>Infekce</b>	infekce krevního řečiště, nozokomiální pneumonie, infekce ran	SSTI, rekurentní abscesy, nekrotizující pneumonie	SSTI, pneumonie
<b>Výskyt</b>	zdravotnická zařízení	kolektivy	chovy hospodářských zvířat
<b>Rezistence k antibiotikům</b>	betalaktamy, fluorochinolony, makrolidy, linkosamidy, aminoglykosidy, kotrimoxazol apod.	betalaktamy	betalaktamy, tetracyklin, fluorochinolony
<b>SCCmec</b>	I, II, III	IV, V, VII, VIII	IV, V

## 7. Přehled terapie infekcí způsobených MRSA

Mezi glykopeptidová antibiotika s baktericidním účinkem vůči MRSA, dostupná v našich podmínkách, řadíme vankomycin a teikoplanin. Vankomycin byl do klinické praxe zaveden v roce 1956, ale nebyl často používán pro svou nefrotoxicitu a ototoxicitu. Tyto nežádoucí projevy byly později sníženy až moderními purifikačními postupy. Účinkuje inhibičně na tvorbu buněčné stěny. Při parenterálním podání má obtížně predikovatelný distribuční objem a clearance, proto je optimálním způsobem podání prodloužená intermitentní infúze. Doporučené je úvodní podání nasycovací dávky 25-30 mg/kg tělesné hmotnosti, pokračuje se udržovacími dávkami 15-20 mg/kg. Půl hodiny před podáním čtvrté dávky se začíná monitoring sérových hladin tak, aby bylo dosaženo maximální klinické účinnosti a minimalizace toxicity. Optimální se v tomto případě jeví udržovat sérovou hladinu 15-20 mg/l. Infúze se podává maximální rychlostí 10 mg/min, aby se předešlo vzniku tzv. red man syndromu. Reakce je způsobena degranulací žírných buněk. Účinnost teikoplaninu v porovnání s vankomycinem při terapii MRSA bakterémie je často diskutována, data získaná metaanalýzou z roku 2010 podpořila názor na srovnatelnost obou preparátů (80). Teikoplanin má menší nefrotoxicitu při dodržení maximální dávky 800 mg/den (81). Obvyklá dávka pro dospělé je 400 mg/den za monitoringu sérových hladin, které by se měly pohybovat v rozmezí 20-60 µg/ml.

Nové širokospektré antibiotikum z 5. generace cefalosporinů ceftarolin je v České republice schváleno k terapii SSTI a komunitní pneumonie v dávce 600 mg dvakrát denně v intravenózní formě. Z farmakologického hlediska se jedná o prodrug ceftarolin-fosamil. Prekurzor je dobře rozpustný ve vodním prostředí a v lidském těle je rozkládán na aktivní formu ceftarolin. Mechanismus jeho účinku je stejný jako u jiných betalaktamových antibiotik, vyniká svou vazbou na modifikované PBP2a. Vzhledem ke svému rychlému baktericidnímu účinku je vhodný zejména v léčbě akutně probíhajících infekcí, kde není možné použít běžnou terapii (82).

Daptomycin patří do skupiny cyklických lipopeptidů a účinkuje baktericidně pouze na grampozitivní bakterie, včetně MRSA a na stafylokoky se sníženou citlivostí k vankomycinu (83, 84). Je indikován u SSTI, protože účinkuje na buňky v klidovém stádiu a dobře proniká do biofilmu. V kombinační terapii má použití v léčbě pravostranné stafylokokové infekční endokarditidy.

Velmi dobrý průnik do měkkých tkání, plicního parenchymu a centrální nervové soustavy má bakteriostatický preparát linezolid ze skupiny oxazolidinových antibiotik. Jedná se

o rezervní antibiotikum účinné na infekce vyvolané multirezistentními kmeny. Inhibuje proteosyntézu a ovlivňuje tak i produkci bakteriálních toxinů. Je antibiotikem první volby při nekrotizující pneumonii vyvolané PVL produkujícími kmeny. Při léčbě trvající déle než dva týdny se může vyskytnout reverzibilní myelosuprese (cca 5 % pacientů). Maximální doba terapie je omezena na čtyři týdny. Biologická dostupnost při perorálním a parenterálním podání je stejná, podává se v dávce 600 mg dvakrát denně.

K dlouhodobé terapii infekcí MRSA je vhodný trimethoprim/sulfamethoxazol (kotrimoxazol), který je volbou zejména při deeskalační strategii. Tento kombinovaný sulfonamidový preparát inhibuje metabolismus kyseliny listové a syntézu DNA, proto je kontraindikován v těhotenství, při kojení a u dětí do 2 měsíců věku. Obvyklé dávkování je 960 mg dvakrát denně a je dostupný pro parenterální i perorální podání. Závažným nežádoucím účinkem je toxická epidermální nekrolýza (Lyellův syndrom), která se projevuje febriliemi, exantémem, puchýřemi a krustami.

Produkt bakterie *Pseudomonas fluorescens*, mupirocin, působí jako falešný substrát a narušuje tak průběh proteosyntézy. Používá se v lokálním podání, zejména pro dekolonizaci MRSA osídlených pacientů (82).

## 8. Prevence výskytu MRSA v nemocničním prostředí

Jak již bylo zmíněno, MRSA je typicky nemocniční patogen a prevenci jeho šíření je aktuálně věnována velká pozornost. Problém je multifaktoriální a musí být řešen komplexně. Každé zdravotnické zařízení má zavedena opatření ke kontrole výskytu a zamezení šíření epidemiologicky významných původců infekcí, mezi něž MRSA také náleží. Mezi hlavní postupy patří aktivní vyhledávání pacientů s pozitivním nálezem MRSA a provádí se u vybraných rizikových skupin, které jsou jasně definovány. Při přijetí do zdravotnického zařízení se provádí screening u pacienta s anamnézou MRSA positivity, pobytu v zahraničí nebo v zařízení se známým endemickým výskytem rezistentních bakterií (85). Rizikové jsou zejména domovy důchodců a léčebny dlouhodobě nemocných.

Hygiena rukou je jedním z nejdůležitějších preventivních opatření, kterou je třeba provádět pravidelně a správným způsobem. Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) doporučuje zásady a správný postup (86). Nejrizikovější skupinou z hlediska přenosu MRSA je zejména ošetrovatelský a pomocný personál vzhledem k častému a úzkému kontaktu s pacientem. Při dodržování správné hygieny rukou dochází v nemocničním zařízení

k výraznému snížení výskytu MRSA a komplikací jím způsobených (87). Stejně tak důležitý je pravidelný úklid a dezinfekce prostředí s použitím účinných dezinfekčních látek (85).

Při nálezu MRSA u daného pacienta se nastaví bariérová ošetrovací technika nebo izolační opatření, která mají za úkol zabránit dalšímu šíření bakterie. Jedná se o komplex postupů např. oddělení čisté a nečisté zóny, nekřížení provozu nebo adekvátní manipulace s prádlem a odpady. U zdravotníků je důraz kladen na správné používání osobních ochranných pomůcek a dodržování zásad osobní hygieny a hygieny rukou. Překlady a pohyb pacienta v rámci nemocnice jsou minimalizovány, vyšetřování či invazivní zákroky se pak provádějí ve speciálním režimu. Pokud se jedná o plánovaný výkon, je zařazen na konec programu. Po neplánovaných výkonech následuje technologická pauza k provedení nezbytného úklidu a dezinfekce prostředí (85).

Dekolonizace je další z možností prevence. Má za úkol zabránit rozvoji endogenní infekce u kolonizovaného pacienta a zamezit dalšímu šíření MRSA. Je vhodná zejména u pacientů v intenzivní péči nebo před plánovaným chirurgickým výkonem (85). Používaným antibiotikem pro lokální aplikaci je mupirocin. Uvádí se, že je dosahováno 90% úspěšnosti dekolonizace po prvním týdnu léčby, 60% pak v delším časovém odstupu. Jeho použití ale ztrácí na významu kvůli narůstající rezistenci, která je plazmidově vázaná a snadno přenosná (88). Pro nebezpečí selekce rezistence není také doporučováno podávat mupirocin dlouhodobě (82). Pro dekolonizaci nosičství na nosní sliznici je možné použít mupirocin či antiseptikum polyhexanid, na kůži a ostatní sliznice pak antibakteriálně působící chlorhexidin, jodovaný povidon nebo triclosan. Účinnost dekolonizace k eradikaci MRSA zůstává kontroverzní. Míra úspěšnosti uváděná v prospektivních studiích se různí, od 25 % až po 89 % v závislosti na použitém režimu a nastavených kritériích (89, 90).

Racionální antibiotická terapie zahrnuje postupy, které napomáhají bezpečnému a maximálně účinnému používání antibiotik. Základem je úzká spolupráce multioborového týmu, který zahrnuje nemocničního epidemiologa, mikrobiologa, infektologa, farmakologa a další zdravotnický personál. Lokální surveillance antibiotické rezistence je nutná k průběžnému hodnocení stavu a trendů u infekcí nozokomiálního původu. Její výstupy se pak implementují do lokálních doporučených postupů pro úvodní terapii a profylaxi infekcí. Význam má také kategorizace a supervize v používání zejména rezervních antibiotik a kontrola jejich spotřeby.



## PRAKTICKÁ ČÁST

### 9. Materiál

#### 9.1. Vyjádření etické komise

Studie byla písemně schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové, referenční číslo 201808 S25P a 201912 I31P (Příloha 1). Každý subjekt dal ústní souhlas s odběrem i vyplněním dotazníku poté, co mu byla povaha studie výzkumným pracovníkem plně vysvětlena. Během procesu udělování souhlasu byl každému subjektu poskytnut dostatek času na dotazy. Všechna získaná data byla poskytnuta a zpracovávána zcela anonymně.

#### 9.2. Studovaná populace

Za účelem sběru vzorků byli osloveni účastníci veterinární konference VETclasses 2017, která se konala v České republice v Hradci Králové ve dnech 23. - 24. 9. 2017. Cílovými skupinami byli odborníci pracující s malými i velkými hospodářskými zvířaty. Mezi 436 účastníky bylo 334 praktikujících veterinářů a 102 zdravotních sester, techniků a dalších pracovníků zapojených do průmyslu nebo výzkumu. S odběrem souhlasilo celkem 134 dobrovolníků. Většina z nich pocházela z České republiky, ale zastoupeny byly i dvě osoby vykonávající aktivní praxi na Slovensku a v Belgii.

#### 9.3. Sběr vzorků

Jako nejvhodnější místo pro odběr vzorku byl stanoven stěr z nosní sliznice (*anterior nasi*). Jedná se o místo nejčastěji kolonizované MRSA, zároveň je velmi dobře přístupné odběru i s ohledem na komfort dobrovolníků. Bilaterální výtěr z nosní sliznice (zanořeno ~ 1 cm do každé nosní dírky) byl proveden sterilním vatovým tamponem, uložen v Amiesově transportním médiu (Copan Transystem<sup>®</sup>), označen číslem a neprodleně transportován do laboratoře k dalšímu zpracování. Sběr vzorků byl dobrovolný, anonymní a vyplněním dotazníku byly získány další epidemiologické údaje (Obrázek 8). Otázky pokrývaly základní demografická data, místo a popis práce. Nechyběl údaj o frekvenci expozice zvířaty a typ klinické praxe. Dotazovaný specifikoval, zda se ve své každodenní praxi věnuje malým

zvířatům, jako jsou většinou psi, kočky, hlodavci, ptactvo nebo plazi. Nebo zda pracuje spíše s velkými zvířaty, jako jsou koně, prasata, skot nebo ovce. Dotazována byla i anamnéza předešlé expozice MRSA pozitivního zvířeti, údaj o hospitalizaci v posledních 30 dnech nebo sdílení domácnosti se zdravotnickým pracovníkem.

### Obrázek 8. Anonymní dotazník

**Dotazník** (odpovědi označte křížkem) č.vzorku: \_\_\_\_\_

**Věk:** \_\_\_\_\_

**Pohlaví:** muž  žena  **Počet let v praxi:** \_\_\_\_\_

**Místo výkonu povolání (okres):**

<b>Typ klinické praxe</b>	malá zvířata	<input type="text"/>
	velká zvířata	<input type="text"/>
	prasata	<input type="text"/>
	koně	<input type="text"/>
	skot	<input type="text"/>
	ovce	<input type="text"/>
	farmaceutický průmysl a výzkum	<input type="text"/>

**Frekvence kontaktu\*:**

	prasata	koně	skot	ovce	malá zvířata
denně	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
několikrát týdně	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
několikrát měsíčně	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
méně	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

\*bráno s ohledem na poslední půlrok výkonu zaměstnání

<b>Lékařský zákrok v posledních 30 dnech:</b>	<input type="text" value="ANO"/>	<input type="text" value="NE"/>
<b>Sdílení domácnosti s pracovníkem ve zdravotnictví:</b>	<input type="text" value="ANO"/>	<input type="text" value="NE"/>

Dotazník byl použit se svolením autorů doc. MUDr. H. Žemličkové Ph.D. a MUDr. M. Fridrichové.

