

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**Současné postupy v diagnostice, léčbě a prevenci  
infekce vyvolané methicilin rezistentními kmeny  
bakterie *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Marie Smolíková

Erika Korejsová

2013

## **estné prohlášení**

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

V Jiříně 12.8.2013

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala paní primářce MUDr. Marii Smolíkové za trpělivost a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále paní Mgr. Kláre Konečné, Ph.D. za vedení mé práce. Panu primáři RNDr. Romanovu Jirsovi z Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Mladá Boleslav a laborantkám z Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Jičín za poskytnutá data pro statistické vyhodnocení a nakonec mojí rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

# OBSAH

1. CÍLE PRÁCE . ZADÁNÍ.....	11
2. TEORETICKÁ ÁST.....	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.1.1 Mikrobiologie rodu <i>Staphylococcus</i> .....	12
2.1.2 Rozd lení .....	12
2.1.3 Odolnost .....	13
2.1.4 Faktory virulence .....	13
2.1.5 Hemolýza stafylokok .....	14
2.1.6 Patogeneze a patogenita.....	15
2.1.7 Diagnostika <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.1.7.1 Vyzet ení - laboratorní diagnostika.....	16
2.1.7.2 Odb r a transport.....	16
2.1.7.3 Mikroskopický pr kaz.....	17
2.1.7.4 Kultiva ní pr kaz.....	17
2.1.7.5 Makroskopická morfologie.....	18
2.1.7.6 Biochemické testy .....	18
2.1.7.7 Instrumentální metody - MALDI . TOF MS .....	18
2.2 Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> . MRSA .....	20
2.2.1 Charakteristika MRSA .....	20
2.2.2 Pr kaz MRSA v mikrobiologické laborato i.....	20
2.2.3 Prevence MRSA .....	23
2.2.3.1 Zdroje a cesty p enosu.....	23
2.2.3.2 Opat ení p i výskytu MRSA na odd lení .....	23
2.2.4 Infekce vyvolané MRSA.....	26
2.2.4.1 Riziko výskytu MRSA na jednotlivých odd leních .....	26
2.2.5 Lé ba MRSA .....	27
3. PRAKTICKÁ ÁST .....	28
3.1 Biochemické testy .....	28
3.1.1 Katalázový test .....	29
3.1.2 Pr kaz hyaluronidázy .....	29
3.1.3 Pr kaz vázané koagulázy.....	30

3.1.4 Pr kaz volné koagulázy .....	32
3.1.5 STAPHY test .....	32
3.2 Metody používané pro pr kaz a ur ení citlivosti MRSA na antimikrobní látky .....	35
3.2.1 Pr kaz MRSA latexovou aglutinací .....	35
3.2.2 Ur ení citlivosti MRSA na antimikrobní látky .....	37
3.2.2.1 Diskový difuzní test .....	37
3.2.2.2 Stanovení minimální inhibi ní koncentrace .....	38
3.3 Statistické zhodnocení .....	40
3.3.1 Procentuální vyjád ení záchytu MRSA .....	43
4. VÝSLEDKY .....	45
5. DISKUZE.....	46
6. ZÁV R .....	47
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJ .....	48

# ABSTRAKT

Autor: Erika Korejšová

Vedoucí práce: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Marie Smolíková

Název: Současné postupy v diagnostice, léčbě a prevenci infekce vyvolané methicilin rezistentními kmeny bakterie *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Biologických a lékařských věd

Studijní obor: Zdravotnická bioanalýtika

*Staphylococcus aureus* je bakterie, která se nachází na nosní sliznici zdravých lidí (20-40%) a na kůži, aniž by způsobovala onemocnění. Za určitých okolností, například při pozrazení či poražení kůže, sliznic a při snížené obranyschopnosti jedince, může vzniknout infekce. Proto jsou hospitalizovaní pacienti k této infekci mnohem vnímavější.

Nejtíže nebezpečí představují kmenev MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*). Jedná se vztinou o multirezistentní kmenev *Staphylococcus aureus*, kde se krom rezistence k oxacilinu (methicilinu) vyskytuje i rezistence k dalším antibiotikům. Léčba těchto pacientů je problematická, protože MRSA jsou kmenev značně odolné a přetrvávají v organizmu a v prostředí. Jejich eradikace není jednoduchá. Iasto při snížené hladině antibiotik v krvi pacienta dochází k reinfekci.

To znamená značné finančné náklady pro zdravotnícká zariadenia, zvlášť nemocnice. Preto sa zde provádí preventívne opatrenia, ktoré majú zabrániť šíreniu MRSA na ďalšie nemocné. Pacienti s MRSA jsou, pokud možno, izolováni v jednolokových pokojích s prísnyim hygienickým režimem.

# ABSTRACT

Candidate: Erika Korejšová

Supervisor: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Consultant: MUDr. Marie Smolíková

Title: Current methods in diagnostics, treatment and prevention of infection caused by methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study field: Medical Bioanalytics

*Staphylococcus aureus* is a bacterium that is found in the nasal mucosa of healthy people (20-40%) and skin without causing disease. Under certain circumstances, such as damage or injury of skin, mucous membranes and in immuno-incompetent individuals, the MRSA infection can originate. Therefore, hospitalized patients are much more susceptible to this infection.

The biggest dangers represent MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) strains. These strains of *Staphylococcus aureus* are mostly multi-resistant, where in addition to resistance to oxacillin (methicillin), resistance to other antibiotics occurs as well. Treatment of these patients is problematic, because MRSA strains are extensively resistant and persist in the organism and in the environment. Their eradication is not simple. The patient's blood reinfection often occurs due to low levels of antibiotics.



It means a considerable financial costs for medical institutions, particularly hospitals. Therefore, preemptive actions are taken in hospitals to prevent the spread of MRSA to other patients. Patients with MRSA are preferably isolated in single rooms with strict hygiene regime.

## POUŽITÉ ZKRATKY

CFU	Colony Forming Unit (kolonie tvořící jednotku)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
ELFO	elektroforéza
MALDI - TOF MS	(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Light Mass Spectrometry) hmotnostní spektrometrie desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice s detektorem doby letu
MH p da	Mueller-Hinton p da
MIC	Minimal Inhibition Concentration (minimální inhibiční koncentrace)
MRSA	Methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> )
PBP2a	penicillin binding protein 2a (penicilin vázající protein 2a)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomální ribonukleová kyselina)
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TE	Tris, EDTA Ethylentetraaminoacetic Acid (Ethylendiamintetraoctová kyselina)
THB	Todd Hewitt Broth (Todd Hewitt bujón)

# 1. CÍLE PRÁCE Ě ZADÁNÍ

Cílem práce je poskytnout informace o problematice methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA). Mým zájmem je sdílet informace o současných postupech v diagnostice, léčbě a prevenci infekcí vyvolaných těmito kmeny.

Tato bakalářská práce obsahuje teoretickou část a praktickou část.

V teoretické části nejprve popíši všechny souvislosti, léčebné postupy a termíny, které se této problematice týkají.

V praktické části popíši identifikační testy a metody, které se používají k diagnostice MRSA. Dále na základě kazuistiky pacientů se pokusím vysledovat trendy ve výskytu MRSA izolátů ve vybraných nemocnicích Královéhradeckého kraje.

Z teoretických znalostí je známo, že MRSA vyvolává závažná onemocnění. Stafylokoky jsou nadány mimořádnou schopností šířit se z jednoho hostitele na druhého, vztínou přímým kontaktem se sekrety infikovaných kožních lézí, nosními sekrety, ale také i kontaminovanými rukama. Hlavním místem, kde MRSA způsobují nejvíce problémy, jsou právě zdravotnická zařízení.

Tato práce věnuje pozornost postupům a popisům jednotlivých identifikačních testů a metod pro prkaz MRSA. Součástí této práce je statistické vyhodnocení výskytu izolátů MRSA v Oblastní nemocnici Jičín (nemocnice Jičín a Nový Bydov) a v Oblastní nemocnici Mladá Boleslav během období 2011-2013.

## 2. TEORETICKÁ ÁST

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

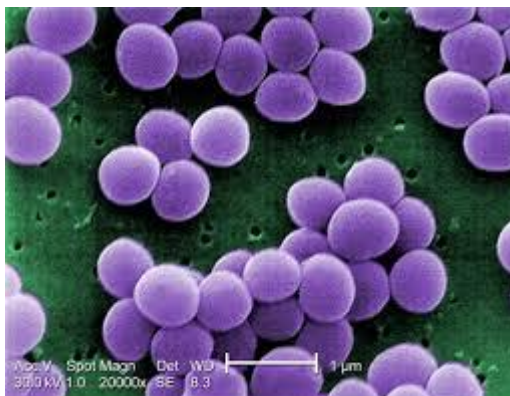
#### 2.1.1 Mikrobiologie rodu *Staphylococcus*

Stafylokoky se popisují jako grampozitivní koky o průměru přibližně 1 μm, v tuzinové uspořádané ve shlucích, které mají vzhled hroznů (euky *staphylé-hrozen*, *coccus*- zrnko). Rostou za přítomnosti vzduchu, ale v případě potřeby jsou schopné růst i za anaerobních podmínek. Mají pozitivní katalázu a převažující negativní oxidázu. Stafylokoky netvoří spory, jsou nepohyblivé a nemají ani pouzdra. Výhodou stafylokoků je, že dokážou růst i v přítomnosti 10% NaCl na rozdíl od jiných mikroorganismů [1].

#### 2.1.2 Rozdělení

Doposud bylo popsáno na padesát druhů a poddruhů různých stafylokoků, z toho asi dvacet byly izolovány i od lidí. V praxi je důležité na dvě velké skupiny podle schopnosti koagulovat plazmu na stafylokoky koagulázapozitivní a koagulázanegativní. Pro izolaci nejdříve koagulázapozitivním stafylokokem je *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, latinsky *aureus* - zlatý) (Obr. 1). Nejčastěji se vyskytujícím koagulázanegativním stafylokokem je *Staphylococcus epidermidis* [1].