### 9.4. Kultivační a transportní média

- Columbia krevní agar s přídavkem 5% beraní krve (Oxoid<sup>TM</sup>, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Velká Británie)
- MRSA Select<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Česká republika)
- Mueller-Hinton agar (Oxoid<sup>TM</sup>, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Velká Británie)

- Amiesovo transportní médium (Copan Transystem<sup>®</sup>, Copan, Itálie)
- Játrový bujon (LabMediaServis s. r. o., Česká republika)

## 10. Metodika

### 10.1. Bakteriální kmeny

Materiál byl inokulován na Columbia krevní agar s přidavkem 5% beraní krve a na chromogenní agar. Křížovým roztěrem byly získány izolované, dobře odlišitelné kolonie a po 18 hodinách kultivace za aerobních podmínek při teplotě  $36 \pm 1$  °C byl morfologicky identifikován *S. aureus*. Identifikace byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS, Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Meticilin-rezistentní *S. aureus* byl potvrzen růstem na chromogenním agaru v typickém růžovém zbarvení. Verifikace byla provedena stanovením citlivosti k cefoxitinu pomocí diskové difúzní metody. Jako MRSA byly označeny izoláty, které měly velikost inhibiční zóny < 22 mm (91). Nález byl potvrzen detekcí genů *mecA* nebo *mecC* provedením PCR (12). Pro vyšší výtěžnost byl materiál pomnožen v tekutém médiu, použit byl játrový bujon. Po 18 hodinové inkubaci při teplotě  $36 \pm 1$  °C byl znovu inokulován na Columbia krevní agar s přidavkem 5% beraní krve a po 18 hodinách kultivace při teplotě  $36 \pm 1$  °C hodnocen.

### 10.2. Testování citlivosti k antibiotikům

Testování a vyhodnocení minimálních inhibičních koncentrací (MIC, Minimum inhibitory concentration) bylo provedeno bujónovou mikrodiluční metodou (91). Takto byla testována citlivost k penicilinu, oxacilinu, linezolidu, chloramfenikolu, erytromycinu, klindamycinu, tetracyklinu, ciprofloxacinu, trimethoprim/sulfamethoxazolu, gentamicinu a vankomycinu.

### 10.3. Počítačové programy

- Ridom StaphType™ (ver. 2.2.1; Ridom GmbH, Německo)
- BioNumerics (ver. 7.0; Applied Maths, USA)
- NCSS 11 Statistical Software (ver. 2016, NCSS, LLC, USA, [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss))

### 10.4. Přístroje

- Centrifuga Heraeus MEGAFUGE 16 (ThermoFischer Scientific, USA)
- Chladnička 4 °C, Liebherr, Německo
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF MS (Bruker Microflex LTTM, Bruker Daltonics, USA)
- Inkubátor (37 °C) EBI - 118 (ThermoFischer Scientific, USA)
- Horizontální elektroforetická vana se zdrojem, Mini Gel systém Owl B2 (ThermoFischer Scientific, USA)
- UltraBright UV Transiluminátor MLB-21 (MaestroGen, Taiwan)
- Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Německo)
- Mraznička (- 26 °C) LGUex 1500 (Liebherr, Německo)
- Box hlubokomrazicí pultový (- 83 °C) ULTF 320 (Arctico, Dánsko)
- Genetický analyzátor ABI 3500 pro (ThermoFischer Scientific, USA)
- Laboratorní třepačka Vortex 1 (Biosan Ltd., Lotyšsko)
- Denzitometr McFarland DEN-1 (Biosan Ltd., Lotyšsko)
- Laminární box MSC Advantage (ThermoFischer Scientific, USA)
- PCR box (Biosan Ltd., Lotyšsko)

### 10.5. Pomůcky

- Jednorázové inokulační kličky (Dispolab, Česká republika)
- Pipeta Finn timer F1, jednokanálová, multikanálová (ThermoFischer Scientific, USA)
- Laboratorní sklo (odměrné válce, zkumavky, kádinky, skleněné tyčinky)
- Jiné pomůcky (gumové rukavice, plastové zkumavky na vzorky, pinzety, titrační destičky, filtrační papír, mikrozskumavky typu Eppendorf, špičky na pipety apod.)

- Cefoxitin antibiotický disk, 30 µg (Oxoid™, Thermo Scientific™, Velká Británie)

**Tabulka 5. Primery použité v PCR reakcích**

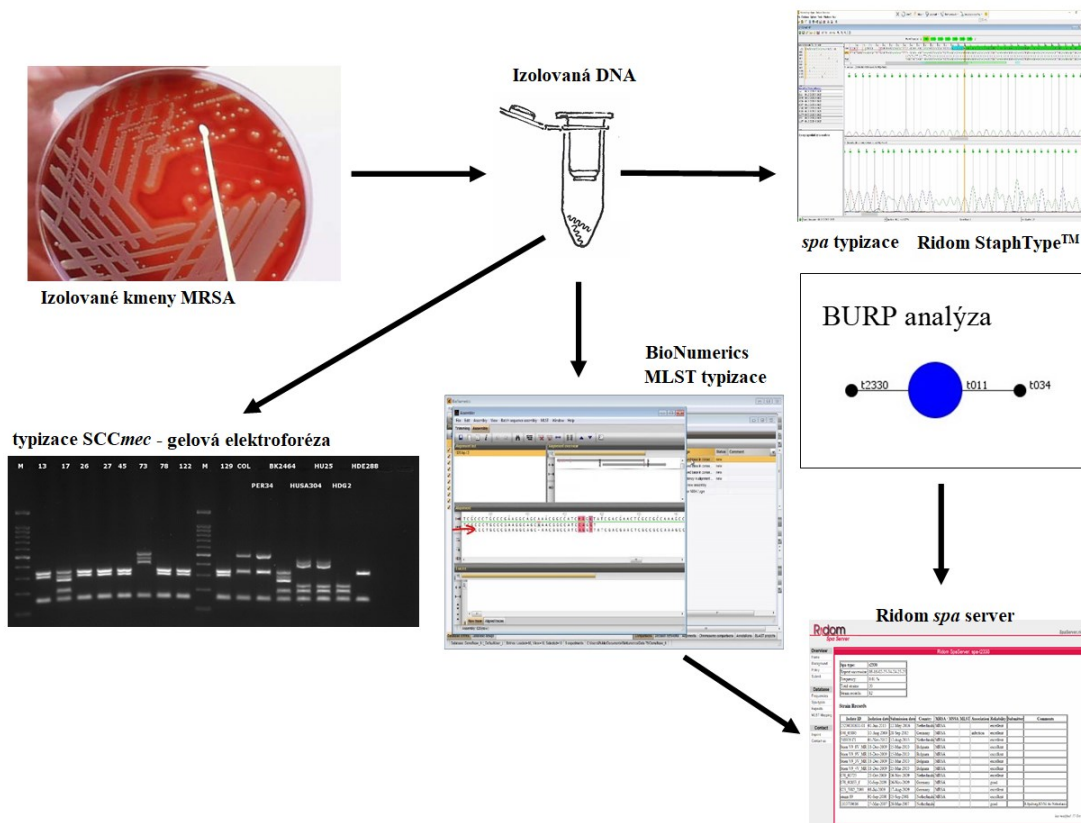
Název primeru	Sekvence	Literatura	
<b>Primery pro <i>spa</i> typizaci</b>			
<i>spa</i> -1113F	5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'	(92)	
<i>spa</i> -1514R	5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'		
<b>Primery pro MLST typizaci</b>			
<i>arcC</i> up	5'-TTGATTCACCAGCGCGTATTG TC-3'		
<i>arcC</i> dn	5'-AGGTATCTGCTTCAATCAGCG-3'		
<i>aroE</i> up	5'-ATCGGAAATCCTATTTACATTC-3'		
<i>aroE</i> dn	5'-ATCGGAAATCCTATTTACATTC-3'		
<i>glpF</i> up	5'-CTAGGAACTGCAATCTTAATCC-3'		
<i>glpF</i> dn	5'-TGGTAAAATCGCATGTCCAATT-3'		
<i>gmk</i> up	5'-ATCGTTTTATCGGGACCATC-3'	(93)	
<i>gmk</i> dn	5'-TCATTAACTACAACGTAATCGTA-3'		
<i>pta</i> up	5'-GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG-3'		
<i>pta</i> dn	5'-GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA-3'		
<i>tpi</i> up	5'-TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA-3'		
<i>tpi</i> dn	5'-TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC-3'		
<i>yqiL</i> up	5'-CAGCATACAGGACACCTATTGGC-3'		
<i>yqiL</i> dn	5'-CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC-3'		
<b>Primery pro detekci genu <i>mec</i></b>			
<i>mecA</i> P4	5'-TCCAGATTACAACCTCACCAGG-3'	(94)	
<i>mecA</i> P7	5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'		
<i>mecC</i> Multi FP	5'-GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3'	(95)	
<i>mecC</i> Multi RP	5'- GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC -3'		
<b>Primery pro SCC<i>mec</i> typizaci</b>			
Název primeru	Sekvence	SCC <i>mec</i> typ	Lit.
CIF2 F2	5'-TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG-3'	I	(94)
CIF2 R2	5'-ATTTACCACAAGGACTACCAGC-3'		

<i>ccrC</i> F2	5'-GTACTCGTTACAATGTTTGG-3'	V	(95)
<i>ccrC</i> R2	5'-GTACTCGTTACAATGTTTGG-3'		
RIF5 F10	5'-TTCTTAAGTACACGCTGAATCG-3'	III	(94)
RIF5 R13	5'-ATGGAGATGAATTACAAGGG-3'		
SCC <i>mec</i> V J1 F	5'-TTCTCCATTCTTGTTTCATCC-3'	V	(95)
SCC <i>mec</i> V J1 R	5'-AGAGACTACTGACTTAAGTGG-3'		
<i>dcs</i> F2	5'-CATCCTATGATAGCTTGGTC-3'	I, II, IV,	(94)
<i>dcs</i> R1	5'-CTAAATCATAGCCATGACCG-3'	VI	
<i>ccrB2</i> F2	5'-AGTTTCTCAGAATTCGAACG-3'	II, IV	(95)
<i>ccrB2</i> R2	5'-CCGATATAGAAWGGGTTAGC-3'		
<i>kdp</i> F1	5'-AATCATCTGCCATTGGTGATGC-3'	II	(94)
<i>kdp</i> R1	5'-AATCATCTGCCATTGGTGATGC-3'		
SCC <i>mec</i> III J1 F	5'-CATTTGTGAAACACAGTACG-3'	III	(95)
SCC <i>mec</i> III J1 R	5'-GTTATTGAGACTCCTAAAGC-3'		
<i>mecI</i> P2	5'-ATCAAGACTTGCATTCAGGC-3'	II, III	(94)
<i>mecI</i> P3	5'-GCGGTTTCAATTCACCTTGTC-3'		

## 10.6. Molekulárně-biologická analýza

Fenotypově potvrzené kmeny MRSA byly genotypizovány. K izolaci DNA byly použity čisté bakteriální kolonie kultivované 18 hodin na Columbia krevním agaru s přidavkem 5% beraní krve při teplotě  $36 \pm 1$  °C. Stafylokoková DNA byla použita ke *spa* typizaci a u výsledného *spa* typu byla následně provedena analýza příbuznosti (BURP, Based upon repeat pattern). Provedena byla multilokusová sekvenční typizace (MLST, Multilocus sequence typing) a typizace SCC*mec*. K vyhodnocení sekvencí byly použity příslušné počítačové programy a webová databáze (Obrázek 9).

**Obrázek 9. Schématické zobrazení molekulárně-biologické analýzy MRSA izolátů**



### 10.6.1. Postup izolace bakteriální DNA

1. Kmen MRSA inkubovat na Columbia krevním agaru 18 hodin při teplotě  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .
2. Přidat 0,5  $\mu\text{l}$  lysostafinu do mikrozkušavky (typ Eppendorf).
3. Přidat 20  $\mu\text{l}$  TE roztoku (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).
4. Dvě bakteriální kolonie rozsuspendovat pomocí kličky v připraveném roztoku.
5. Protřepat.
6. Inkubovat ve vodní lázni při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  15 minut.
7. Denaturovat při  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 minut.
8. Přidat 180  $\mu\text{l}$  vody.
9. Protřepat.
10. Centrifugovat 5 minut, 13 000 otáček/minuta.
11. Templátová DNA je přítomna v supernatantu, 2  $\mu\text{l}$ .

### 10.6.2. *Spa* typizace a BURP analýza

Gen *spa* kóduje protein A, součást buněčné stěny a faktor virulence stafylokoků. Typizace se provádí na základě polymorfismů krátkých repetitivních sekvencí o délce 21 až 27 bp v regionu X tohoto genu. Schématicky je průběh typizace znázorněn na Obrázku 10. Metoda sekvence jednoho genu je technicky jednodušší, méně finančně nákladná a rozlišovací schopnost je vyšší, než v případě MLST. Kromě výzkumu molekulární evoluce je vhodná pro krátkodobé lokální studie epidemií. V rámci jednoho ST typu se může nacházet několik *spa* typů. Jeden *spa*-klonální komplex (*spa*-CC, *spa*-clonal complex) sdružuje příbuzné *spa* typy (96).

*Spa* typizace byla provedena podle dříve publikované metodiky (93). Použity byly primery uvedené v Tabulce 5. Pro analýzu výsledných *spa* typů a seskupení dle příbuznosti do *spa*-CC byl použit software Ridom StaphType™ (ver. 2.2.1; Ridom GmbH, Obrázek 11). K vyhodnocení byla používána webová databáze Ridom *spa* Server (<https://www.spaserver.ridom.de/>, Obrázek 12), kam byly získané výsledky také zaneseny.

#### Postup sekvence genu *spa*

1. Provést první PCR.
2. Přečistit (GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Merck KGaA, Německo).
3. Provést sekvenční PCR (provedeno dvakrát, zvlášť pro primer F a R).
4. Přečistit sekvenční produkt.
5. Sekvence produktu.

Složky reakční směsi	Obsah složek
voda	3 µl
pufř	1 µl
primery (Tabulka 5)	1 µl
Big Dye	2 µl
templátová DNA	3 µl





Obrázek 12. Zpracování dat pomocí webové databáze Ridom *spa* server

The screenshot shows the Ridom SpaServer web interface. At the top, there is a search bar with the text "Search for a spa-type or -repeat:" and a "search" button. Below the search bar, there is a table with the following columns: Spa-type, Repeat succession, MLST, and Comment. The table contains 20 rows of data, each representing a different MRSA strain with its corresponding spa-type, repeat succession, MLST, and a descriptive comment.

Spa-type	Repeat succession	MLST	Comment
#001	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-222, ST-228	CC5, Southern German MRSA (prototype & subclone), Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
#002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-231	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I
#003	26-17-20-17-12-17-17-16	ST-5, ST-225	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
#004	09-02-16-13-13-17-34-16-34	ST-45	CC45, Berlin MRSA (prototype), USA600 ORSA II, USA600 ORSA IV
#005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	ST-22, ST-23, ST-60	
#006	26-23-13-23-31-05-17-25-16-28	ST-134	
#007	15-12-16-16-16-16-02-25-17		
#008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	ST-8, ST-247, ST-250, ST-254	CC8, Northern German MRSA (subclone), USA300 ORSA IV (cMRSA in the US), Archaic Iberian, ST250 ORSA I
#009	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25	ST-254	CC8, Hannover MRSA, EMRSA-10
#010	26-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5	
#011	08-16-02-25-34-24-25		
#012	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24	ST-30	
#013	26-30-17-34-17-20-17-12-17		
#014	26-17-20-17-12-17-17-16		
#015	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34	ST-45	
#016	26-23-13-23-31-05-17-25-16-16-28		
#017	15-12-16-16-02-16-02-25-17-24-24		
#018	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24	ST-30, ST-36, ST-38	CC30, prototype of ST-36, EMRSA-16, USA200 ORSA II
#019	08-16-02-16-02-25-17-24	ST-30	
#020	26-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28		

Zdroj: <https://www.spaserver.ridom.de/>.

### 10.6.3. Multilokusová sekvenční typizace

Metoda je obecně založená na sekvenci sedmi genů (97). U MRSA se používají následující geny:

- *arcC* (karbamát kináza, Carbamate kinase)
- *aroE* (shikimát dehydrogenáza, Shikimate dehydrogenase)
- *glpF* (glycerol kináza, Glycerol kinase)
- *gmk* (guanylát kináza, Guanylate kinase)
- *pta* (fosfát acetyltransferáza, Phosphate acetyltransferase)
- *tpi* (triózafosfát izomeráza, Triosephosphate isomerase)
- *yqiL* (acetyl-koenzym A acetyltransferáza, Acetyl coenzyme A acetyltrasferase)

Srovnáním sekvencí s databází známých alel vznikne konkrétní alelický profil (ST, sekvenční typ, Sequence type), přesně definující daný izolát. Přes náročnost provedení metody a související náklady jsou poskytované výsledky srovnatelné s výsledky získanými referenční *SmaI* makrorestrikční analýzou. Metoda se liší se nižší rozlišovací schopností ale lepší reprodukovatelností (98). Díky možnosti seskupování izolátů do klonálních komplexů (CC, Clonal complex), lze sledovat jejich evoluční vztahy v dlouhodobých globálních studiích, analýza tedy umožňuje sledovat změny sekvencí v reálném čase.

Multilokusová sekvenční typizace byla provedena dle dříve publikované metodiky (95). Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 5. Alelické profily a výsledné ST byly zpracovány pomocí softwaru BioNumerics (ver. 7.0; Applied Maths). Takto získané ST byly použity k odvození příslušných klonálních komplexů.

Postup MLST:

1. Provést PCR.
2. Kontrola produktu, vizualizace gelovou elektroforézou.
3. Přečištění (GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Merck KGaA, Německo).
4. Provést PCR.
5. Přečistit produkt.
6. Sekvenace produktu.

#### 10.6.4. PCR detekce genu *mec* a SCC*mec* typizace

Detekce genu *mecA* a *mecC* (*mecA*<sub>LG251</sub>) byla provedena podle metodik publikovaných dříve (94, 11). Primery jsou uvedeny v Tabulce 5.

Typy SCC*mec* byly identifikovány pomocí multiplexní PCR založené na identifikaci specifických genů, jak bylo publikováno (95). Produkt byl nanesen do 1,5% agarózového gelu a byla provedena elektroforéza (stejnoseměrný proud o napětí 120 V po dobu 40 minut). Po proběhnutí elektroforézy byl agarózový gel obarven v roztoku ethidium bromidu a produkt byl detekován v transluminátoru.

## Složky reakční směsi PCR pro typizaci SCCmec

Složky reakční směsi	Obsah složek
master mix Quiagen	12,5 µl
primery (Tabulka 5)	0,5 µl
voda	0,5 µl
templátová DNA	2,0 µl

### 10.7. Nomenklatura MRSA

Nomenklatura použitá v této práci vychází z dohody podvýboru Mezinárodní unie mikrobiologických společností (IUMS, International Union of Microbiology Societies) v Tokiu v roce 2002, která navazuje na proběhlou celosvětovou evoluční studii (17). Klony MRSA jsou pojmenovány podle fenotypu rezistence (MRSA), ST typu, *spa* typu a typu SCCmec (vyjádřeným římskou číslicí).

### 10.8. Statistická analýza

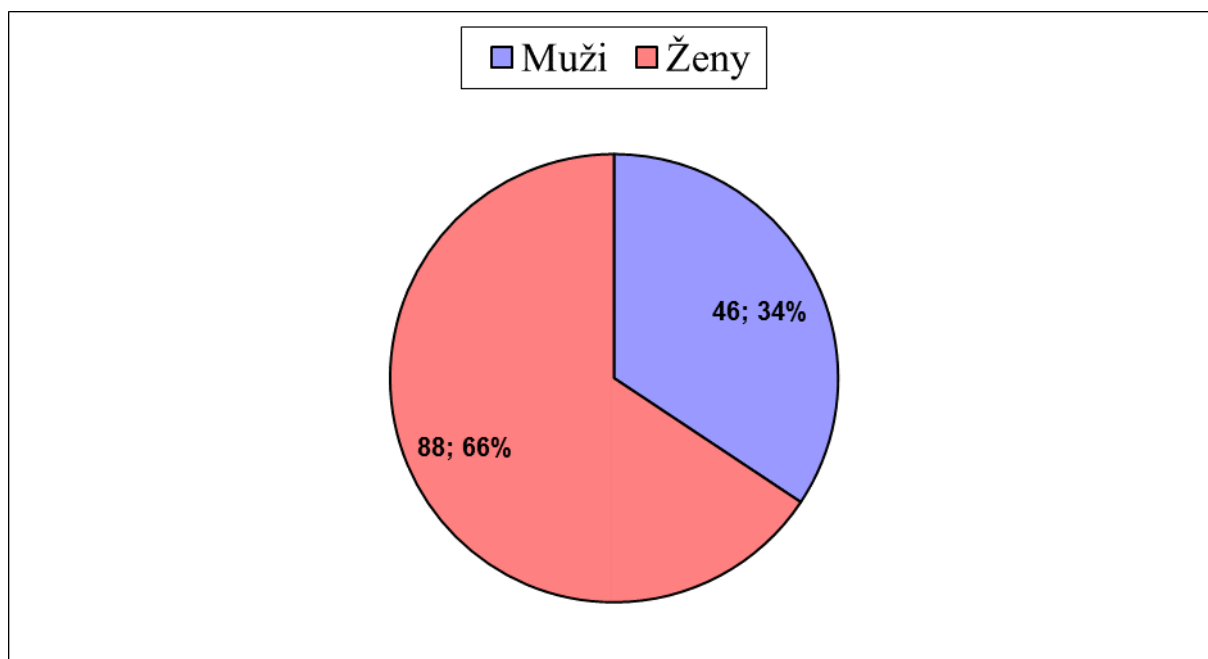
Statistická analýza (Confidence interval, Fisherův test) byla provedena pomocí NCSS 11 Statistical Software (ver. 2016, NCSS, LLC., USA, [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss)).

## 11. Výsledky

### 11.1. Základní charakteristika souboru

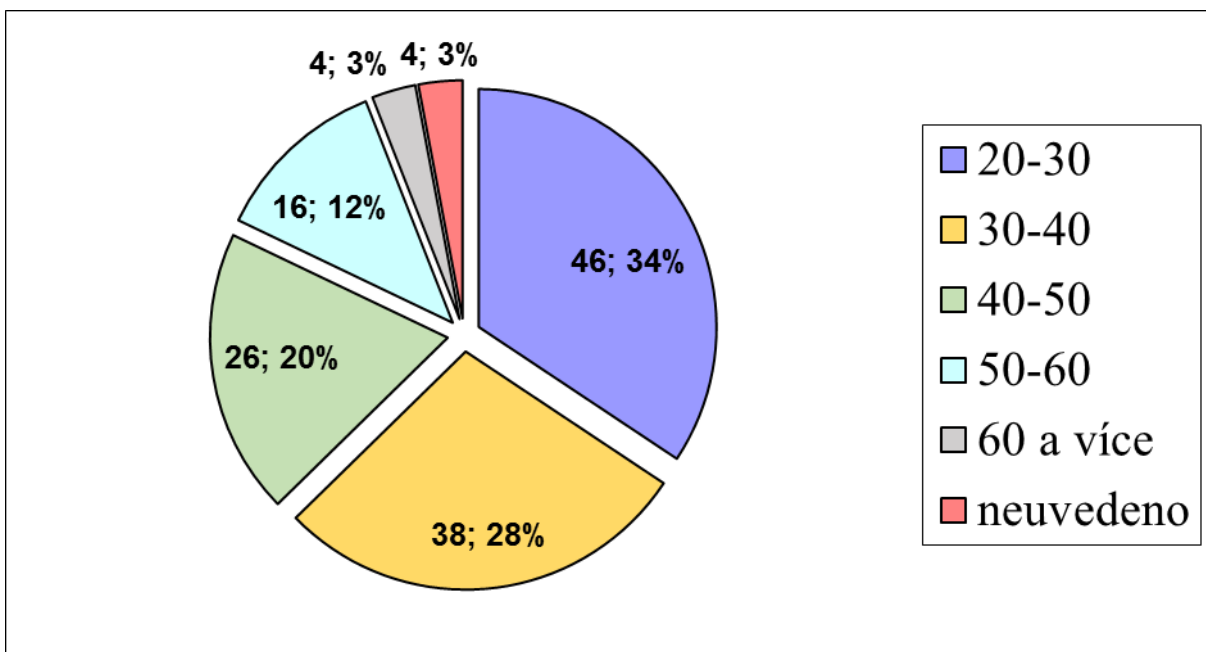
Z nehomogenního souboru 134 dobrovolníků, kteří souhlasili s odběrem stěru z nosní sliznice, bylo 88,8 % (119/134) aktivně praktikujících veterinářů, 4,4 % (6/134) byli farmaceuti/výzkumní pracovníci ve veterinárním lékařství a 3,7 % (5/134) byli studenti veterinárních škol, 3,1 % (4/134) zaměstnání nevedli (Tabulka 6, strana 48). Všichni udávali pravidelný kontakt se zvířaty. V souboru bylo zastoupeno více žen (66 %, 88/134), než mužů (34 %, 46/134; Graf 3, Tabulka 6, strana 48).

**Graf 3. Pohlaví dotazovaných dobrovolníků**



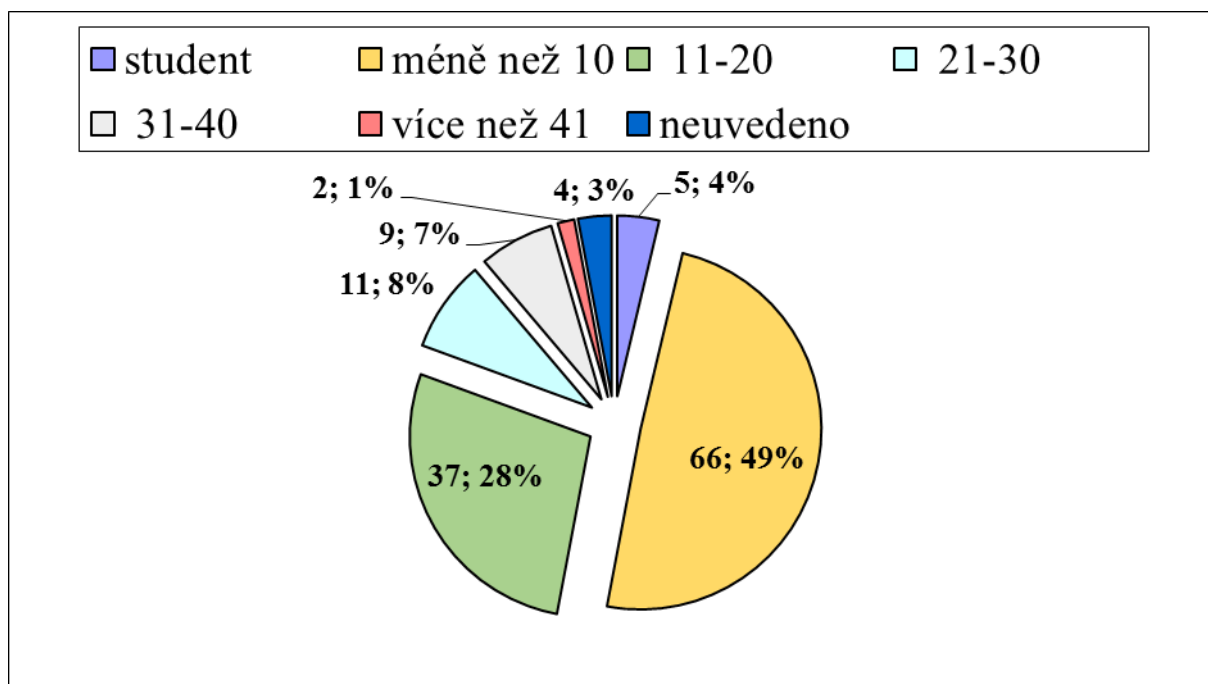
Mezi účastníky byly zastoupeny různé věkové skupiny, od 22 do 69 let (medián 35,5 let; průměrný věk 37,6 let; Graf 4, Tabulka 6, strana 48).