Obr. 1: Koky bakterie *S. aureus* (snímek pořízen rastrovacím elektronovým mikroskopem)



(Převzato z: [http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg](http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg) [37])

### 2.1.3 Odolnost

Stafylokoky patří mezi odolné mikroby. Jsou rezistentní k nepříznivým vlivům zevního prostředí. Nevadí jim vyschnutí a odolávají vysokým koncentracím NaCl. Jsou odolné vůči některým dezinfekčním prostředkům, jako je fenol a sloučeninám těžkých kovů. Koncentrovaný etanol je nehubí, ale v ředění konzervuje [1], [2].

### 2.1.4 Faktory virulence

*S. aureus* je biochemicky velice aktivní bakterie, která produkuje řadu látek včetně toxinů. Tyto látky se uplatňují jako faktory virulence a tím se podílejí na vzniku onemocnění. Na povrchu buněčné stěny se nachází peptidoglykan, který je základní složkou všech gram pozitivních bakterií. Kromě stavební funkce má řadu dalších biologických funkcí. Působí jako pyrogenní faktor, vyvolává lokalizovanou zánětlivou reakci kóži, má cytotoxické účinky a má imunoadjuvantní aktivitu. K významným druhově specifickým antigenům se řadí kyselina teichoová, která vytváří na povrchu buňky fágové receptory. Dále protein A, který je vázán na peptidoglykan a zčásti uvolněn jako extracelulární protein i do zevního prostředí [1], [2].

Mezi extracelulární faktory virulence patří enzymy (např. plazmakoaguáza, fibrinolysin, hyaluronidáza, penicilináza atd.) a toxiny. K toxinům se řadí enterotoxiny (vyvolávají zvracení a průjemy), toxin syndromu toxického šoku (TSST-1), exfoliatiny (stafylokokový syndrom opálené kůže) a cytolyziny. Z cytolyzínů jsou to pak i odlišné hemolyziny (alfa a delta) a leukocidin. Nejdomnělejší je alfa-hemolyzín, který způsobuje nekrózy a Panton-v-Valentinův leukocidin, který ničí leukocyty a tím způsobuje smrtelné probíhající infekce (např. nekrotizující pneumonie) [1], [2].

### **2.1.5 Hemolýza stafylokoků**

Kmeny zlatého stafylokoků produkují i hemolyziny a to alfa, beta, gama a delta.

Alfa-hemolyzín způsobuje úplnou hemolýzu jak králičích tak i ovčích erytrocytů v krevním agaru a navzájem se liší s hemolyzínem beta.

Beta-hemolyzín má účinek na ovčích erytrocyty, to se projeví změnou barvy krevního agaru kolem kolonií, ale nezpůsobí jejich lýzu. K projasnění zóny dochází při změně teploty, kdy se misky s narostlými stafylokoky uloží v chladničce. Mezi hemolyziny alfa a beta dochází k protichůdnosti. Z toho vyplývá, že kmen *S. aureus*, nemusí vytvořit hemolýzu na krevním agaru.

Gama-hemolyzín jeho účinek je v agaru inhibován, proto gama hemolýza není na krevním agaru prokazatelná.

Delta-hemolyzín působí na lidské krvinky společně s beta-hemolyzínem. Jeho účinek na krevním agaru je snižován lipoproteiny krevního séra [1], [2], [7].

### **2.1.6 Patogeneze a patogenita**

*S. aureus* je patogenní pro člověka, ale v případě stafylokokové infekce je lidský organismus poměrně značně odolný. Pro vznik infekce je třeba, aby:

- kožní i slizniční bariéra byla porušena
- se do porušeného místa dostala dostatečně velká dávka infekčního agens
- byla snížena obranyschopnost pacienta

Infikovaná rána je pak pro bakterie vstupní branou, odkud se potom dostávají do oblastí mizních uzlin, kde vzniká zanícení. Z uzlin se dostávají do krevního oběhu, což může vést až k sepsi. Krví se pak mohou zanést do kteréhokoli orgánu a vytvořit absces, který je typickým ukazatelem stafylokokových infekcí. Absces je ohraničené ložisko, v kterém se vytvořila dutina vyplněná hnisem. Hnis obsahuje rozpadající se tkáň včetně leukocyt a bakterií [3].

### **Klinické formy stafylokokové nákazy**

Stafylokokové infekce rozdělujeme podle lokalizace:

- infekce kůže a podkoží (folikulitida, impetigo, furunkl, karbunkl atd.)
- infekce kostí a kloubů (osteomyelitida, artritida)
- infekce dýchacích cest (stafylokoková pneumonie, sinusitidy)
- infekce gastrointestinálního traktu (enterotoxikóza)
- infekce centrální nervové soustavy (stafylokoková hnisavá meningitida, mozkové abscesy)
- infekce lokalizované v cévním systému (septická tromboflebitida, endokarditida)

Toxiny, které uvolní bakterie vyvolávají tzv. toxinózy.

Mezi nejdeleit jzí toxinózy pat í:

- Toxický zokový syndrom ( TSS - Toxic Shock Syndrome) je onemocn ní zp sobeno p í masivní kolonizaci sliznice, bývá spojeno s pou0íváním menstrua níh tampon [5]
- Syndrom opa ené k 0e (SSSS - Staphylococcal Scalded Skin Syndrom)
- Enterotoxikóza . vzniká poz ením potravy, v ní0 se pomno0il stafylokok [4], [6]

## **2.1.7 Diagnostika Staphylococcus aureus**

### **2.1.7.1 Vyét ení - laboratorní diagnostika**

Stafylokoky diagnostikujeme kultiva n , mikroskopicky a taky makroskopicky. D le0ité jsou identifika ní testy, kterými lze p esn ji rozlízit jednotlivé druhy stafylokok .

### **2.1.7.2 Odb r a transport**

Vzorcky jsou v tzinou odebírány pomocí komer n dodávaných jednorázových sterilních tampon . Odebírají se st ry z prost edí, biologický materiál nap . výt ry z nosu a krku, st ry z perinea, rekta, pozevní výt ry a dalzí. Dále pak výt ry z infek níh lo0isek (nap . z ran a defekt , výt ry z tracheostomie, mo u cévkovaných pacient , pupe ní pahýl u novorozenc atd.). P í podez ení na septikémii se provádí odb r do hemokultiva níh nádobek, které jsou obvykle aerobní a anaerobní.

Tampony bývají obvykle plastové nebo hliníkové ty inky se syntetickou bavlnou ve sterilní zkumavce. V dnezní dob existuje n kolik druh tampón . D íve se pou0ívaly tampóny suché, bez transportního média. Vzhledem k tomu, 0e n které bakterie jsou citlivé na podmínky vn jzího prost edí, je vhodné pou0ít tampóny s transportním médiem. Mezi nej ast ji pou0ívané pat í



univerzální Amiesova pasta s aktivním uhlím, nebo Stuartova pasta bez ní. I velmi náročné bakterie přežívají 48 hodin [8].

U stafylokoků problém s odběrem a transportem vzorků nehrozí, protože odolávají podmínkám vnějšího prostředí (vysychání a změnám teploty). Důležité je zejména zabránit kontaminaci vzorku.

### **2.1.7.3 Mikroskopický průkaz**

Mikroskopie je nedílnou součástí identifikace bakterií. Jedním ze základních barvení v mikrobiologii je barvení dle Grama. Podstatou tohoto barvení je rozdělení bakterií na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). Toto rozdělení je založeno na odlišné stavbě bakteriální stěny. U grampozitivních bakterií, je stěna tvořená proteoglykanem a polysacharidy, kterými prochází kyselina teichoová. Při barvení dochází k tomu, že krystalová viole prostupuje do buněk a tvoří s Lugolovým roztokem modrou barvu. Alkohol není schopen vstoupit do buněčné stěny a rozpustit komplex. Dobarvení karbolfuchsinem (safraninem) získají bakterie tmavě fialovou barvu. Co se týče gramnegativních bakterií, tak ty mají stěnu tvořenou tenkou vrstvou proteoglykanu a lipopolysacharidu. Alkohol vyplaví komplex a dochází k odbarvení. Karbolfuchsin pak dobarví bakterie červeně [9].

Mikroskopicky je možno vyšetřovat biologický materiál jednak přímo, jednak po kultivaci jako součást důročení bakterií. Mikroskopický preparát lze provést z výtěrů, pokud nejsou zaslány v transportním médiu.

### **2.1.7.4 Kultivační průkaz**

Stafylokoky rostou na běžných kultivačních podmínkách. Zkoumaný materiál se naočkuje na krevní agar. Většina stafylokoků roste v aerobních podmínkách při 37 °C, 18-24 hod. v termostatu. Krevní agar je jednou ze základních a nejdůležitějších předvláček bakteriologii. Jeho příprava spoívá v přidání 5-10% sterilní defibrinované ovce nebo beraní krve k agarovému základu, který

je ochlazen na 45-50 °C. Po promíchání se vylévá do Petriho misek. Pokud se pracuje se vzorkem biologického materiálu, u kterého se předpokládá výskyt kontaminujících bakterií, je vhodné použít selektivní médium pro zabránění jejich růstu. Příkladem vhodného média je například: krevní agar s 10% NaCl, agar s manitelem a solí, Columbia agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou nebo agar s fenyl-ethylalkoholem, která potlačují gramnegativní flóru [6], [10]. Pro pomnožení se používá thioglykolátový bujón [11].

#### **2.1.7.5 Makroskopická morfologie**

Kolonie jsou spíše vlnité, lesklé i matné a jejich povrch může být hladký nebo drsný. Nejčastěji jsou kulaté s hladkým nebo vroubkovaným okrajem vlnitou pigmentované. Pigment je obvykle smetanový až krémový, často nazlátlý. Proto se používá označení zlatý stafylokok. Kolem kolonií se nachází beta-hemolýza, její stupeň je závislý na kombinaci různých hemolyzin [10].

#### **2.1.7.6 Biochemické testy**

K rozlišení a přesné identifikaci kmenů *S. aureus* se používají biochemické testy: katalázový test, test na přítomnost hyaluronidázy, vázané a volné koagulázy a STAPHYtest 16 i 24 (viz kapitola 3.1).