**Graf 4. Věk dotazovaných dobrovolníků (v letech)**



Mezi dobrovolníky byli jak začínající absolventi vysoké školy, tak veterináři s mnohaletou zkušeností, průměrně uváděli délku vykonávání praxe 10 let (Graf 5, Tabulka 6).

**Graf 5. Délka aktivní veterinární praxe (v letech)**



Převaha testovaných účastníků pracovala v České republice (87 %, 117/134), konkrétně v Jihomoravském kraji (20 %, 26/134). Pouze 5 % (7/134) veterinářů uvedlo jako místo práce Královéhradecký kraj. Patnáct tázaných místo zaměstnání neuvedlo (11 %, 15/134), dva (2 %, 2/134) pracovali v zahraničí (Slovenská republika, Belgie). Podrobně místo praxe ukazuje Obrázek 13 a Tabulka 6, strana 48.

**Obrázek 13. Místo vykonávání práce**



S ohledem na typ praxe, 57 % (76/134) dotazovaných pracovalo hlavně s malými zvířaty, 42,3 % (57/134) ve smíšené praxi a pouze 0,7 % (1/134) ošetřovalo výlučně velká hospodářská zvířata (Tabulka 6).

Kontakt s malými zvířaty udávala většina dobrovolníků, kteří na tuto otázku v dotazníku odpověděli. Jako frekventní zde byl považován kontakt denně nebo několikrát v týdnu, kontakt méně častý má pro přenos MRSA zanedbatelný význam. Většina dotazovaných (84,3 %, 113/130) uvedla denní kontakt s malými zvířaty, styk několikrát týdně pak potvrdilo 12 % (9/130) z nich. Denně pracovalo se skotem 8 % (6/130), s prasaty 0,7 % (1/130), s ovci 3 % (4/130) a s koňmi 5,3 % (7/130) veterinárních pracovníků. Několikrát týdně měli kontakt se skotem 3 % (4/130), s prasaty 1,5 % (2/130), s ovci 3,8 % (5/130) a s koňmi 6,7 % (9/130) veterinářů. Získané údaje shrnuje Tabulka 6.

Doplňující anamnestické údaje o sdílení domácnosti se zdravotnickým pracovníkem nebo o hospitalizaci v posledních 30 dnech měly pomoci vyloučit nemocniční původ zachycených nosičských kmenů MRSA. Pobyt v nemocničním zařízení potvrdilo 10 dotazovaných (7,4 %, 10/134), z nichž jeden udával hospitalizaci před 3 měsíci a byl kolonizovaný zvířecím typem MRSA (kmenem V26). Domácnost se zdravotnickým pracovníkem sdílelo 16,4 % (22/134), dva z nich byli potvrzeni jako nosiči LA-MRSA (kmeny V45 a V129). Naopak u kmene V17, který odpovídal charakteristikám typických nemocničních MRSA, nebyla žádná vazba na nozokomiální prostředí prokázána (Tabulka 6).

**Tabulka 6. Základní charakteristika 134 dobrovolníků.**

Typ vykonávané praxe		Počet			
Malá zvířata		76	57,0 %		
Hospodářská zvířata		1	0,7 %		
Smíšená veterinární praxe		57	42,3 %		
Četnost kontaktu se zvířaty	Denně	Týdně	Měsíčně	Méně	Celkem
Malá zvířata	113,0	12,0	5,0	22,0	130,0
	84,3 %	9,0 %	3,7 %	16,4 %	97,0 %
Skot	8,0	4,0	9,0	19,0	21,0
	6,0 %	3,0 %	6,7 %	14,2 %	15,7 %
Prasata	1,0	2,0	3,0	16,0	6,0
	0,7 %	1,5 %	2,2 %	11,9 %	4,4 %



<b>Ovce</b>	4,0	5,0	7,0	21,0	16,0
	3,0 %	3,8 %	5,2 %	15,7 %	12,0 %
<b>Koně</b>	7,0	9,0	10,0	1,0	26,0
	5,3 %	6,7 %	7,4 %	0,8 %	19,4 %
<b>Věkový medián v letech (rozmezí)</b>			35,5 (22-69)		
<b>Průměrná doba praxe v letech (rozmezí)</b>			10 (1-45)		
<b>Pracovní pozice</b>			<b>Počet</b>		
<b>Veterinář</b>			119 88,8 %		
<b>farmaceut/výzkumný prac.</b>			6 4,4 %		
<b>Student</b>			5 3,7 %		
<b>Neuvedeno</b>			4 3,1 %		
<b>Místo vykonávání práce</b>			<b>Počet</b>		
<b>Česká republika</b>			117 87 %		
<b>Slovenská republika</b>			1 1 %		
<b>Belgie</b>			1 1 %		
<b>Neuvedeno</b>			15 11 %		
<b>Anamnéza hospitalizace v posledních 30 dnech</b>			<b>Počet</b>		
<b>Ano</b>			10 7,4 %		
<b>Ne</b>			124 92,6 %		
<b>Společná domácnost s pracovníkem ve zdravotnictví</b>			<b>Počet</b>		
<b>Ano</b>			22 16,4 %		
<b>Ne</b>			112 83,6 %		

## 11.2. Výsledky kultivačního vyšetření

Předpokládaným kultivačním nálezem byl průkaz běžné flóry kolonizující nosní sliznici. V horních dýchacích cestách ji tvoří zejména koaguláza negativní stafylokoky, zástupci *Corynebacterium* spp., *Nisseria* spp., viridující streptokoky a vzácně koliformní mikrobi. Negativní kultivační nález byl u 3,73 % (5/134) vzorků.

Nosičství *Staphylococcus intermedius/pseudintermedius* (*S. intermedius/pseudintemedius*), bylo identifikováno v 1,5 % (2/134) případů. Jedná se o běžného komenzála i patogena u psů a koček. Spolehlivé odlišení obou druhů je možné jen použitím genetických metod a nebylo předmětem této práce (99). *S. aureus* byl potvrzen ve 29,9 % (40/134) vzorků, z nichž se v 22,5 % (9/40) případů jednalo o kmeny MRSA. Celková prevalence nosičství MRSA u veterinářů byla stanovena na 6,7 %. Všechny kmeny MRSA byly zachyceny již během primokultivace.

### 11.3. Výsledky fenotypového vyšetření citlivosti k antibiotikům

Výsledek diskového difúzního testu pro cefoxitin 30 µg ukazuje Tabulka 8. V souladu s daným *spa* typem a *SCCmec* typem, vykazovaly kmeny typický profil rezistence k antibiotikům. Všechny kmeny MRSA byly rezistentní k penicilinu a citlivé k vankomycinu a linezolidu. Kromě *spa* t003 byly všechny izoláty rezistentní k tetracyklinu. Kmeny t011, t2330 byly navíc rezistentní vůči gentamicinu a ciprofloxacinu a t034 byl rezistentní k erytromycinu a klindamycinu. Nemocniční kmen *spa* t003 vykazoval rezistenci k erytromycinu, klindamycinu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu, gentamicinu a trimethoprim/sulfamethoxazolu. Hodnoty MIC testovaných antibiotik uvádí Tabulka 7, výsledky shrnuje Tabulka 10, strana 55.

**Tabulka 7. Hodnoty MIC testovaných antibiotik v mg/l**

	Breakpoint <sup>*)</sup>		V13	V26	V17	V45	V27
	C ≤	R >					
<b>PEN</b>	C ≤ 0,125	R > 0,125	4	2	4	2	2
<b>CXT</b>	**)	**)	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
<b>ERY</b>	C ≤ 1	R > 2	0,25	0,25	> 8	0,25	0,25
<b>CLI</b>	C ≤ 0,25	R > 0,5	0,06	0,12	> 4	0,06	0,06
<b>LNZ</b>	C ≤ 4	R > 4	2	2	1	2	2
<b>CMP</b>	C ≤ 8	R > 8	4	8	16	8	8
<b>TET</b>	C ≤ 1	R > 2	> 8	> 8	≤ 1	> 8	> 8
<b>CIP</b>	C ≤ 1	R > 1	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8
<b>SXT</b>	C ≤ 2	R > 4	0,125	0,125	> 4	0,125	0,125
<b>GEN</b>	C ≤ 1	R > 1	> 16	> 16	4	16	> 16

	C ≤ 2	R > 2	1	1	1	1	1
<b>VAN</b>	C ≤ 2	R > 2	1	1	1	1	1
	Breakpoint *)		V78	V73	V129	V122	
<b>PEN</b>	C ≤ 0,125	R > 0,125	2	> 4	2	2	
<b>CXT</b>	**)	**)	> 16	> 16	> 16	> 16	
<b>ERY</b>	C ≤ 1	R > 2	0,25	> 8	0,25	0,25	
<b>CLI</b>	C ≤ 0,25	R > 0,5	0,12	> 4	0,06	0,12	
<b>LNZ</b>	C ≤ 4	R > 4	2	1	1	2	
<b>CMP</b>	C ≤ 8	R > 8	4	4	4	8	
<b>TET</b>	C ≤ 1	R > 2	> 8	> 8	> 8	> 8	
<b>CIP</b>	C ≤ 1	R > 1	> 8	0,25	> 8	> 8	
<b>SXT</b>	C ≤ 2	R > 4	0,125	0,125	0,125	0,125	
<b>GEN</b>	C ≤ 1	R > 1	> 16	0,25	> 16	> 16	
<b>VAN</b>	C ≤ 2	R > 2	1	1	1	1	

\*) Hodnocení bylo provedeno dle breakpointů stanovených EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7. 1. 2017. Dostupné z: <http://www.eucast.org>.

\*\*) *S. aureus* s hodnotami MIC cefoxitinu > 4 mg/l je rezistentní k meticilinu, spolehlivěji rezistenci detekuje diskový difúzní test s cefoxitinem (30 µg). Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. J Clin Microbiol. 2009;47(1):217–9.

V13, V17, V26, V27, V45, V73, V78, V122, V129 - laboratorní označení testovaných kmenů MRSA

PEN - penicilin, CXT - cefoxitin, TET - tetracyklin, GEN - gentamicin, CIP - ciprofloxacin, ERY - erytromycin (výsledek erytromycinu platí i pro ostatní makrolidy), CLI - klindamycin, LNZ - linezolid, CMP - chloramfenikol, SXT - kotrimoxazol, trimethoprim/sulfamethoxazol, VAN - vankomycin

C - citlivý, R - rezistentní

### Tabulka 8. Výsledky diskového difúzního testu pro cefoxitin 30 µg

Výsledky měření jsou uvedeny v milimetrech. Breakpoint je C ≤ 25 R > 25 \*).

Kmen	V13	V26	V17	V45	V27	V78	V73	V129	V122
CXT	10	6	6	6	6	10	6	14	12

V13, V17, V26, V27, V45, V73, V78, V122, V129 - laboratorní označení testovaných kmenů MRSA

CXT - cefoxitin

\*) Hodnocení bylo provedeno dle breakpointů stanovených EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7. 1. 2017. Dostupné z: <http://www.eucast.org>.

#### 11.4. Molekulárně-biologická analýza

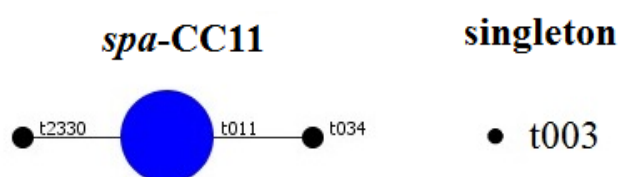
Devět kmenů MRSA bylo charakterizováno sekvenčním typem (ST), *spa* typem (t) a typem *SCCmec*. Náležely do pěti genotypů, včetně ST398-t011-IV (n = 5), ST398-t2330-V (n = 1), ST398-t034-V (n = 1), ST225-t003-II (n = 1) a ST4894-t011-IV (n = 1).

##### 11.4.1. Výsledek *spa* typizace a BURP analýzy

Izoláty MRSA byly klasifikovány do 4 různých *spa* typů. Tři z nich (t003, t2330 a t034) byly zastoupeny pouze po jediném izolátu, ale většina kmenů (67 %, 6/9) náležela k *spa* typu t011 (Tabulka 10, strana 55).

Podle výsledných *spa* typů byla provedena analýza klonální příbuznosti (BURP). *Spa* typ t011 byl určen jako zakladatel *spa*-klonálního komplexu *spa*-CC11. *Spa* t2330 a t034 patřily do stejného, výše uvedeného *spa*-klonálního komplexu, zatímco v případě *spa* t003 se jednalo o singleton. Schématické znázornění příbuznosti *spa* typů ukazuje Obrázek 14.

**Obrázek 14. Grafický výsledek analýzy příbuznosti pomocí algoritmu BURP**



#### 11.4.2. Výsledek multilokusové sekvenční typizace

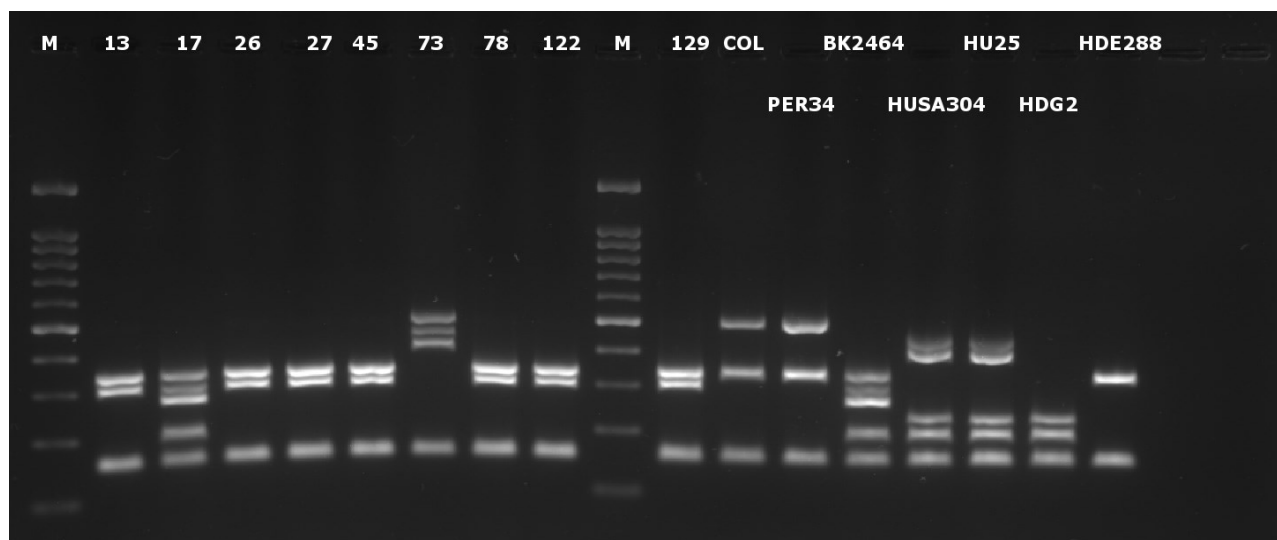
Většina typizovaných izolátů náležela do CC398, který byl reprezentován ST398 (78 %, 7/9) a ST4894 (11 %, 1/9). ST225 náležící do CC5 byl zachycen v jednom případě (11 %, 1/9). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10, strana 55.

#### 11.4.3. Výsledky detekce genu *mec* a SCC*mec* typizace

U všech izolátů MRSA byl prokázán gen *mecA*, jak ukazuje Tabulka 10, strana 55. Amplifikovaný fragment *mecA* vizualizovaný gelovou elektroforézou měl velikost 162 bp (fragment genu *mecC* by měl velikost 138 bp).

Prokázány byly tři typy SCC*mec*, většina izolátů nesla typ IV (78%, 7/9), po jednom izolátu byl stanoven typ II a V (1%, 1/9). Výsledné SCC*mec* typy ukazuje Tabulka 10, strana 55 a Obrázek 15. Tabulka 9 ukazuje hodnocení SCC*mec* typizace a kontrol.

Obrázek 15. Výsledek typizace SCC*mec* vizualizovaný gelovou elektroforézou



M – marker

Čísla 13, 17, 26, 27, 45, 73, 78, 122, 129 - laboratorní označení testovaných kmenů MRSA

COL, PER34, BK2464, HUSA304, HU25, HDG2, HDE288 - označení kontrolních kmenů

**Tabulka 9. Hodnocení SCCmec typizace a kontrol**

SCCmec typ	band (bp)	celkový počet bandů
<b>I</b>	CIF2 (495), <i>dcs</i> (342), <i>mecA</i> (162)	3
<b>II</b>	<i>dcs</i> (342), <i>ccrB2</i> (311), <i>kdp</i> (284), <i>mecI</i> (209), <i>mecA</i> (162)	5
<b>III</b>	RIF5 (414), SCCmecIIIJ1 (243), <i>mecI</i> (209), <i>mecA</i> (162)	4
<b>IV a, b, c, d, g, h</b>	<i>dcs</i> (342), <i>ccrB2</i> (311), <i>mecA</i> (162)	3
<b>IV e, f</b>	<i>ccrB2</i> (311), <i>mecA</i> (162)	2
<b>V</b>	<i>ccrC</i> (449), SCCmecVJ1 (377), <i>mecA</i> (162)	3
<b>VI</b>	<i>dcs</i> (342), <i>mecA</i> (162)	2

Pozitivní kontrola	COL	PER34	BK2464	HUSA304	HU25	HDG2	HDE288
SCCmec typ	I	Ia	II	III	IIIa	IIIb	VI

CIF2, *dcs*, *mecA*, *ccrB2*, *kdp*, *mecI*, RIF5, SCCmecIII J1 – použité primery

COL, PER34, BK2464, HUSA304, HU25, HDG2, HDE288 – označení kontrolních kmenů

Upraveno podle Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: „SCCmec IV multiplex". J Antimicrob Chemother. 2007;60(1):42–8.

**Tabulka 10. Charakteristika kmenů MRSA.**

<b>kmen MRSA</b>	<b>V13</b>	<b>V26</b>	<b>V27</b>	<b>V45</b>	<b>V73#</b>	<b>V122</b>	<b>V129</b>	<b>V78</b>	<b>V17</b>
<b>CC</b>	CC398								CC5
<b>MLST typ</b>	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST4894	ST225
<b>Alelický profil*)</b>	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-19-2- 20-26-39	3-35-1-2- 20-26-39	1-4-1-4-12- 25-10
<b>spa typ</b>	t011	t2330	t011	t011	t034	t011	t011	t011	t003
<b>Repetice</b>	08-16-02- 25-34-24- 25	08-16-02- 25-34-24- 25-25	08-16-02- 25-34-24- 25	08-16-02-25- 34-24-25	08-16-02-25- 02-25-34-24- 25	08-16-02- 25-34-24-25	08-16-02-25- 34-24-25	08-16-02- 25-34-24- 25	26-17-20-17- 12-17-17-16
<b>Spa-CC</b>	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	<i>spa</i> -CC11	singleton
<b>mec</b>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>
<b>SCCmec typ</b>	IV	IV	IV	IV	V	IV	IV	IV	II
<b>Profil antibiotické rezistence</b>	CXT, TET, GEN, CIP, SXT	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, ERY, TET, CLI, TET	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, TET, GEN, CIP	CXT, ERY, CLI, CIP, CMP, GEN, STX

<b>Rizikové faktory</b>	žádný	Hospit. (před 3 měsíci)	žádný	Denní kontakt se zdr. pracovníkem	žádný	Kontakt s MRSA pozitivním zvířetem (před týdnem)	Denní kontakt se zdr. pracovníkem	žádný	žádný
-------------------------	-------	-------------------------	-------	-----------------------------------	-------	--	-----------------------------------	-------	-------

V13, V17, V26, V27, V45, V73, V78, V122, V129 - laboratorní označení testovaných kmenů MRSA

CXT - cefoxitin, TET - tetracyklin, GEN - gentamicin, CIP - ciprofloxacin, ERY - erytromycin, CLI - klindamycin, CMP - chloramfenikol, SXT - kotrimoxazol, trimethoprim/sulfamethoxazol

CC - klonální komplex, *spa*-CC - *spa*-klonální komplex

<sup>\*)</sup> fragmenty sedmi genů: *arcC* (karbamát kináza), *aroE* (shikimát dehydrogenáza), *glpF* (glycerol kináza), *gmk* (guanylát kináza), *pta* (fosfát acetyltransferáza), *tpi* (triózafosfát izomeráza) a *yqiL* (acetyl koenzym A acetyltransferáza)

<sup>#)</sup> kmen od veterináře, který pracuje na Slovensku



## 12. Diskuze

Osoby kolonizované MRSA mají prokazatelně vyšší riziko rozvoje infekce (100). Takové infekce jsou endogenního původu, bakterie pronikne za vhodných podmínek kůží nebo sliznicemi (např. po chirurgických zákrocích). Molekulárně genetické studie podporují shodu mezi izoláty z nosní sliznice od asymptomatických nosičů s izoláty, které následně způsobily infekci u příslušného pacienta (101).

Vyšší prevalence nosičství MRSA u veterinárního personálu byla prokázána mnoha studii po celém světě. V Evropě se, dle geografické závislosti, pohybuje od 0,7 % (102) do 45 % (40). Tradiční údaje o vysoké prevalenci pocházejí ze zemí s rozvinutou živočišnou výrobou, jako je 45 % v Německu (40), 43,8 % v Nizozemí (103) a 12,5% v Dánsku (104). Druh veterinární praxe, míra živočišné výroby, frekvence kontaktu se zvířaty, doba expozice i samotný design studie jsou faktory vedoucí k rozdílům prevalence na mezinárodní úrovni. Příklady jsou uvedeny v Tabulce 11. Za nejvíce rizikový je ale všeobecně považován kontakt s prasaty, jak se shoduje většina prací. O situaci v České republice chybí aktuální údaje. První zmínku uvádí dánská studie z roku 2007, která sledovala nosičství u veterinářů účastnících se konference zaměřené na chov prasat. Mezi testovanými účastníky bylo i 5 dobrovolníků z České republiky, jejich výsledky byly ale MRSA negativní (104). Studie podobného designu provedená přímo v České republice v roce 2008 odhalila 0,7 % (2/280) kolonizaci veterinárního personálu (102). Zachycené kmeny ale nebyly LA-MRSA a prevalence nosičství odpovídala očekávané prevalenci ve zdravé populaci bez rizikových faktorů (105). V evropských podmínkách se nosičství CA-MRSA pohybuje kolem 1 %, resp. v Německu 0,7-1,3 % (106, 107), ve Velké Británii 1,9 % (108), ve Francii 1,02 % (30) a v Itálii 0,12 % (109). CA-MRSA je nově se objevujícím patogenem i ve veterinárním lékařství, o čemž svědčí například dokumentovaný přenos mezi prasaty a farmáři (110).

Podle výsledků aktuální práce byla prevalence nosičství MRSA u pracovníků ve veterinárním lékařství 6,7 % [9/134, 95 % interval spolehlivosti (CI) (3,12, 12,37)]. Typické komunitní kmeny nebyly u zdravých dobrovolníků v této práci detekovány.

**Tabulka 11. Přehled evropských dat týkajících se prevalence nosičství MRSA u veterinárních pracovníků v letech 2006-2015**

<b>Zaměření</b>	<b>Rok studie</b>	<b>Země</b>	<b>Počet nosičů MRSA / počet účastníků studie</b>		<b>Lit.</b>
<b>malá zvířata</b>	2006	Velká Británie	14/ 88	16 %	(111)
<b>účastník konference (smíšená)</b>	2006	Nizozemí	7/179	3,9 %	(112)
<b>účastník konference (prasata)</b>	2006/7	Dánsko	34/272	12,5 %	(104)
<b>účastník konference (smíšená)</b>	2006/7	Dánsko	11/702	3,9 %	(113)
<b>účastník konference (smíšená)</b>	2008	Česká republika	2/280	0,7 %	(102)
<b>prasata</b>	2009	Německo	22/ 49	45,0 %	(40)
<b>prasata, dobytek</b>	2008/9	Nizozemí	60/137	43,8 %	(103)
<b>účastník konference</b>	2008/9	Německo	45/225	20,0 %	
<b>účastník konference (malá zvířata)</b>	2010	Itálie	2/128	1,6 %	(114)
<b>účastník konference (smíšená)</b>	2010	Švýcarsko	14/340	3,8 %	(115)
<b>účastník konference (dobytek)</b>	2011	Velká Británie	8/307	2,6 %	(116)
<b>prasata</b>	2014	Nizozemí	40/135	29,6 %	(117)
<b>koně</b>	2015	Německo	67/349	19,2 %	(118)

Upraveno podle Goerge T, Lorenz MB, van Alen S, Hübner N-, Becker K, Köck R. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. Vet Microbiol. 2017;200:6–12.

Tato práce mezi českými veterinárními pracovníky potvrdila dominanci typicky evropského zvířecího MRSA CC398, který byl reprezentovaný ve většině případů ST398 (78 %, 7/9). V jednom případě byl zachycen příbuzný ST4894, jednolokusová varianta (SLV, Single locus variant), který také náleží k CC398. Ojedinele zachycený CC5/ST225 patří svým

molekulárně genetickým profilem k typickým nozokomiálním liniím, které nyní cirkulují v nemocnicích v České republice. Jsou hlášeny také ze sousedních států, jako je Německo nebo Polsko (21).

Nejběžnějším ST vyskytujícím se u hospodářských zvířat v Evropě je právě ST398. Kolonizace nebo infekce byly popsány u většiny hospodářských zvířat, jako jsou prasata (119), skot (120), ovce (121), koně (122) nebo drůbež (42). Přenos ze zvířete na člověka a z člověka na zvíře byl dobře dokumentován (51). Následuje většinou po dlouhodobém, opakovaném a úzkém kontaktu s kolonizovaným zvířetem (38) nebo prostřednictvím kontaminovaného vehikula, kterým je maso (123) nebo mléčné výrobky (124). Aby bylo možné monitorovat a bránit kontaminaci potravního řetězce, je nutné porozumět zdrojům a dynamice přenosu.