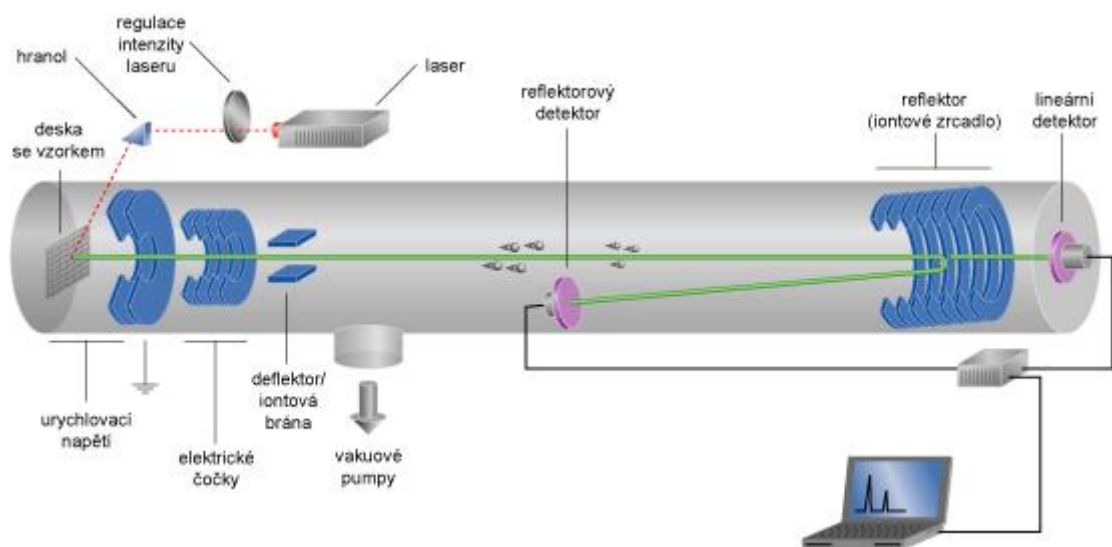
#### **2.1.7.7 Instrumentální metody - MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Light Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice s detektorem doby letu) je technika, která byla představena jako nový způsob identifikace bakterií. Ke stanovení vyzrávající molekulových hmotností se používá desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF- Time-Of-Light). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vypočítat rychlost částice. Hmotnostní spektroskopie MALDI

byla p vodn vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptid a bílkovin. MALDI-TOF MS poskytuje rychlý a snadný zp sob hromadné analýzy s použitím minimálního množství vzorku [33].

Mikroorganismy jsou p eneseny z kultiva ního média na destičku (kovový ter ík), která m ůe mít až 384 pozic, ke vzorku se p idá matrice (nap . 2,5-dihydroxybenzoová kyselina), která kokrystalizuje s analyzovaným vzorkem. V hlubokém vakuu je vzorek s matricí sbombardován%paprskem laseru po dobu nanosekund. Proud vzniklých iont ů je urychlen a usm rn n do detektoru doby letu a tyto ionty jsou detekovány na základ doby dopadu, která je úm rná jejich molekulové hmotnosti. Vzniklé hmotnostní spektrum je charakteristické pro daný mikroorganismus a slouží k jeho identifikaci. Výsledky jsou v tzinou do 20 min. Zjednodušené schéma analytické instrumentace a provedení analýzy MALDI-TOF MS, je možné vid t na obrázku 6 [33].

Obr. 6 Schéma MALDI . TOF MS



(P evzato z : <http://biomikro.vscht.cz> (květen 2008) [34].)

## **2.2 Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* Ě MRSA**

### **2.2.1 Charakteristika MRSA**

V tžina kmen *S. aureus* je rezistentní na penicilin. P í inou rezistence je p ítomnost penicilinázy st pící beta-laktamový kruh penicilinových antibiotik. Proto byli vyvinuté peniciliny nap . methicilin (oxacilin), které jsou v í p sobení tohoto enzymu odolné. Postupem ásu se vžak í k t mto antibiotik m vyvinula u *S. aureus* rezistence (první kmeny rezistentní k t mto antibiotik m byly zna eny jako MRSA = methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Ta je zp sobena produkcí transpeptidázy PBP2a (penicillin-binding protein 2a, penicilin vázající protein 2a), její0 syntéza je kódována genem *mecA* [12], [14].

MRSA jsou obvykle rezistentní ke všem beta-laktamovým antibiotik m, v etn jejich kombinací s inhibitory -laktamáz a ke karbapenem m [13].

### **2.2.2 Pr kaz MRSA v mikrobiologické laborato i**

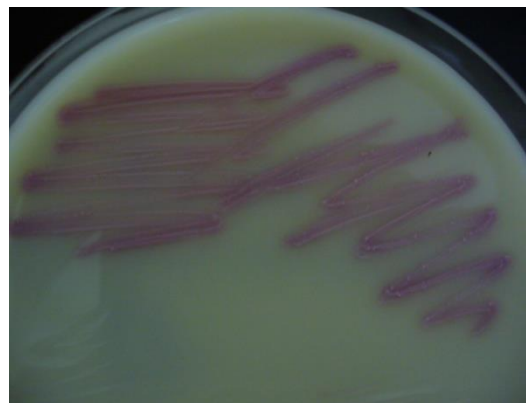
P í zjižt ní rezistence izolovaného kmene *S. aureus* na oxacilin (resp. cefoxitin) se provádí testy k detekci methicilin rezistentního kmene *S. aureus*.

isté kultury se o kují na komer n dodávanou chromogenní selektivní p du MRSAselect ě od firmy Bio-Rad. Jedná se o selektivní chromogenní kultiva ní médium pro kvalitativní detekci MRSA (Obr. 2). Chromogeny vznikají navázáním barevné molekuly zvané chromofor na b Oný substrát. Vzniklý chromogen je bezbarvý. Vazbu mezi ob ma ástmi molekuly rozružují specifické enzymy p ítomné v bakteriální bu ce. Mikrob pokládá chromogen za substrát, absorbuje ho a p ísluzným enzymem rozžt p í na p vodní dv ásti. Substrát vyu0ije k svému metabolismu. Uvoln ý barevný chromatofor je nerozpustný a hromadí se v bu ce. Výsledkem je r st mikroba v typicky r 0ov zbarvených koloniích (Obr. 2, 3) [25].

Obr. 2: Chromogenní p ůda MRSASelect ě



Obr. 3: R ůst MRSA na MRSASelect ě



(P ůevzato z: vlastní zdroj)

Sou aasn ů v ůzkum ukazuje, ůe k identifikaci MRSA je vhodn ě j ů p ěm ů detekce genetick ěho k ůdu determinanty methicilinov ě rezistence (*mecA*) pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction, polymer ůzov ů et zov ů reakce). Jedn ů se v z a k o n ůkladnou a technicky n ůro nou metodu. Postup shrnuje tabulka 1. [32].

Tabulka 1. Amplifikace *mecA* genu pomocí PCR

Vyzet ovan ů kmen	24 hodinov ů kultura na ůivn ěm agaru
Negativn ě kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (nebo jeho kopie CNCTC 5481).
Pozitivn ě kontrola	<i>S. aureus</i> ATCC 27626 (kontrola detekce <i>mecA</i> genu).
Inokulum	Do mikroz kumavky s 0,5 $\mu$ l lysostafinu (10mg/ml) a 20 $\mu$ l roztoku TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8) se p ěd ů inokulum 1 $\mu$ l kli kou.
Koncentrace inokula	$1,5 \times 10^9$ bun k.
Kontrola amplifikace	Primery pro 16S rRNA (kontrola spr ůvn ě p ěpraven ě templ ůtov ě DNA)
L ůza bun k	Inkubace 37 $^{\circ}$ C/15 min.
Denaturace	95 $^{\circ}$ C/15 min.
Na ed n ě vzorku	P ěd ů se 180 $\mu$ l neionizovan ě vody, obsah

	se řádně protřepe na vertexu.
Odstranění drt	Centrifugace 13000 g/5 min.
Templát	2 µl supernatantu (do 50 µl PCR reakce)
Primery	RSM 2647: 5´ -AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C -3´
	RSM 2648: 5´ -AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTGC -3´
Detekce	10 µl vzorku po amplifikaci, elfo; 2% agaróza, 1 hod.
Odeřtání	Pozitivní ř. ampikon (fragment DNA) velikosti 533 bp.
	Negativní ř. řádný ampikon specifické velikosti.
Přímé chyby	Kontaminace negativních vzorků prostřednictvím DNA pozitivních vzorků nebo pozitivní kontroly (zdroj kontaminace ř. pipety, roztoky, neadekvátní prostorové podmínky pro PCR).
	Nízká senzitivita reakce ř. málo nebo příliš koncentrované inokulum (interference jiných součástí buněk nebo ingrediencí použitých při přípravě templátu).
	Jiný než popsán způsob manipulace s ingrediencemi (falešná negativita).
	Malé množství vzorku pro detekci (falešná negativita)

Převzato z: Zprávy CEM (SZÚ, Praha); *Mikrobiologický případ MRSA, GISA a GRSA.*, Metodický list ř. 18, 25.2.2003, NRL pro antibiotika SZÚ[32].

Pro rutinní použití je vhodnější jednodušší a levnější metoda ř. latexová aglutinace (detekce PBP2a, obsaženého v buněčné membráně MRSA) [19, 20] (podrobněji viz kapitola 3.2.1).

## **2.2.3 Prevence MRSA**

### **2.2.3.1 Zdroje a cesty p enosu**

Zdrojem je infikovaný pacient nebo nosič MRSA. Nosičem je obvykle osoba bez jakýchkoliv známek infekce. Nosičství se vyskytuje nejčastěji na nosní sliznici, na kůži (perineum, třísla, axily, hýždě), méně v laryngu. Vyzetáním vzorků z nosu, krku a perinea lze prokázat až 98,3% nosičů MRSA. Nosičství u zdravých osob může být přechodné například u zdravotnického personálu. Při akutním respiračním infektu se zvyšuje riziko přenosu MRSA. Obzvláště nebezpečným zdrojem zoonózy je chronický nosič, který se kolonizoval při pobytu v zdravotnickém zařízení. Nosičství MRSA může přetrvávat několik týdnů, měsíců let. Dokonce může být i intermitentní a tím i mikrobiologicky těžko prokazatelný [24].