Několik studií se zabývalo přítomností MRSA u prasat, koz, krav a ovcí, jejich masa a mléčných výrobků v České republice. Meticilin-rezistentní *S. aureus* byl detekován v 1,6 % (23/1427) v kravském mléku (125). Obdobný nález potvrdila i jiná studie, kdy MRSA pozitivní mléko (1,6 %, 2/120) pocházelo od dvou krav z jednoho stáda s příznaky mastitidy (126). Ojedinele byla MRSA nalezena v mléku kozím (1,3%, 1/76), zároveň byly na stejných farmách provedeny stěry z krku a nosní sliznice chovatelů zvířat (v celkovém počtu 18 stěrů). Pozitivním nosičem MRSA byl pouze jeden farmář ze stejné kozí farmy, kde byla MRSA prokázána i v kozím mléce. Stěry (celkem 81 výtěrů z nosní sliznice) zvířat ze stejných farem MRSA neprokázaly (125). Přítomnost MRSA na kozí farmě prokázala i studie z roku 2016, kdy byla zachycena u třech zvířat (ve stěru z nosní sliznice a rekta 3 %, 3/90) i u dvou osob ošetřovatelského personálu. MRSA zde byl nalezen ve vzorcích z prostředí (20 %, 3/15). Všechny zde zachycené MRSA kmeny obsahovaly *mecA*, všechny byly také rezistentní k tetracyklinu a náležely k ST398. Takové výsledky nasvědčují možnému přenosu kmenů MRSA mezi zvířaty, prostředím a chovateli (127). Rizikový je zejména styk se zvířaty s projevem infekce, například s mastitidou (128).

Kmeny izolované z prasat a vepřového masa v České republice patřily také k ST398, zatímco kmeny získané od skotu náležely k více sekvenčním typům. Nejčastěji detekovanými *spa* typy byly t011 a t034 (129). Vzorky z různých českých prasečích farem, jatek i tržní sítě byly testovány i v letech 2013-2015, kdy bylo zachyceno 51 kmenů MRSA (celkem 890 vzorků). Většina náležela k CC398 (92,2 %, 47/51), 4 izoláty (7,8 %, 4/51) byly non-CC398 (130). Uvedené studie jsou důkazem, že CC398 cirkuluje v českých hospodářských chovech, odkud kontaminuje potraviny živočišného původu. Může tak být zdrojem LA-MRSA pro chovatele zvířat, veterináře i konzumenty. Nicméně situace v České republice je

dobře monitorována a postižení chovů není tak masivní, jak je hlášeno ze sousedních evropských států. V zemědělství České republiky také netvoří živočišná výroba tak významnou položku, jako je tomu např. v sousedním Německu. Srovnání živočišné výroby obou zemí uvádí Tabulka 12.

**Tabulka 12. Živočišná výroba v České republice a v Německu za rok 2019**

Rok	Počty prasat	Počty skotu	Počty ovcí	Počty koní
<b>Česká republika</b>	1 544 084	1 418 106	213 068	36 908
<b>Německo</b>	25 900 000	11 600 000	1 559 000	nezjištěno

Podle výsledků Českého statistického úřadu (<https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-hospodarskych-zvirat-k-1-4-2019>) a DESTATIS. Statistisches bundesamt 2019 ([https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/_inhalt.html)).

Enviromentální faktory, zejména prach, hrají také významnou roli v přenosu MRSA. Bylo zjištěno, že LA-MRSA dobře přežívá v zemědělském prachu 5 dní. V závislosti na počáteční koncentraci ho tam lze nalézt až po dobu několika týdnů (131). Přítomnost LA-MRSA v prachu pocházejícím z prasečích farem napříč Českou republikou bylo potvrzeno studií provedenou v roce 2008. Pět pozitivních vzorků (1,8 %, 5/283) náleželo k několika různým genotypům (ST398-t034-V, ST398-t2346-V, ST398-t4659-V a ST398-t2346-IV). Asociace s pohybem zvířat nebo osob mezi jednotlivými chovnými zařízeními ale nemohla být spolehlivě potvrzena (132).

Nosičské kmeny získané od veterinářů testovaných v této studii náležely ke *spa* typům t011, t034 a t2330. První dva patří mezi nejčastější *spa* typy prokázané u zvířat a živočišných produktů v České republice (129). *Spa* t034 byl detekován od veterinářky pracující ve smíšené veterinární praxi na Slovensku. Tento *spa* typ byl dokumentován v roce 2014 jako dominující u prasat pocházejících ze Slovenska (133). V Evropě je všeobecně dokumentována spíše prevalence *spa* typů t108 a t567 (134), ty ale nebyly u veterinářů v naší studii prokázány.

Vzorky byly získány celkem od 134 dobrovolníků, což je soubor, který je srovnatelný se soubory testovanými obdobnými evropskými studii. Možnost porovnání umožňuje Tabulka 11. Jedná se o přibližně 3 % z aktivních veterinárních lékařů v České republice.

Podle Komory veterinárních lékařů České republiky bylo ke dni 26. srpna 2019 registrováno 4205 soukromých veterinárních lékařů, kteří tvoří většinu praktikujících odborníků v České republice. V naší zemi tvoří veterinární lékaři se specializací na drobná zvířata 70 %, ostatní vykonávají praxi smíšenou a zaměřují se na péči o malá i hospodářská zvířata. Veterináři specializovaní pouze na velká hospodářská zvířata mají minimální zastoupení. Těmto statistickým údajům odpovídá i složení testovaného souboru. S ohledem na typ praxe, 57 % (76/134) pracovalo hlavně s malými zvířaty, 42,3 % (57/134) ve smíšené praxi a pouze 0,7 % (1/134) pečovalo výlučně o velká hospodářská zvířata.

Pravidelný kontakt s velkými hospodářskými zvířaty mělo v souboru 51,5 % (69/134) dotazovaných. S prasaty, jakožto s nejčastějším zdrojem LA-MRSA, pracovalo jen 4,4 % (6/134) veterinářů. Většina pracovníků (97 %, 130/134) se věnovala převážně péči o domácí mazlíčky. Proto je sporadický záchyt *S. intermedius*/*S. pseudintermedius* v této testované skupině překvapující. Sdílení těchto bakterií mezi domácími mazlíčky a jejich majiteli bylo dobře dokumentováno (135). Naopak *S. aureus* není typická komenzální bakterie u domácích zvířat, prevalence bývá popisována v méně než 10 % případů. U zdravých psů a koček se MRSA nachází ještě méně často. Ukazuje to například studie z Portugalska, kde bylo nosičství MRSA u psů prokázáno v 0,7 % a u koček < 4 % (136). Podobně tomu bylo ve studii z Velké Británie, kde byli psi kolonizováni v 2,3-9 % a kočky v 1,48 % (137). Veterináři jsou z titulu své profese spíše ve styku se zvířaty nemocnými, u kterých je i MRSA detekována častěji, například u koček se SSTI stoupá prevalence až na 29 %. Stejně jako je tomu u lidí, také u zvířat zvyšuje riziko akvizice MRSA anamnéza předchozí operace, hospitalizace, léčba antibiotiky nebo kontakt s lidmi kolonizovanými MRSA (138).

Izoláty MRSA cirkulující u psů a koček patří převážně k nozokomiálním kmenům, které nacházíme častěji u lidí (139). Jejich přenos na domácího mazlíčka pak může být pro majitele znovu zdrojem případné rekolonizace/reinfekce (140). Příkladem je výskyt kanadského epidemického klonu CMRSA5 (USA500), který ač typicky nozokomiální, byl prokázán mimo jiné u psů a koní (32). Také u koček byl prokázán výskyt MRSA nesoucí SCC<sub>mec</sub> typ II, který je nejčastěji spojován s lidskými nemocničními infekcemi (141). V popisovaném souboru byl zachycen jeden nemocniční kmen ST225-t003-II. Jedná se o CC5 aktuálně dominantní v českých nemocnicích. Nosič tohoto kmene vyloučil anamnesticky kontakt se zdravotnickým zařízením v období předcházejícím 30 dní před odběrem nebo sdílení domácnosti se zdravotnickým pracovníkem. Nicméně nemůžeme vyloučit možnost kontaktu v období delším, než bylo dotazováno. Hlášená střední doba trvání kolonizace MRSA se

pohybuje od 21 dnů do devíti měsíců či dokonce několika let (142). Pro účely této studie byla zvolena jasně definovaná lhůta, aby se dotazovaným časový údaj snáze vybavil a anamnestická data mohla být validně zpracována.

Tato práce prokázala, že nosičství MRSA u veterinárního personálu bylo primárně spojeno s kontaktem s malými zvířaty. Statistická významnost tohoto zjištění ale nebyla prokázána, četnost pozitivního nálezu je zde příliš nízká na to, aby mohla být zobecněna. Nosičské kmeny veterinářů odpovídaly genotypovou charakteristikou spíše kmenům typickým pro prasata a ostatní hospodářská zvířata. Sekvenční typ ST398, který byl na veterináře přenesen tedy pravděpodobně ze psů nebo koček, může pocházet původně od jejich majitelů, kteří jsou v pravidelném kontaktu s dobytkem (143). Tato anamnestická skutečnost nebyla v práci dotazována.

Všechny nosičské zvířecí kmeny *spa* t011 vykazovaly typickou rezistenci k tetracyklinu, dále pak ke gentamicinu a k ciprofloxacinu. Kmen *spa* t034 byl navíc rezistentní k makrolidům. Tetracyklin byl v minulosti široce užíván v zemědělské výrobě, zejména v chovech prasat (144). Gastrointestinální bakteriální infekce je běžným onemocněním postihující živočišnou produkci a je tedy důvodem pro antibiotickou léčbu. V této indikaci byl například v Dánsku nejčastěji používaným antibiotikem pro perorální léčbu tetracyklin. Byla tak přednostně léčena selata trpící infekcí způsobenou *Lawsonia intracellularis* (145). Nicméně, tetracyklin-rezistentní kmeny MRSA se vyskytují i u koní, přestože se u nich toto antibiotikum příliš nepoužívá (146). U skotu byly nalezeny kmeny MRSA většinou rezistentní na betalaktamová antibiotika, k tetracyklinu, erytromycinu a gentamicinu (138). Klonální komplex CC398 bývá často rezistentní k ciprofloxacinu (147). Také izoláty od domácích mazlíčků z Rakouska, Belgie, Německa, Irska a Portugalska byly rezistentní k fluorochinolonům, pravděpodobně jako důsledek schválení jejich používání ve veterinárním lékařství v polovině roku 1990 (138). Alarmující jsou zprávy o nálezu kmenů MRSA s rezistencí k záložním antibiotikům, jako je vankomycin nebo linezolid (148).

### 13. Závěr

Výskyt MRSA u zvířat určených k produkci potravin a domácích mazlíčků představuje vážnou hrozbu pro veřejné zdraví. Výskyt identických kmenů LA-MRSA u osob v blízkém kontaktu se zvířaty a jejich svěřenci dokazuje obousměrný přenos. Je známo, že kmeny pocházející od zvířat kolonizují a infikují člověka, ale člověk byl původním zdrojem této bakterie, která se zvířecím hostitelům evolučně přizpůsobila.

Tato studie ukázala rostoucí prevalenci nosičství MRSA u veterinárního personálu a potvrdila u nich přítomnost zvířecích i nozokomiálních kmenů. Prevalence byla stanovena na 6,7 %, což představuje nárůst, oproti výsledkům z roku 2008. Pozornost by měla být proto věnována zvýšené míře kolonizaci v této profesní skupině, zejména před přijetím takového pacienta k hospitalizaci. Pečlivý odběr pracovní anamnézy by měl být v klinické praxi doplněn o údaje týkající se kontaktu se zvířaty. Tento rizikový faktor by neměl být podceňován zejména u pacientů před chirurgickými zákroky, neboť zde nastává nepopíratelně vyšší riziko výskytu infekčních komplikací v pooperačním období. U těchto jedinců by mělo být zajištěno screeningové kultivační vyšetření na zjištění přítomnosti MRSA a na základě pozitivního výsledku by mělo být přistoupeno k nastavení účinných preventivních opatření.

U veterinárních profesionálů bylo prokázáno 9 kmenů MRSA, které byly zařazeny do 5 genotypů. Většinou se jednalo o kmeny zvířecího původu, včetně ST398-t011-IV (n = 5), ST398-t2330-IV (n = 1), ST398-t034-V (n = 1) a ST4894-t011-IV (n = 1). Tyto kmeny jsou běžněji nalézané u hospodářských zvířat. V tomto případě ale pocházely pravděpodobně od domácích mazlíčků, se kterými byli kolonizovaní veterináři v častém kontaktu. Kmen ST225-t003-II (n = 1) odpovídá nemocniční linii, která se aktuálně s vysokou prevalencí šíří zdravotnickými zařízeními v České republice. Tento ojedinělý nález nasvědčuje tomu, že humánní linie MRSA se mezi zvířaty vyskytuje spíše sporadicky.