Nemocniční prostředí je zvláště vhodné pro snadné zoonózy MRSA. Přenos MRSA v nemocnicích dochází nejčastěji přímo rukama zdravotnického personálu z pacienta na pacienta, ale méně často pomocí výtěrů, ovcích a jiných pomůcek [23].

### **2.2.3.2 Opatření při výskytu MRSA na oddělení**

Při výskytu MRSA na oddělení se hledá zdroj nákazy a provádí se příslušná hygienická opatření. Pacient nesmí být pozkozen omezením léčebné péče a neposkytnutím potřebných výtěrů. Zdravotnické zařízení si na základě charakteru poskytované péče a spektra pacientů stanovuje vlastní konkrétní postupy pro celou nemocnici.

Opatření při výskytu MRSA v Oblastní nemocnici Jičín je následovné:

Izolace pacienta je nutná při každém zjištění pozitivního nálezu MRSA.

## **Pacient**

- Izolace osídleného pacienta, pacient musí mít při kontaktu s personálem ústenku
- Zařadit pacienta při vyšetření na konec programu
- Vylenění pomůcek (pokud nejde o jednorázové pomůcky, nutno po použití dezinfikovat) a vlastní osobní potřeby, včetně nádobí pouze pro osídleného pacienta
- Vezkeré prádlo pacienta sbírat na pokoji do kontejneru a označit jako infekční
- Dokumentaci pacienta nejlépe nechat na inspekčním pokoji (nepřenášet)
- Provádět důkladnou hygienu pacienta za použití dezinfekčního prostředku s účinností na MRSA (omývat celé tělo . např. přípravek Prontoderm . výrobce B.Braun Melsungen, AG; Neomeco). K oplachu ran je nabízen přípravek Prontosan . výrobce B.Braun Melsungen, AG; Neomeco)
- Úklid provádět alespoň 2x denně, výhradně navlhko dezinfekčním prostředkem s prokázanou účinností na MRSA
- Při překládání pacienta informovat následné oddělení nebo zařízení (i v případě jen převozu na speciální vyšetření)
- Při propouštění informovat rodinu

Pacient nesmí být pozkozen omezením léčebné péče a neposkytnutím potřebných vyšetření. Pacient musí být citlivě a důsledně informován, včetně jeho rodiny.

## **Ošetřující personál**

Vezkerý ošetřující personál musí bezpodmínečně dodržovat bariérovou ošetřovací techniku při kontaktu s osídleným pacientem:

- Používat osobní ochranné pomůcky (rukavice, ochranný plášť, ústenku, eventuálně krytí hlavy)



- Dodržovat osobní hygienu (p evlékání, mytí a dezinfekce rukou i po použití rukavic, zákaz nošení prstenů a nalakovaných dlouhých nehtů)
- Odložit použité oděvy a zanechat na pokoji po dobu jedné směny téhož pracovníka, rukavice po použití zlikvidovat do infekčního odpadu
- Důsledná dekontaminace nástrojů před vlastní sterilizací [36].

## Hygiena rukou

Hygiena rukou představuje základní krok k zajištění bezpečnosti pacienta a je tedy klíčovým postupem v prevenci a kontrole výskytu MRSA. Správné mytí rukou ilustruje Obr. 4 a obdobně se postupuje i při dezinfekci rukou.

Obr. 4: Postup při mytí rukou

# Postup při **mytí** rukou

**MYJTE SI POUZE VIDITELNĚ ZNEČIŠTĚNÉ RUCE, JINAK POUŽÍVEJTE DEZINFEKCI!**

**🕒 Doba trvání celé procedury: 40–60 vteřin**



(Převzato z: [http://www.tvrtm.cz/magazin/foto/14398\\_4250.jpg](http://www.tvrtm.cz/magazin/foto/14398_4250.jpg) [22])

## **2.2.4 Infekce vyvolané MRSA**

Nejčastěji infekce vyvolané kmeny MRSA lze očekávat v souvislosti se zaváděním intravenózních kanyl a katétrů, kde může dojít k následné kolonizaci po jejich zavedení.

Jedná se především o sepse a sekundární hematogenní infekce spojené se zavedeným centrálnímžilným katétre, infekce hemodialyzovaných pacientů, infekce chronických ran, pooperační infekce ran a obecně o infekce spojené s invazivními vyšetřeními a výkony u ventilátorových a aspiračních pneumonií.

### **2.2.4.1 Riziko výskytu MRSA na jednotlivých odděleních**

Bergerová a kol. (2005) popisují, že s z hlediska rizika výskytu MRSA lze rozdělit lékařské obory rámcově do následujících kategorií:

**Riziková skupina 1 – vysoké riziko:** Intenzivní péče, popáleninová a transplantační oddělení, kardiovaskulární chirurgie, neurochirurgie, ortopedie, traumatologie, specializovaná centra se zřetelovou spádovou oblastí. U pacientů uvedených oborů je současně nejvyšší riziko vzniku závažných, klinicky manifestních infekcí vyvolaných MRSA.

**Riziková skupina 2 – střední riziko:** Všeobecná chirurgie, urologie, neonatologie, gynekologie a porodnictví, dermatologie, ORL.

**Riziková skupina 3 – nízké riziko:** Standardní lůžková péče interních oborů, neurologie, pediatrie.

**Riziková skupina 4 – specifické riziko:** Psychiatrie, léčebny pro dlouhodobě nemocné a následná péče. Na tato oddělení mohou být při přijímání chronicky kolonizovaní pacienti, kteří mohou být zdrojem multirezistentních kmenů směřem k zařízením poskytujícím akutní péči (příklady osídlených pacientů). U většiny pacientů uvedených oborů existuje minimální riziko vzniku závažných, klinicky manifestních infekcí vyvolaných MRSA. Pravděpodobnost detekce MRSA je proto minimální, protože především nejsou mikrobiologicky

vyzetení z klinické indikace. Toto dle není je pouze orientační a v různých zdravotnických zařízeních se může měnit míra rizika na jednotlivých odděleních zdravotnických zařízení [21].

### **2.2.5 Léčba MRSA**

MRSA je rezistentní k penicilinovým antibiotikům, jako jsou methicilin, oxacilin, penicilin a amoxicilin ale také bývá rezistentní i na další antibiotika (cefalosporiny, klindamycin, aminoglykosidy).

Rozšíření MRSA dopadá nejvíce na nemocniční zařízení, v nichž se multirezistentní stafylokoky staly součástí nemocniční mikroflóry. V současné době patří mezi hlavní původce nosokomiálních infekcí [18].

Kolonizace MRSA není dle vedena k antibiotické léčbě, opatření se provádí jen u imunokompromitovaných nemocných nebo u nemocných s opakovanými infekcemi MRSA. Lékem volby je nejčastěji vankomycin. Alternativně je možno podat teikoplanin (Targocid - výrobce SANOFI, Velká Británie), linezolid (Zyvoxid - výrobce PFIZER, Belgie) a tigeckylin (Tigacyl - výrobce WYETH PHARMACEUTICALS COMPANY, USA). Při kolonizaci nosní sliznice je možno podat mupirocin (Bactroban nasal - výrobce GLAXO SMITH KLINE, Velká Británie) ve formě masti [15], [16], [17].

## 3. PRAKTICKÁ ÁST

### Cíle praktické ásti

V teoretické ásti jsem objasnila základní pojmy a popsala rod *S. aureus* a popísala jeho rezistenci na methicilin (oxacilin). V této praktické ásti dále popíšu jednotlivé identifikační testy, kterými jsem rozlízila a správně zařadila kmen *S. aureus* a následně pak metodu pro prkaz MRSA v istých kulturách *S. aureus* a metody pro stanovení citlivosti MRSA k antimikrobním látkám.

Mým dalším cílem bude statisticky vyhodnotit výskyt izolát MRSA v Oblastní nemocnici Jiín (nemocnice Jiín a Nový Bydov) a v Oblastní nemocnici Mladá Boleslav během období 2011-2013.

### 3.1 Biochemické testy

K rozlizení a přesné identifikaci kmen *S. aureus* jsem použila:

- katalázový test
- prkaz hyaluronidázy
- prkaz vázané koagulázy
- prkaz volné koagulázy
- STAPHYtest 16, 24

Pomcky, materiál a pístroje: bakterie *Streptococcus equi*, krevní agar s přidáním 5% defibrinované beraní krve (výrobce BIO-RAD, USA), sterilní fyziologický roztok (připravován na varně podle Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Jiín) králíčí nebo prasečí plazma, souprava DiamondL Staph Plus Kit (výrobce DiaMondiaL, Rakousko), souprava STAPHYtest 16,24 a inidla používaná pro tuto soupravu (výrobce Erba Lachema, eská republika), inidla a diagnostické prouky pro doplňkové testy u soupravy

STAPHYtest 16,24 (výrobce Erba Lachema, česká republika), termostat temperovaný BT 120 temperovaný na teplotu 37 +/- 2°C (LABO-MS spol.s.r.o., Praha), Denzilometr II Emo Brno (Emo Brno, česká republika), zkumavky, bakteriologické kličky, podložní sklo, pipety, peroxid vodíku, sterilní parafinový olej

Ke kultivaci *S. aureus* je důležité, aby se klinický materiál naočkoval na krevní agar. Je to dominantní půda pro řadu stafylokoků. Slouží pro zachycení gram pozitivních bakterií. Sleduje se na něm hemolýza stafylokoků.

Čistá kultura stafylokoků rostoucích na krevním agaru vytváří pigmentované kolonie s hemolýzou v okolí nebo bez hemolýzy, případně bílé kolonie. Při mikroskopickém hodnocení tyto kolonie obsahují gram pozitivní koky ve shlucích. Izolované kolonie jsou dále podrobeny vyšetřeními uvedenými testy.

### **3.1.1 Katalázový test**

Principem tohoto testu je ztpení peroxidu vodíku za pomoci enzymu katalázy na kyslík a vodu [1].

Test se provádí na podložním sklíčku, na které se nanese kapka 3 % peroxidu vodíku, kličkou se nabere část kolonie testované kultury a zamíchá se s kapkou peroxidu. V případě pozitivního výsledku dochází k okamžité reakci s výraznou tvorbou bublinek. U negativního výsledku k reakci nedochází.