## 14. Literatura

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003;111(9):1265–73.
2. Crossley K, Jefferson K, Archer G, Fowler V. Staphylococci in Human Disease. 2. vyd. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. 640 s.
3. Jevons MP. “Celbenin” - resistant Staphylococci. Br Med J. 1961;1(5219):124–5.
4. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1984;158(2):513–6.
5. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11(8):595–603.
6. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1985;28(3):397–403.
7. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2018;61:74–6.
8. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(6):1549–55.
9. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(5):1323–36.
10. Votava M, Černohorská L, Heroldová M, Holá V, Mejzlíková L, Ondrovčík R. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun; 2003. 495 s.
11. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*(LGA251). Clin Microbiol Infect. 2012;18(4):395–400.
12. Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2020 [citován 2. únor 2020]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanism\\_s/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanism_s/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)
13. Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated



- Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):217–9.
14. Popovich KJ, Aroutcheva A, Hota B, Beavis KG, Hayden MK, Weinstein RA. Anatomic sites of colonization with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(9):1192–4.
  15. Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging Infect Dis.* 2004;10(9):1627–34.
  16. Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC Infect Dis.* 2011;11:138.
  17. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(11):7687–92.
  18. Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovarova V, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2798–803.
  19. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e17936.
  20. Melter O, de Sousa MA, Urbášková P, Jakubů V, Žemličková H, de Lencastre H. Update on the Major Clonal Types of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4998–5005.
  21. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010;7(1):e1000215.
  22. Stock NK, Petráš P, Melter O, Kapounová G, Vopalková P, Kubele J, et al. Importance of Multifaceted Approaches in Infection Control: A Practical Experience from an Outbreak Investigation. *PLoS ONE.* 2016;11(6):e0157981.
  23. Tkadlec J, Melter O, Dřevínek P, Bergerová T, Polívková S, Balejová M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus spa*-types t003, t586 and t014 common cause of MRSA infection in Czech Republic. In: ESCMID eLibrary. Amsterdam, Netherlands; 2019.
  24. European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2019 [citován 10. únor 2020]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>
  25. Paterová P, Žemličková H. Přehled rezistence bakterií na antibiotika Fakultní nemocnice Hradec Králové 2018. 2018 [citován 17. únor 2020]. Dostupné z: [https://intra1.fnhk.cz/data-intra/adresare/9831\\_1.pdf](https://intra1.fnhk.cz/data-intra/adresare/9831_1.pdf)

26. Neradová K, Fridrichová M, Jakubů V, Pomorská K, Žemličková H. Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream cultures at University Hospital in the Czech Republic. *Folia Microbiol.* K publikaci přijato 25. 2. 2020.
27. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6):350–9.
28. David MZ, Cadilla A, Boyle-Vavra S, Daum RS. Replacement of HA-MRSA by CA-MRSA infections at an academic medical center in the midwestern United States, 2004-5 to 2008. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e92760.
29. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis.* 2006;42(5):647–56.
30. Glaser P, Martins-Simões P, Villain A, Barbier M, Tristan A, Bouchier C, et al. Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage. *mBio.* 2016;7(1):e02183-02115.
31. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(1):1–5.
32. Hanselman BA, Kruth S, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* 2008;126(1–3):277–81.
33. Ellis MW, Hospenthal DR, Dooley DP, Gray PJ, Murray CK. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis.* 2004;39(7):971–9.
34. Leonard FC, Markey BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J.* 2008;175(1):27–36.
35. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infect Dis.* 2007;13(2):255–8.
36. Bangerter PD, Sidler X, Perreten V, Overesch G. Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. *Vet Microbiol.* 2016;183:125–34.
37. Garcia-Graells C, Cleef BAGL van, Larsen J, Denis O, Skov R, Voss A. Dynamic of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Pig Farm Households: A Pilot Study. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e65512.
38. Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e16830.

39. Broek IVFVD, Cleef B a. GLV, Haenen A, Broens EM, Wolf PJVD, Broek MJMVD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol Infect.* 2009;137(5):700–8.
40. Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6800.
41. Dahms C, Hübner N-O, Cuny C, Kramer A. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *Acta Vet Scand.* 2014;56(1):53.
42. Richter A, Sting R, Popp C, Rau J, Tenhagen B-A, Guerra B, et al. Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. *Epidemiol Infect.* 2012;140(12):2223.
43. Van Cleef B a. GL, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Züchner L, Van Benthem BHB, et al. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2010;138(5):756–63.
44. Gilbert MJ, Bos MEH, Duim B, Urlings BAP, Heres L, Wagenaar JA, et al. Livestock-associated MRSA ST398 carriage in pig slaughterhouse workers related to quantitative environmental exposure. *Occup Environ Med.* 2012;69(7):472–8.
45. Antoci E, Pinzone MR, Nunnari G, Stefani S, Cacopardo B. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among subjects working on bovine dairy farms. *Infez Med.* 2013;21(2):125–9.
46. Mulders MN, Haenen APJ, Geenen PL, Vesseur PC, Poldervaart ES, Bosch T, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2010;138(5):743–55.
47. van Cleef B a. GL, van Benthem BHB, Verkade EJM, van Rijen M, Kluytmans van den Bergh MFQ, Schouls LM, et al. Dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriage in pig farmers: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O764-771.
48. Köck R, Loth B, Köksal M, Schulte-Wülwer J, Harlizius J, Friedrich AW. Persistence of nasal colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(11):4046–7.
49. Geenen PL, Graat EAM, Haenen A, Hengeveld PD, Van Hoek AHAM, Huijsdens XW, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. *Epidemiol Infect.* 2013;141(5):1099–108.
50. Morcillo A, Castro B, Rodríguez-Álvarez C, González JC, Sierra A, Montesinos MI, et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and pig workers in Tenerife, Spain. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(3):207–10.

51. Garcia-Graells C, Antoine J, Larsen J, Catry B, Skov R, Denis O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiol Infect.* 2012;140(3):383–9.
52. Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, et al. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1510–6.
53. Reynaga E, Navarro M, Vilamala A, Roure P, Quintana M, Garcia-Nuñez M, et al. Prevalence of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs and pig farm workers in an area of Catalonia, Spain. *BMC Infect Dis.* 2016;16(716).
54. Mascaro V, Leonetti M, Nobile CGA, Barbadoro P, Ponzio E, Recanatini C, et al. Prevalence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (LA-MRSA) Among Farm and Slaughterhouse Workers in Italy: *J Occup Environ Med.* 2018;60(8):416–25.
55. Mascaro V, Squillace L, Nobile CG, Papadopoli R, Bosch T, Schouls LM, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and pattern of antibiotic resistance among sheep farmers from Southern Italy. *Infect Drug Resist.* 2019;(12):2561–71.
56. Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, Mevius D, van Duijkeren E, Heederik D. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e10990.
57. Pirolo M, Visaggio D, Gioffrè A, Artuso I, Gherardi M, Pavia G, et al. Unidirectional animal-to-human transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pig farming; evidence from a surveillance study in southern Italy. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):187.
58. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1965–6.
59. Ballhausen B, Kriegeskorte A, van Alen S, Jung P, Köck R, Peters G, et al. The pathogenicity and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398. *Vet Microbiol.* 2017;200:39–45.
60. Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio.* 2012;3(1).
61. Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Öberg S, Karlsson L, Åhrén C. Infection with Pantone-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1271–2.
62. Uhlemann A-C, McAdam PR, Sullivan SB, Knox JR, Khiabani H, Rabadan R, et al. Evolutionary Dynamics of Pandemic Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ST398 and Its International Spread via Routes of Human Migration. *mBio.* 2017;8(1).

63. Chuang Y-Y, Huang Y-C. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia: an emerging issue? *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(4):334–40.
64. Butaye P, Argudín MA, Smith TC. Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution. *Curr Clin Micro Rpt*. 2016;3(1):19–31.
65. Hau SJ, Haan JS, Davies PR, Frana T, Nicholson TL. Antimicrobial Resistance Distribution Differs Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type (ST) 5 Isolates From Health Care and Agricultural Sources. *Front Microbiol*. 2018;9.
66. Abdulgader SM, Shittu AO, Nicol MP, Kaba M. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Front Microbiol*. 2015;6:348.
67. Goerge T, Lorenz MB, van Alen S, Hübner N-O, Becker K, Köck R. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. *Vet Microbiol*. 2017;200:6–12.
68. Becker K, Ballhausen B, Kahl BC, Köck R. The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans. *Vet Microbiol*. 2017;200:33–8.
69. Kinross P, Petersen A, Skov R, Hauwermeiren EV, Pantosti A, Laurent F, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Euro Surveill*. 2017;22(44):16.
70. Tkadlec J, Čapek V, Cabnochová M, Smelíková E, Polívková S, Dřevínek P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus spa*-types t003, t014 and t586 of clonal complex 5 are predominant in the Czech Republic. Dosud nepublikováno.
71. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuve MG, Heck ME, Pluister GN, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5(1):26.
72. Declercq Ph, Petré D, Gordts B, Voss A. Complicated Community-Acquired Soft Tissue Infection by MRSA from Porcine Origin. *Infection*. 2008;36(6):590–2.
73. Ruhlmann C, Klmos H, Kristiansen J, Skov R. Pigs as an infection source for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in humans. *Ugeskr Laeger*. 2008;170(43):3436.
74. Pan A, Battisti A, Zoncada A, Bernieri F, Boldini M, Franco A, et al. Community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):845–7.
75. Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin Lesion Caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):157–9.
76. Hartmeyer GN, Gahrn-Hansen B, Skov RL, Kolmos HJ. Pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Family transmission and severe pneumonia in a newborn. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(4):318–20.

77. Soavi L, Stellini R, Signorini L, Antonini B, Pedroni P, Zanetti L. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(2).
78. Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(6):923–7.
79. Omland Ø, Hoffmann L. Occupational acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans-a description of MRSA carrier and infected cases from the Region of North Jutland in Denmark. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(4):637–40.
80. Cavalcanti AB, Goncalves AR, Almeida CS, Bugano DD, Silva E. Teicoplanin versus vancomycin for proven or suspected infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(6):CD007022.
81. Yoon YK, Park DW, Sohn JW, Kim HY, Kim YS, Lee CS, et al. Multicenter prospective observational study of the comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin in patients with health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):317–24.
82. Beneš J. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a. s.; 2018.
83. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin versus vancomycin for bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a high vancomycin minimum inhibitory concentration: a case-control study. *Clin Infect Dis.* 2012;54(1):51–8.
84. Murray KP, Zhao JJ, Davis SL, Kullar R, Kaye KS, Lephart P, et al. Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin minimum inhibitory concentration > 1 mg/L: a matched cohort study. *Clin Infect Dis.* 2013;56(11):1562–9.
85. Hobzová L. Výskyt rezistentních bakteriálních kmenů v podmínkách Fakultní nemocnice Hradec Králové. Hradec Králové, 2017. Disertační práce: Univerzita Obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Doktorský studijní program Epidemiologie.
86. World Health Organization 2009. World Health Organization & WHO Patient Safety. Hand hygiene technical reference manual: to be used by health-care workers, trainers and observers of hand hygiene practices. World Health Organization. 2009 [citován 16. únor 2020]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44196>
87. Marimuthu K, Pittet D, Harbarth S. The effect of improved hand hygiene on nosocomial MRSA control. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2014;3(1):34.
88. Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(10):2681–92.

89. Harbarth S, Liassine N, Dharan S, Herrault P, Auckenthaler R, Pittet D. Risk Factors for Persistent Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2000;31(6):1380–5.
90. Rohr U, Mueller C, Wilhelm M, Muhr G, Gatermann S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* whole-body decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidine dihydrochloride. J Hosp Infect. 2003;54(4):305–9.
91. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. 2017 [citován 16. únor 2020]. Dostupné z: <http://www.eucast.org>.
92. DNA Sequencing of the *spa* Gene. 2014. Dostupné z: [http://www.ridom.de/doc/Ridom\\_spa\\_sequencing.pdf](http://www.ridom.de/doc/Ridom_spa_sequencing.pdf)
93. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1008–15.
94. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2155–61.
95. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: „SCC*mec* IV multiplex". J Antimicrob Chemother. 2007;60(1):42–8.
96. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol. 2004;42(2):792–9.
97. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(6):3140–5.
98. Melles DC, van Leeuwen WB, Snijders SV, Horst-Kreft D, Peeters JK, Verbrugh HA, et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods. 2007;69(2):371–5.
99. Petráš P, Švec P, Machová I. První záchyt *Staphylococcus pseudintermedius* z humánního klinického materiálu v České republice. Zprávy CEM. 2010;19(3).
100. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997;10(3):505–20.
101. Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, et al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. Environ Microbiol. 2016;18(7):2130–42.

102. Žemličková H, Fridrichová M, Tyllová K, Jakubů V, Machová I. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary personnel. *Epidemiol Infect.* 2009;137(9):1233–6.
103. Verkade E, van Benthem B, den Bergh MK, van Cleef B, van Rijen M, Bosch T, et al. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in livestock veterinarians: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2013;57(2):e11-17.
104. Wulf MWH, Sørnum M, Nes AV, Skov R, Melchers WJG, Klaassen CHW, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):29–34.
105. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis.* 2003;36(2):131–9.
106. Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, et al. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107937.
107. Köck R, Werner P, Friedrich AW, Fegeler C, Becker K, Prevalence of Multiresistant Microorganisms (PMM) Study Group, et al. Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New Microbes New Infect.* 2016;9:24–34.
108. Gamblin J, Jefferies JM, Harris S, Ahmad N, Marsh P, Faust SN, et al. Nasal self-swabbing for estimating the prevalence of *Staphylococcus aureus* in the community. *J Med Microbiol.* 2013;62(3):437–40.
109. Zanelli G, Sansoni A, Zanchi A, Cresti S, Pollini S, Rossolini GM, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community: a survey from central Italy. *Epidemiol Infect.* 2002;129(2):417–20.
110. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 2008;128(3–4):298–303.
111. Weese JS, Dick H, Willey BM, McGeer A, Kreiswirth BN, Innis B, et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol.* 2006;115(1–3):148–55.
112. Wulf M, van Nes A, Eikelenboom-Boskamp A, de Vries J, Melchers W, Klaassen C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Veterinary Doctors and Students, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(12):1939–41.
113. Moodley A, Nightingale EC, Stegger M, Nielsen SS, Skov RL, Guardabassi L. High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. *Scand J Work Environ Health.* 2008;34(2):151–7.



114. Paul NC, Moodley A, Ghibaud G, Guardabassi L. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. *Zoonoses Public Hlth.* 2011;58(8):533–9.
115. Wettstein Rosenkranz K, Rothenanger E, Brodard I, Collaud A, Overesch G, Bigler B, et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among Swiss veterinary health care providers: detection of livestock- and healthcare-associated clones. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2014;156(7):317–25.
116. Paterson GK, Harrison EM, Craven EF, Petersen A, Larsen AR, Ellington MJ, et al. Incidence and Characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Nasal Colonisation in Participants Attending a Cattle Veterinary Conference in the UK. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e68463.
117. Verkade E, Kluytmans-van den Bergh M, van Benthem B, van Cleef B, van Rijen M, Bosch T, et al. Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 from Livestock Veterinarians to Their Household Members. *PLoS One.* 2014;9(7).
118. Cuny C, Abdelbary MMH, Köck R, Layer F, Scheidemann W, Werner G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infections in horses in Germany are frequent colonizers of veterinarians but rare among MRSA from infections in humans. *One Health.* 2016;2:11–7.
119. Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M, et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infect Dis.* 2008;14(9):1383–9.
120. Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(4):373–82.
121. Macori G, Giacinti G, Bellio A, Gallina S, Bianchi DM, Sagrafoli D, et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Ovine Dairy Chain and in Farm-Related Humans. *Toxins (Basel).* 2017;9(5).
122. Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, Métayer V, Bes M, Madec J-Y, et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France. *Front Microbiol.* 2017;8:2493.
123. van Loo IHM, Diederer BMW, Savelkoul PHM, Woudenberg JHC, Roosendaal R, van Belkum A, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat Products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(11):1753–5.
124. Basanisi MG, La Bella G, Nobili G, Franconieri I, La Salandra G. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiol.* 2017;62:141–6.
125. Vyletělová M, Vlková H, Manga I. Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative staphylococci in raw milk manufacturing. *Czech J Food Sci.* 2012;29:11–6.

126. Vyletělová M, Hanuš O, Karpíšková R, Štástková Z. Occurrence and antimicrobial sensitivity in staphylococci isolated from goat, sheep and cow's milk. *Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun.* 2011;59(3):209–14.
127. Klimešová M, Manga I, Nejeschlebová L, Horáček J, Ponížil A, Vondrušková E. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. *Acta Vet Brno.* 2017;86(1):3–10.
128. Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, Somogyi P, Dán A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infect Dis.* 2007;13(4):630–2.
129. Kolářková I, Koukalová K, Karpíšková R. Occurrence and characteristic of *Staphylococcus aureus* in pork meat. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014;63(3):191–4.
130. Karpíšková R, Koukalová K, Kolářková I. Prevalence and characteristics of MRSA strains isolated from pigs on farms, at slaughterhouses and in pork meat at retail sale in the Czech Republic. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2015;21(2):41–5.
131. Feld L, Bay H, Angen Ø, Larsen AR, Madsen AM. Survival of LA-MRSA in Dust from Swine Farms. *Ann Work Expo Health.* 2018;62(2):147–56.
132. Bardoň J, Kolář M, Karpíšková R, Žemličková H, Fridrichová M, Sauer P, et al. Occurrence and characteristic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on pig farms in the Czech Republic. *Acta Vet Brno.* 2013;81(3):219–23.
133. Huang E, Gurzau AE, Hanson BM, Kates AE, Smith TC, Pettigrew MM, et al. Detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among swine workers in Romania. *J Infect Public Health.* 2014;7(4):323–32.
134. Frana TS, Beahm AR, Hanson BM, Kinyon JM, Layman LL, Karriker LA, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. *PLoS ONE.* 2013;8(1):e53738.
135. Wipler J, Čermáková Z, Hanzálek T, Horáková H, Žemličková H. Sharing bacterial microbiota between owners and their pets (dogs, cats). *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2017;23(2):48–57.
136. Couto N, Pomba C, Moodley A, Guardabassi L. Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Vet Rec.* 2011;169(3):72.
137. Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(4):692–7.
138. Chon J, Sung K, Khan S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Food-Producing and Companion Animals and Food Products. *Frontiers in Staphylococcus aureus.* 2017;
139. Loeffler A, Lloyd DH. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol Infect.* 2010;138(5):595–605.

140. Bierowiec K, Płoneczka-Janeczko K, Rypuła K. Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners? PLoS ONE. 2016;11(5):e0156052.
141. Morris DO, Mauldin EA, O'Shea K, Shofer FS, Rankin SC. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. Am J Vet Res. 2006;67(8):1421–5.
142. Calderwood MS. Editorial Commentary: Duration of Colonization With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Question With Many Answers. Clin Infect Dis. 2015;60(10):1497–9.
143. Monaco M, Pedroni P, Sanchini A, Bonomini A, Indelicato A, Pantosti A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. BMC Infect Dis. 2013;13:258.
144. de Neeling AJ, van den Broek MJM, Spalburg EC, van Santen-Verheувel MG, Dam-Deisz WDC, Boshuizen HC, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet Microbiol. 2007;122(3–4):366–72.
145. Agersø Y, Hald T, Helwich B, Høg B, Jensen J. DANMAP 2011 - use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. In: DANMAP 2011 - use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark 2012. Dánsko; 2012.
146. Hasman H, Moodley A, Guardabassi L, Stegger M, Skov RL, Aarestrup FM. *Spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. Vet Microbiol. 2010;141(3–4):326–31.
147. Morcillo A, Castro B, Rodríguez-Álvarez C, Abreu R, Aguirre-Jaime A, Arias A. Descriptive Analysis of Antibiotic-Resistant Patterns of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) st398 Isolated from Healthy Swine. Int J Environ Res Public Health. 2015;12(1):611–22.
148. Mammina C, Calà C, Plano MRA, Bonura C, Vella A, Monastero R, et al. Ventilator-associated Pneumonia and MRSA ST398, Italy. Emerg Infect Dis. 2010;16(4):730–1.

## 15. Přílohy

### 15.1. Příloha 1. Stanovisko Etické komise Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Etická komise, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
Ethics Committee, University Hospital Hradec Kralove, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

#### STANOVISKO ETICKÉ KOMISE/Opinion of the Ethics Committee

Vážená paní  
MUDr. Kateřina Habalová  
ÚKM  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Číslo jednací/Reference number: 201808 S25P

Žadatel/Applicant: MUDr. Kateřina Habalová, ÚKM, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Název studie/Full Title of study:

Výskyt LA-MRSA a CA-MRSA v populaci s vyšším rizikem nosičství /The occurrence of LA-MRSA and CA-MRSA in a population with a higher risk of carrier

Datum doručení žádosti/Date of submission of the Application Form: 12Jul2018

Datum jednání EK + čas/Date and time of Ethics Committee's session: 16Aug2018 (14.00-19.00)

Vyjádření EK/ Ethics Committee's opinion:  
EK vydává / EC issues

- Souhlasné stanovisko/Favourable opinion  
 Podmíněné stanovisko/ Conditionally approved (see attached letter)  
 Nesouhlasné stanovisko/Unfavourable opinion

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic



Datum/Date: 21Aug2018

MUDr. Jiří Vortel, předseda EK  
Signature of Chairperson of the EC

vyřizuje: Ing. Petra Doležalová, tel.: 49 583 3795; E-mail: etikom@fnhk.cz

Seznam členů etické komise/List of the Ethics Committee Members:

Jméno a příjmení First name and surname	Muž/ Žena Male/ Female	Odbornost Specialization	Zaměstnanec zřizovatele EK*		Funkce v EK Role in EC	Přítomen Attendance		Hlasoval Voted	
			Ano Yes	Ne No		Ano Yes	Ne No	Ano Yes	Ne No
Petra Doležalová, Ing.	F	Economist, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ivana Dvořáčková, M.A.	F	Vice-Head Nurse, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eduard Havel, M.D., PhD.	M	Physician of the Surgery Dept., University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Josef Herink, Assoc.Prof., M.D., PhD.	M	Physician, Dept. of Toxicology	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marta Horáková, Ing.	F	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaromír Hrubecký, M.D.	M	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petr Hůlek, Prof., M.D., PhD.	M	Physician, The 2nd Dept. of Internal Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Štěpán Klásek	M	Diocesan bishop of Hradec Králové	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Bohuslav Král, Prof., M.D., PhD.	M	Physician, The 2nd Dept. of Internal Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaroslava Pečenková	F	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Rosvita Ševčíková, M.A.	F	Lawyer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petra Thomson, PhamDr.	F	Pharmacy, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hubert Vaniček, M.D., PhD.	M	Physician, Department of Pediatric Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jiří Vortel, M.D.	M	Cardiologist – private physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	chairman	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jiřina Zatloukalová, M.A.	F	Lawyer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petr Žďánský, M.A.	M	Gerontological and Metabolic Department, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Vice-Chairperson	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

(pozn: \*Zaměstnanec zřizovatele EK/ Employee of EC appointing authority)

Ethics Committee composition meets the requirements of ICH GCP standards and is working according to its written procedure which is in compliance with the above-mentioned standards (ICH E6)

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sokolova 581  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic



Datum/Date: 16Aug2018

MUDr. Jiří Vortel, předseda EK  
Signature of Chairperson of the EC

Etická komise, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
Ethics Committee, University Hospital Hradec Kralove, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

STANOVISKO ETICKÉ KOMISE/*Opinion of the Ethics Committee*

Vážená pani  
MUDr. Kateřina Neradová  
ÚKM  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Číslo jednací/*Reference number*: 201912 I31P

Žadatel/*Applicant*: MUDr. Kateřina Habalová, ÚKM, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Název studie/*Full Title of study*:

Výskyt LA-MRSA a CA-MRSA v populaci s vyšším rizikem nosičství, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* u veterinárních pracovníků v roce 2017 v České republice/ *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic*

Datum doručení žádosti/*Date of submission of the Application Form*: 25Nov2019

Vyjádření EK/*Ethics Committee's opinion*:

EK vydává / *EC issues*  Souhlasné stanovisko/ *Favourable opinion*

- doplnění souhlasu s udělením verbálního souhlasu dobrovolníka s odběrem vzorku, vyplněním dotazníku a použitím získaných dat k výzkumným účelům
- *the obtaining verbal consent with the sampling, filling in the questionnaire and using the data for research purposes*

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic

Datum/*Date*: 26Nov2019

MUDr. Jiří Vortel, předseda EK  
*Signature of Chairperson of the EC*

## 15.2. Příloha 2. Seznam tabulek

Tabulka 1. Přehled pandemických HA-MRSA klonů se zaměřením na výskyt v České republice .....	21
Tabulka 2. Prevalence nasální kolonizace MRSA u pracovníků v rizikovém kontaktu se zvířaty v evropských zemích.....	25
Tabulka 3. Některé dokumentované infekce vyvolané LA-MRSA CC398 u osob v kontaktu s hospodářskými zvířaty.....	28
Tabulka 4. Souhrn základních rozdílů mezi třemi epidemiologickými skupinami MRSA .....	29
Tabulka 5. Primery použité v PCR reakcích .....	37
Tabulka 6. Základní charakteristika 134 dobrovolníků. ....	48
Tabulka 7. Hodnoty MIC testovaných antibiotik v mg/l .....	50
Tabulka 8. Výsledky diskového difúzního testu pro cefoxitin 30 µg .....	51
Tabulka 9. Hodnocení SCC <i>mec</i> typizace a kontrol.....	54
Tabulka 10. Charakteristika kmenů MRSA. ....	55
Tabulka 11. Přehled evropských dat týkajících se prevalence nosičství MRSA u veterinárních pracovníků v letech 2006-2015 .....	58
Tabulka 12. Živočišná výroba v České republice a v Německu za rok 2019 .....	60

### 15.3. Příloha 3. Seznam obrázků

Obrázek 1. Růst na krevním agaru .....	16
Obrázek 2. Diskový difúzní test – fenotypové vyšetření citlivosti k cefoxitinu 30 µg.....	17
Obrázek 3. Růst na chromogenním agaru .....	17
Obrázek 4. Imunochromatografický kvalitativní test.....	18
Obrázek 5. Místa nejčastější kolonizace MRSA na lidském těle.....	19
Obrázek 6. Výskyt invazivních MRSA v Evropě .....	23
Obrázek 7. Světové rozšíření LA-MRSA a distribuce jednotlivých sekvenčních typů .....	27
Obrázek 8. Anonymní dotazník .....	34
Obrázek 9. Schématické zobrazení molekulárně-biologické analýzy MRSA izolátů .....	39
Obrázek 10. Schématické zobrazení průběhu <i>spa</i> typizace .....	41
Obrázek 11. Hodnocení výsledných sekvencí do <i>spa</i> typů pomocí softwaru Ridom StaphType™.....	41
Obrázek 12. Zpracování dat pomocí webové databáze Ridom <i>spa</i> server.....	42
Obrázek 13. Místo vykonávání práce.....	47
Obrázek 14. Grafický výsledek analýzy příbuznosti pomocí algoritmu BURP .....	52
Obrázek 15. Výsledek typizace SCC <i>mec</i> vizualizovaný gelovou elektroforézou .....	53



#### 15.4. Příloha 4. Seznam grafů

Graf 1. Populační vážený průměr u invazivních MRSA izolátů.....	22
Graf 2. Invazivní infekce způsobené MRSA ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v letech 2010-2018.....	24
Graf 3. Pohlaví dotazovaných dobrovolníků.....	45
Graf 4. Věk dotazovaných dobrovolníků (v letech).....	45
Graf 5. Délka aktivní veterinární praxe (v letech) .....	46