### **3.1.2 Prkaz hyaluronidázy**

Hyaluronidáza je enzym, který ztpení kyselinu hyaluronovou a chondroitinsulfát na tetrasacharidy. Pro prkaz hyaluronidázy se používá dekapsulační test, kde je zapotřebí opouzděná bakterie *Streptococcus equi*, jeho pouzdra obsahují kyselinu hyaluronovou.

K masivnímu naokrouhlenému *Streptococcus equi* o šířce asi 1,5 cm na krevním agaru, se kolmo udělá asi 1 cm dlouhá čára testovaného stafylokoka. Test se vyhodnocuje po 18 hodinách při inkubaci 37 °C. Pokud se jedná o *S. aureus*, objeví se v jeho blízkosti přibližně kruhová zóna bez hlenovitého nárstu svídnoucí o ztrátu pouzdra (dekapsulaci) bakterie *Streptococcus equi* [27].

### 3.1.3 Průkaz vázané koagulázy

Vázaná koaguláza (angl. clumping-factor) patří mezi povrchové antigeny, který váže fibrinogen a následně ho přivazuje na fibrin. Výsledkem je shlukování buněk stafylokoka [1].

Orientačně odlišují kmeny *S. aureus* od jiných stafylokoků s negativní vázanou koagulázou například *Staphylococcus epidermidis*. Proto v případě negativního výsledku, je potřeba dále otestovat zkoumaný kmen průkazem volné koagulázy [1].

Test se provádí na podložním sklíčku. Na sklo se nanese několik kapek sterilního fyziologického roztoku, ve kterém se smíchá testovaná kultura tak, aby suspenze byla méně zakalená. K suspenzi se přidá kapka králičí nebo prasečí plazmy a promíchá se. Současně se provádí i negativní kontrola, kde plazma je nahrazena fyziologickým roztokem. V případě positivity dochází ke shlukování a aglutinaci, která se pozoruje oproti černému pozadí.

V naší laboratoři používáme pro průkaz vázané koagulázy soupravu DiaMondial Staph Plus Kit (výrobce DIAMONDIAL, Rakousko). Souprava slouží k detekci nejen vázané koagulázy, ale i proteinu A a kapsulárních polysacharidů *S.aureus*.

Souprava využívá polystyrenové latexové částice senzibilizované fibrinogenem a IgG (imunoglobulin skupiny G) specifickými pro kapsulární antigeny 5 a 8 *S. aureus*. Pokud se latexové reagentie smíchají s koloniemi stafylokoka obsahujícími buď vázanou koagulázu, protein A nebo kapsulární

antigeny 5 nebo 8, dochází k výrazné aglutinaci latexových částic [29], [30].

#### Komerční souprava: DiaMondiaL Staph Plus Kit

- Staph Plus Latex Reagent (latexová reagencie)

Dvě lahvičky, každá obsahující 2,5 ml latexových částic potažených králičím IgG proti *S. aureus* s kapsulárními antigeny 5 a 8 a proti lidskému fibrinogenu. Latexové částice jsou suspendovány v pufru obsahujícím 0,098% azid sodný jako konzervační látku.

- Latex Negative Control (latexová negativní kontrola)

Jedna lahvička obsahující 2,5 ml nesenzibilizovaných latexových částic suspendovaných v pufru obsahujícím 0,098% azid sodný jako konzervační látku.

Před provedením testu se nechá souprava vytemperovat na pokojovou teplotu a reagencie se protěpou. Do jednotlivých testovacích polí na kartičce se nanese jedna kapka latexové reagencie Staph Plus Latex Reagent. Pomocí míchací tyčinky se přenesou do testovacího pole dvě suspektní kolonie a rozmíchají v latexové reagentii v celém testovacím poli. Krouživým pohybem se krouží kartičkou tak, aby směs pokryla celé testovací pole. Po dvaceti vteřinách se odečítá aglutinace při normálním světle.

Při pozitivním výsledku dochází k rychlému výraznému shlukování (k výrazné aglutinaci) s latexovou reagentií a žádné aglutinaci s latexovou negativní kontrolou. Reakce objevující se až po 20 vteřinách se nehodnotí.

Při negativním výsledku není přítomná žádná viditelná aglutinace latexových částic.

### **3.1.4 Pr kaz volné koagulázy**

Jedná se o zkumavkovou metodu, která slouží k odlizení koagulázapozitivních stafylokoků od koagulázanegativních. Do aglutinačních zkumavek se napipetuje 0,5ml lyofilizované králičí citrátové plasmy. K plasmě se přidají kolonie, které se dobře rozmíchají. Zkumavky jsou následně inkubovány v termostatu 3 hodiny při 37 °C a do druhého dne při laboratorní teplotě. Výsledek reakce se odečítá po 1, 3 a 24 hodinách, kde se pozoruje vznik koagula.

U kmenů *S. aureus* dochází k aglutinaci už po 1 hodině, na rozdíl od kmenů *Staphylococcus intermedius*, kde dochází k opožděné reakci (shluk se vytvoří až po 3 hodinách) [28].

V naší laboratoři ve sporných případech test reakce opakujeme, případně provádíme další důročení kmene pomocí STAPHY testu (STAPHY test 16, 24).

### **3.1.5 STAPHY test**

STAPHYtest 16 resp. 24 (výrobce Erba Lachema, Česká republika) umožňuje identifikaci stafylokoků a dalších gram pozitivních, kataláza pozitivních koků pomocí 16 resp. 24 biochemických testů. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrantní destičky ve dvou resp. třech řadách po osmi. Identifikace se doplňuje VP testem (Voges-Proskauer test, test na prkaz tvorby acetoinu) ve zkumavce. Jako doplňkové testy lze provést OXI-test (test pro detekci cytochromoxidázy) a PYRA-test (detekce aktivity pyrrolidonylarylamidázy, PYRázy). Všechny testy jsou dodávány ve formě diagnostických proužků (výrobce Erba Lachema, Česká republika).

Vyzetují se gram pozitivní koky. Z 24 hodinové kultury se připraví ve fyziologickém roztoku suspenze a dobře se rozmíchá. Zákal musí odpovídat 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. K ověření identity inokula se



provede ze suspenze křídlový roztěr na krevní agar. Čistota kultury se kontroluje po 24 hodinové inkubaci při 37 °C. V případě slabého nárůstu kultury se prodlouží inkubace testu o 24 hodin. Bakteriální suspenzi před použitím dle kladné kontroly a inokulujeme 0,1 ml do všech jamek průslužných dvou resp. tří sad destičky. Po inokulaci se zakapou sterilním parafinovým olejem: jamky ve sloupci H, G a F prvního řádku (ureáza, arginin, ornitin). Do cca 1ml bakteriální suspenze ve zkumavce se vloží proušek VP testu a zkumavka se uzavře (případně se provedou další doplňkové testy). Destička se nechá inkubovat při 37 °C společně s VP testem. VP test se inkubuje 1,5 hodiny a destička 24 hodin.

Růst bakterií v jednotlivých jamkách je indikován barevnou změnou indikátoru. Po inkubaci vysokoškolský pracovník odečítá výsledky dle výrobcem dodávané barevné zkály pro interpretaci výsledků (viz Obr.5) [35].

Obr.5: Barevná zkála pro interpretaci reakcí biochemického kitu STAPHYtest 16 firmy Erba Lachema

STAPHYtest 16								
Barevná škála / Farebná stupnica / Colour scale / Цветная шкала / Porównawcza skala barw / Színskála / Farbskala / Escala de colores								
1	H	G	F	E	D	C	B	A
	URE	ARG	ORN	bGA	GLR	ESL	NIT	PHS
(+)	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Black	Red	Red
(-)	Yellow	Orange	Orange	White	White	White	White	White
2	H	G	F	E	D	C	B	A
	GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC
(+)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
(-)	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple
VPtest					OXItest			
(+)	Red				Blue			
(-)	White				White			
MIKROTEST®					BLUE POINT OF QUALITY			

Legenda: H, G, F, E, D, C, B, A . písmenné označení sloupců kitu; 1, 2 . číselné označení sady biochemických testů; +/- pozitivní/negativní výsledek; Biochemické testy 1. řádku: URE- ureáza, ARG- arginin, ORN- ornitin, bGA- galaktozidáza, GLR- glukuronidáza, ESL- eskulin, NIT- nitráty, PHS- fosfatáza. Biochemické testy 2. řádku: GAL- galaktóza, SUC- sacharóza, TRE- trehalóza, MAN- mannitol, XYL- xylóza, MLT- maltóza, MNS- mannóza, LAC- laktóza. Další kové testy: VPtest- acetoin, OXItest- oxidáza

(Převzato z: vlastní zdroj)

## 3.2 Metody používané pro prkaz a ur ení citlivosti MRSA na antimikrobní látky

Pro prkaz MRSA se vyu0ívá latexová aglutinace, dále metoda PCR (v nazí laborato i se neprovádí, podrobn ji viz kapitola 2.2.2). Za ú elem ur ení citlivosti MRSA na antimikrobní látky se provádí kvalitativní diskový difúzní test a kvantitativní stanovení minimální inhibi ní koncentrace.

### 3.2.1 Prkaz MRSA latexovou aglutinací

K identifikaci MRSA slou0í velice rychlý a citlivý aglutina ní test na karti kách, souprava MRSA-Screen (výrobce Denka Seiken, Japonsko). Tato souprava obsahuje latex senzibilizovaný monoklonální protilátkou se specifitou proti PBP2a kontrolní latex a reagentie k rychlé detekci PBP2a z bakteriálních bun ných membrán MRSA. Extrakty se p ipraví pova ením bun né suspenze *S. aureus* v alkalickém prost edí a následnou neutralizací a odst ed ním. Supernatant se pak promíchá na testovací kart s latexovými indy a viditelná aglutinace do t í minut se senzibilizovaným, ale nikoli s kontrolním latexem, indikuje pravd podobnou p ítomnost MRSA (Obr. 7).

Obr.7 Souprava MRSA-Screen (výrobce Denka Seiken, Japonsko)

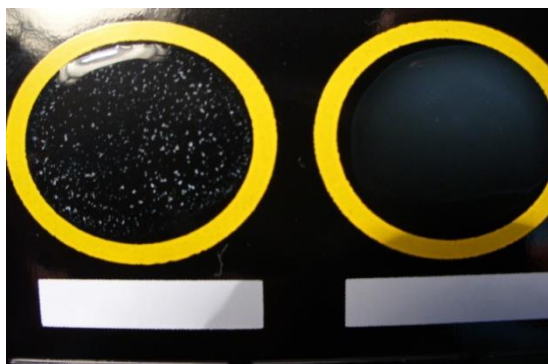


(P evzato z: vlastní zdroj)

Pomůcky, materiál a přístroje: izolované kolonie *S. aureus*, souprava MRSA-Screen (výrobce Denka Seiken, Japonsko), centrifuga (MPW 340, Mechanika Precyza, Polsko), stojan s azbestovou sítí, kádinka, kahan, zkumavky, bakteriologické kličky, mikropipeta a zpičky

Do mikrocentrifugální zkumavky nebo jiné vhodné nádoby se kápnou 4 kapky (200  $\mu$ l) extrakčního inidla . 1. Pomocí bakteriologické kličky se nabere dostatečné množství vyrostlých bakterií (4-5 velkých kolonií) a rozmíchá se ve zkumavce. Zkumavka se uzavře a vloží na 3 minuty do vodní lázně při 100 °C. Poté se vyjme a nechá vychladnout na pokojovou teplotu. Do zkumavky se přidá 1 kapka (50  $\mu$ l) extrakčního inidla . 2 a obsah se dobře promíchá. Proveďte se centrifugace po dobu 5 min. při 1500 x g nebo odpovídajících otáčkách, tj. 3000 ot./min při průměru rotoru 15 cm. Supernatant se použije jako vzorek. Do testovacího i kontrolního kroučku se nanese 50 l vzorku. Do testovacího kroučku se přidá 1 kapka (25  $\mu$ l) senzibilizovaného latexu a do kontrolního kroučku 1 kapka (25  $\mu$ l) kontrolního latexu. Dvěma rznými míchadélky se dkladně rozmíchá inidlo na ploše každého kroučku se vzorkem. Testovací karta se otáčí 3 minuty v ruce, nebo na otáčivé podložce. Pouhým okem se odeítají aglutinační struktury (Obr. 8).

Obr. 8 Testovací karta s pozitivním výsledkem (vznik aglutinátu nalevo) a negativním výsledkem (napravo)



(Převzato z: vlastní zdroj)

Pozitivní výsledek se jeví jako bílé shluky a methicilin rezistentní *S. aureus* je tímto potvrzen. V případě negativního výsledku se jedná o methicilin rezistentní plasma koaguláza negativní stafylokoky [31].

### **3.2.2 Ur ení citlivosti MRSA na antimikrobní látky**

#### **3.2.2.1 Diskový difuzní test**

Tato metoda pro ur ení citlivosti mikroba na antimikrobní látky je v mikrobiologii nejrozšířenější. Pro testování citlivosti se nejčastěji používají papírové disky, které jsou napuštěné p ísluzným množstvím antibiotika. Disky se kladou na p ídu, na které je nao kován testovaný mikroorganismus, nejčastěji p ídu Mueller-Hinton (MH) s obsahem 4% NaCl, pomocí dávkovacího razi e. V p ípad , 0e je testovaný mikroorganismus citlivý na antibiotikum obsažené v papírovém disku, kolem disku se vytvá í inhibi ní zóna r stu mikroorganismu.

Pomcky, materiál a p ístroje: Mueller-Hinton agar (BIO-RAD, USA), sterilní fyziologický roztok s glukózou (p ípravován na varn p íd Odd lení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Ji ín), souprava McFarlandových standard (PRO-LAB DIAGNOSTICS, Kanada), antibiotické disky: oxacilin-1 $\mu$ g, cefoxitin-30  $\mu$ g (BIO-RAD, USA), dispenzor nebo jehla, termostat BT 120 temperovaný na teplotu 37 $\pm$  2 $^{\circ}$ C (LABO-MS spol.s.r.o., Praha)

Fyziologický roztok s glukózou se nao kuje odpovídající koncentrací bun k *S. aureus* (srovnání s McFarlandovým standardem 0,5) a homogenizuje se. Touto suspenzí se p elije Mueller-Hinton v agar, naklán ním plotny na všechny strany je dosaženo stejnom rné inokulace. P ebyte ná tekutina se slije a odsaje. K testování se používají standardní antibiotické disky s obsahem oxacilinu a cefoxitinu, které se skladují v chladni ce, zásobní disky v mrazicím

boxu (p i - 18 a0 - 20°C). Disky se kladou na povrch suchých inokulovaných p d jehlou nebo se pou0ije dispenzor.

Plotny se inkubují p i 37 °C 18-24 hodin. Po inkubaci je velikost inhibi ní zóny ode ítána V¥ pracovníkem.

#### Hodnocení:

Velikost inhibi ní zóny pro oxacilin (1µg) : MRSA vytvá í inhibi ní zóny < 6-19 mm

Velikost inhibi ní zóny pro cefoxitin(30 µg) : MRSA vytvá í inhibi ní zóny <20 mm

Pro ov ení výsledk diskového difúzního testu se pou0ije latexová aglutinace (viz kapitola 3.2.1) a nebo PCR (viz kapitola 2.2.2).

#### **3.2.2.2 Stanovení minimální inhibi ní koncentrace**

Minimální inhibi ní koncentrace (MIC, Minimal Inhibition Concentration) je d le0itým ukazatelem rezistence mikrob na antimikrobiální látky. Jedná se o nejni0zí koncentraci antibiotika, která je jezt schopna potla it r st testovaných mikroorganism po 24hodinové inkubaci p i 37 °C [26].

Pom cky, materiál a p ístroje: izolované kolonie *S. aureus*, mikrotitra ní destičky *Staphylococcus* pro stanovení MIC stafylokok (TRIOS, eská republika), bujón Todd Hewitt Broth (Laboratorios Conda, S.A., ¥pan lsko), sterilní fyziologický roztok s glukózou (p ipravován na varn p d Odd lení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Ji ín), souprava Mc Farlandových standard (PRO-LAB DIAGNOSTICS, Kanada), termostat BT 120 temperovaný na teplotu 37 +/- 2°C (výrobce, zem ), sterilní inokulátory s jehlami, Petriho misky

Mikrotitrační destičky se nechají rozmraznout. Připraví se bujónová kultura (THB bujón, Todd Hewitt Broth). Při přípravě inokula gram pozitivních koků se otkuje 4-5 kolonií do 2ml TB bujónu a bujónová kultura se inkubuje 2-3 hodiny při 37 °C. Bujónová kultura se ředí 1:50 tj. 4-5 kapek do 10 ml fyziologického roztoku. Pomaleji rostoucí kmeny se ředí 1:5, tj. celé 2 ml bujónové kultury se přidají do 10ml fyziologického roztoku. Inokulum by mělo mít hustotu  $10^8$  CFU (Colony Forming Unit, kolonie tvořící jednotka)/ml, což odpovídá 0,5. Stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Při inokulaci destiček je cílem dosáhnout hustotu asi  $10^6$  CFU/ml v jamce. Objem testovací sondy v jamce je 100 $\mu$ l a otkováním jehlou se inokuluje asi 1 $\mu$ l. 10ml inokula se nalije do Petriho misek a sterilní inokulátor se 48 jehlami se ponoří do inokula a přenesou se do jamek destičky. Postup se opakuje s dalším sterilním inokulátorem. Destičky se inkubují 24 hodin při 37°C.

Vysokozkolský pracovník odečítá po inkubaci na prohlížečce se zvláštním zrcadlem podle předložených tabulek. Jako MIC se označuje nejnižší koncentrace antibiotika v jamce, její obsah zůstal nezakalený. Je nutno srovnat s ředěním v kontrolní jamce. Drobné tečky a neistoty se nehodnotí.

### 3.3 Statistické zhodnocení

Pro statistické zhodnocení byla použita data z dokumentace Oddělení klinické mikrobiologie v Oblastní nemocnici Jičín (nemocnice Jičín a nemocnice Nový Bydov) a Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Mladá Boleslav. Byl sledován záchyt izolát *S. aureus* a MRSA za období 2011 - 2013.

Výskyt MRSA v nemocnici Jičín v jednotlivých měsících za období března 2011 až červen 2013 ukazuje Graf 1. Z něj je patrné, že četnost záchytu MRSA vzrostl v březnu 2011, v dubnu a listopadu 2012. Naopak některá období se vyznačovala nulovým záchytem.

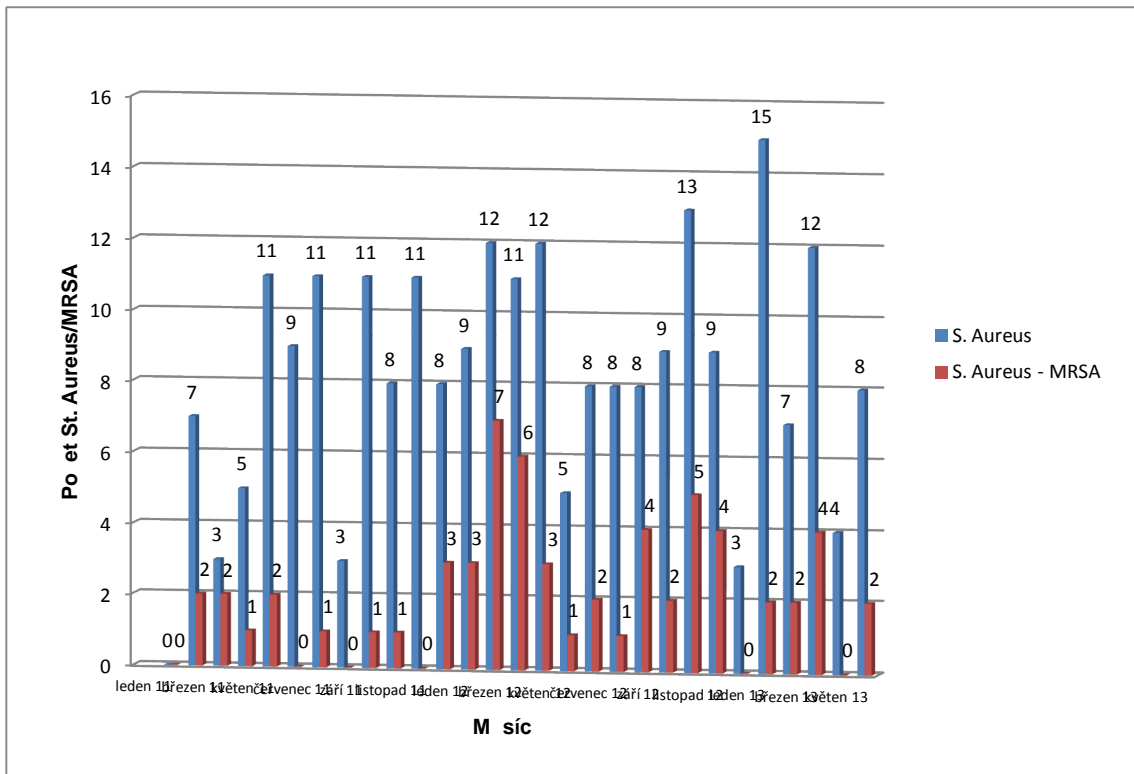
Záchyt MRSA v nemocnici Nový Bydov za období března 2011 až červen 2013 je zobrazen v Grafu 2. Z Grafu 2 je patrný zvýšený výskyt MRSA v porovnání s Grafem 1 a 3. Nejvíce případů bylo zaznamenáno v lednu, březnu 2012 a v dubnu 2013. Četnost izolátů v jednotlivých měsících, které ukazují křivky v Grafu 2, je srovnatelná a z grafu je patrné, že MRSA v nemocnici Nový Bydov přetrvává.

V Grafu 3 je zobrazen výskyt MRSA v nemocnici Mladá Boleslav za období března 2011 až červen 2013. Graf 3 ukazuje na nejmenší výskyt MRSA v porovnání s Grafem 1 a 2.

Z hlediska zjevení MRSA v Oblastní nemocnici Mladá Boleslav lze situaci charakterizovat jako stabilizovanou, vcelku příznivou a zdá se, že tato multirezistentní bakterie zde v této chvíli nepředstavuje zásadní terapeutický problém.



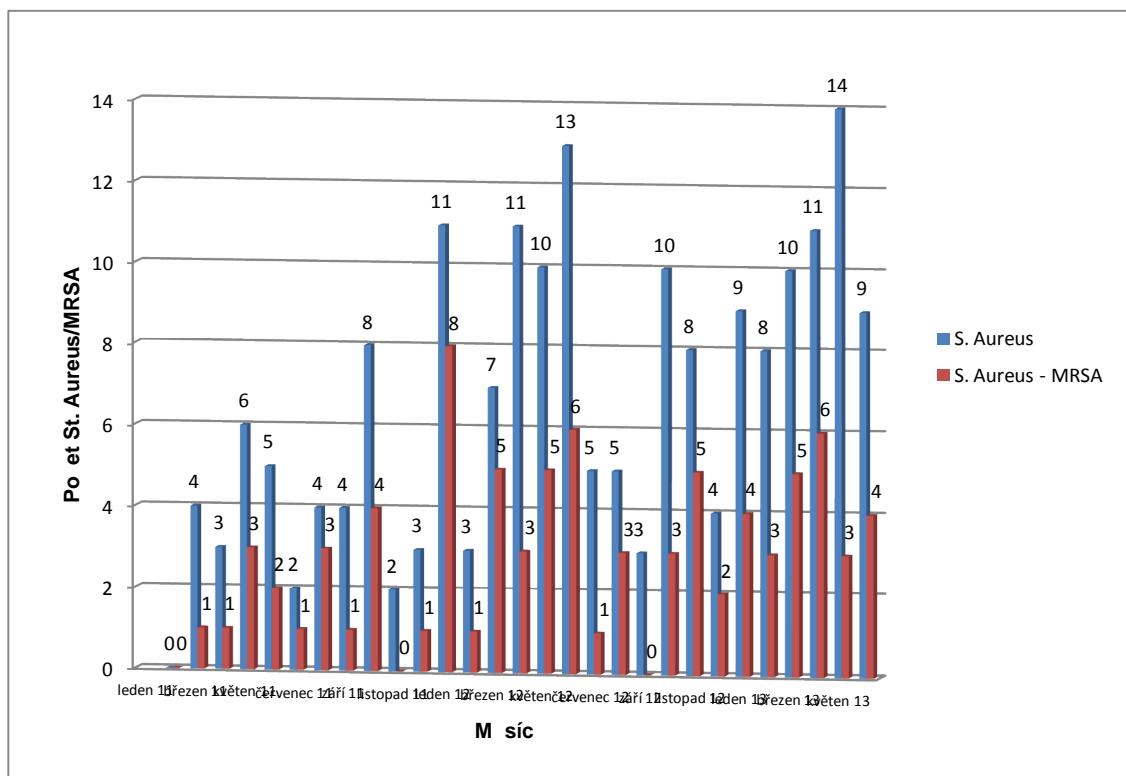
Graf 1. Výskyt MRSA v nemocnici Ji ín - m sí ní incidence za období 2011-2013



Legenda: Po et *S.aureus* (na ose y, modrý sloupec) . po et pacient , u kterých byl izolován a prokázán kmen *S.aureus*. MRSA (na ose y, červený sloupec) . po et kmen MRSA z celkového po tu izolovaných *S. aureus* za dané období. M síc (na ose x) . izolované kmeny za období b ezen 2011 . erven 2013.

(Informace získané z archivace Odd lení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Ji ín)

Graf 2. Výskyt MRSA v nemocnici Nový Byd0ov - m sí ní incidence za období 2011-2013

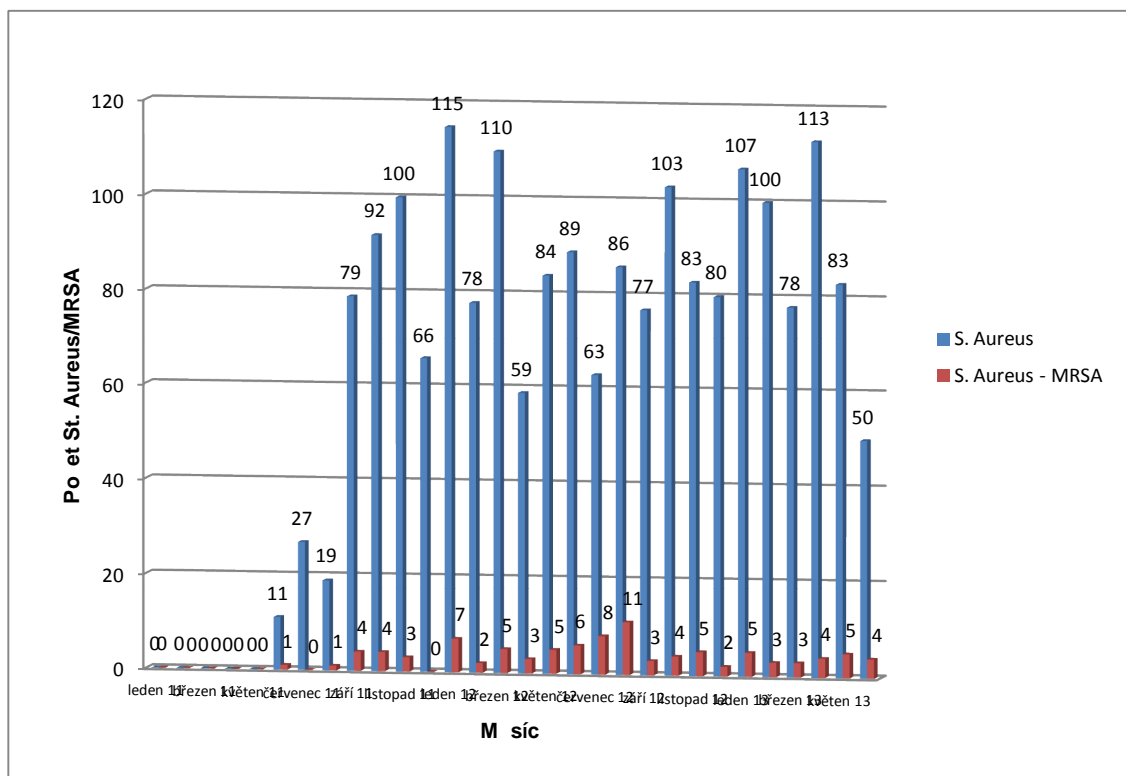


Legenda: Po et *S.aureus* (na ose y, modrý sloupec) . po et pacient , u kterých byl izolován a prokázán kmen *S.aureus*. MRSA (na ose y, červený sloupec) . po et kmen MRSA z celkového po tu izolovaných *S. aureus* za dané období. M síc (na ose x) . izolované kmene za období b ezen 2011 . červen 2013.

(Informace získané z archivace odd lení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Ji ín)

Graf 2 poukazuje na zvýšený výskyt MRSA v porovnání s Graf 1. Nejvíce p ípadu bylo zaznamenáno v roce 2012- 2013. Z grafu je patrné, že MRSA v Novém Byd0ov p etrvává. V grafu je znázorn n po et izolát *S. aureus* a MRSA v Novém Byd0ov .

Graf 3. Výskyt MRSA v Oblastní nemocnici Mladá Boleslav - měsíční incidence za období 2011-2013



Legenda: Počet *S.aureus* (na ose y, modrý sloupec) . počet pacientů, u kterých byl izolován a prokázán kmen *S.aureus*. MRSA (na ose y, červený sloupec) . počet kmenů MRSA z celkového počtu izolovaných *S. aureus* za dané období. Měsíc (na ose x) . izolované kmeny za období červen 2011 . červen 2013

(Informace získané z archivace Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Mladá Boleslav)

### 3.3.1 Procentuální vyjádření záchyty MRSA

V jednotlivých tabulkách jsou zobrazena data vycházející z Grafu 1, 2, 3. Jedná se o procentuální vyhodnocení záchyty MRSA v nemocnici Jičín (nemocnice v Jičíně a v Novém Bydlově) a v nemocnici Mladá Boleslav.

Tabulka 2. Procentuální vyjádění záchytu MRSA v nemocnici v Jiříně za období 2011 - 2013

<b>Procentuální vyjádění záchytu MRSA v nemocnici Jiříně za období 2011 až 2013</b>			
<b>Rok</b>	<b>Počet případů prokázaného kmene <i>S. aureus</i></b>	<b>Počet případů prokázaného kmene MRSA</b>	<b>Procenta</b>
2011	79	10	13%
2012	112	41	37%
2013	49	10	20%

Tabulka 3. Procentuální vyjádění záchytu MRSA v nemocnici v Novém Bydčově za období 2011 - 2013

<b>Procentuální vyjádění záchytu MRSA v nemocnici v Novém Bydčově za období 2011 až 2013</b>			
<b>Rok</b>	<b>Počet případů prokázaného kmene <i>S. aureus</i></b>	<b>Počet případů prokázaného kmene MRSA</b>	<b>Procenta</b>
2011	41	17	41%
2012	90	42	47%
2013	61	25	41%

Tabulka 4. Procentuální vyjádění záchytu MRSA v Oblastní nemocnici Mladá Boleslav za období 2011 - 2013

<b>Procentuální vyjádění záchytu MRSA v nemocnici Mladá Boleslav za období 2011 až 2013</b>			
<b>Rok</b>	<b>Počet případů prokázaného kmene <i>S. aureus</i></b>	<b>Počet případů prokázaného kmene MRSA</b>	<b>Procenta</b>
2011	394	13	3%
2012	1027	61	6%
2013	531	24	5%

## 4. VÝSLEDKY

Ve výsledkové části sleduji a statisticky vyhodnocuji soubor pacientů, kterým byl diagnostikován na Oddělení klinické mikrobiologie v Oblastní nemocnici Jičín (nemocnice Jičín a nemocnice Nový Bydčov) a na Oddělení klinické mikrobiologie Oblastní nemocnice Mladá Boleslav mikrob *S. aureus* a u kolika z těchto izolátů se jednalo o MRSA. Sledované období je od roku 2011 do roku 2013.

Data byla zjištěna z dokumentace pracovišť mikrobiologie výše uvedených nemocnic.

Do statistického vyhodnocení bylo zahrnuto celkem 3526 pacientů, kteří byli přijati na lůžkové oddělení interních oborů v nemocnici Jičín. U 240 pacientů z tohoto souboru byl prokázán *S. aureus*. U 61 pacientů se jednalo o kmeny MRSA (procentuální vyjádření viz. Tabulka 2), u zbylých 179 izolátů se jednalo o methicilin senzitivní kmen *S. aureus*.

V nemocnici Nový Bydčov bylo do statistického vyhodnocení zahrnuto celkem 1848 pacientů. U 192 pacientů z tohoto souboru byl prokázán *S. aureus*. U 84 pacientů se jednalo o kmeny MRSA, u zbylých 108 izolátů se jednalo o methicilin senzitivní kmen *S. aureus* (procentuální vyjádření viz. Tabulka 3).

V Oblastní nemocnici Mladá Boleslav byla statisticky vyhodnocena data z celkového počtu 3580 pacientů. Z tohoto množství byl zachycen mikrob *S. aureus* u 1952 pacientů a u 98 pacientů z nich se jednalo o MRSA. U zbylých 1854 izolátů se jednalo o methicilin senzitivní kmen *S. aureus* (procentuální vyjádření viz. Tabulka 4).

## 5. DISKUZE

U uvedeného statistického souboru jsem zhodnotila výskyt MRSA kmen izolovaných od pacientů nemocnic v Jičíně, Novém Bydově a Mladé Boleslavi za období 2011 - 2013. Grafy ukazují na závažnou situaci v Novém Bydově (procento 43% izolovaných kmenů *S. aureus* je MRSA). Vysvětlením by mohl být složení pacientů, kteří jsou zde hospitalizováni v lébn dlouhodobě nemocných. Jedná se o chronicky nemocné, oslabené pacienty s výzím v kovým procentem.

V Oblastní nemocnici Mladá Boleslav, jak ukazuje Graf 3, je naopak velice nízký výskyt MRSA kmenů (procento 4,7%). Pokud to odpovídá skutečnosti, svědčí to o vzorné zdravotelské péči. Vycházela jsem z poskytnutých údajů, předpokládám, že správných.

Výskyt MRSA u pacientů v nemocnici v Jičíně odpovídá vcelku výskytu MRSA v republice (procento 23,3%). Z údajů (viz Graf 1) vyplývá zvýšený výskyt MRSA v roce 2012. Je to možná pravděpodobně vysvětlit odlišným zastoupením pacientů oproti roku 2011 a 2013.

Samořejmě jsem si v domě, že nevidy se MRSA kmen u pacientů zachytil. Zdravý záchyt je podmíněn kvalitním odběrem a včasným transportem do mikrobiologické laboratoře.

## 6. ZÁVĚR

Z mé práce je patrné, že MRSA vyvolává závažná onemocnění, je problémem nemocničních zařízení, kterému je nutné věnovat pozornost, a to z toho důvodu, jak závažná onemocnění tato bakterie vyvolává a také s ohledem na odolnost a schopnost šířit se z jednoho hostitele na druhého. Cesta přenosu přímým kontaktem (ruce ošetřujícího personálu) je nejvýznamnější.

Na závěr bych zdůraznila kladné mytí rukou za použití správné techniky. Jsem si vědoma toho, že je to časově náročné, ale jiná vhodnější cesta k prevenci MRSA není.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJ

1. Votava, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie: Vyzetovací metody*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2010. 495 s. ISBN 978-80-86850
2. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Triton, 1996. 596 s. ISBN-10: 80-2380-297-6
3. Becker, K., Friedrich, AW., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., von Eiff, Ch.: *Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens..J.Clin. Microbiol.*, 2003, ro . 41, ís. 4, s. 1434. 39. DOI:10.1128/JCM.41.4.1434-1439.2003. PMID 12682126
4. Havlík, J. a kol.: *Infekční nemoci*. 2. vyd. Praha : Galén, 2002, 186 s.
5. Petráz, P., Machová, I., Ryzková, L., Prázel, P.: *Případy menstruační formy syndromu toxického zoku v České republice v letech 1997-2011. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2011, ro . 60, . 4, s. 161-166.
6. Benez, J., a kol.: *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha : Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
7. Dostupné z www: [http://www.kulan.cz/Staphylococcus\\_aureus](http://www.kulan.cz/Staphylococcus_aureus) [cit. 2013-10-03]. online www.google.cz
8. Dostupné z www: <http://www.dulab.cz/?1.-tampony-a-transport.pudy,28> [cit. 2013-07-31]. online www.google.cz



9. Ryzková, O. a kol.: *Návody k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1997. 165 s. ISBN 80-7184-307-5
10. Votava, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: NEPTUN, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
11. Dostupné z www:  
<http://www.labmediaservis.cz/kultivacni-media/thioglykolatovy-bujon>  
[cit. 2013-06-10]. online www.google.cz
12. Gould, I. M.: *The Clinical Significance of methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.*, 2005, ro . 61, s. 277-282.
13. Bergerová, T., Hedlová, D., Jindrák, V., Urbázková, P., Chmelík, V.: *Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních*. *Zprávy CEM*, 2006, ro . 15, příloha 1.
14. Urbázková, P., Běbrová, E., Bergerová, T., Henyzová, J., Horníková, M., Chmelová, E., Kolář, M., Melter, O., Vaniz, V.: *Mikrobiologický průkaz kmenů MRSA, GISA, GRSA*. *Zprávy CEM*, 2003, ro . 12, s. 164-171.
15. David, M. et al.: *Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on Prevention of Antimicrobial Resistance: The Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals*. *Infection Control And Epidemiology*, 1997, ro . 18, s. 275. 290.

16. Centers for Disease Control and Prevention . CDC Guidelines. [www.cdc.gov/ncidod/dhqp/guidelines.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/guidelines.html)  
[cit. 2013-08-06]. Dostupné z: [www.cdc.gov/hai](http://www.cdc.gov/hai)
17. Sas I.: *Nosokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. Mladá fronta zdravotnické noviny ZDN/Postgraduální medicína*, 2010. ro . 9, [cit. 2010-05-11]  
Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pece-455567>
18. Pazderková, J., Krejčí, J., Dlouhý, P.: *Pokus o zhodnocení postup používaných k omezení výskytu infekcí vyvolaných kmeny Staphylococcus aureus rezistentními k meticilinu (MRSA). Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 2012, ro . 18(5), s.132-141.
19. Tenover, FC., Arbeit, R., Archer, G. *et al.*: *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol.*, 1994, ro . 32, s.407-415.
20. Melter, O., Aires de Sousa, M., Laskafeldová, K., Urbázková, P., Wünschová, M., de Lencastre, H.: *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a Czech hospital. Microbiol. Drug Resist.*, 2004, ro . 10(3), s.218-223.
21. Bergerová, T., Hedlová, D., Jindrák, V., Urbázková, P., Chmelík, V.: *sDoporučený postup pro kontrolu výskytu kmen Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních.* %wypracovaný ve spolupráci se

Subkomisí pro antibiotickou politiku LS JEP.: Léčebné standardy | Další odborné projekty. In: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně [online]. Rok vydání 2005. [cit. 2012-06-08]. Dostupné z <http://www.cls.cz/dalsi-odborne-projekty>.

22. Dostupné z [www: http://www.tvrtm.cz/magazin/foto/14398\\_4250.jpg](http://www.tvrtm.cz/magazin/foto/14398_4250.jpg)  
[cit. 2013-08-08]

23. Dostupné z [www:](http://www.szymb.cz/admin/upload/sekce_materialy/MRSA.pdf)  
[http://www.szymb.cz/admin/upload/sekce\\_materialy/MRSA.pdf](http://www.szymb.cz/admin/upload/sekce_materialy/MRSA.pdf)  
[cit. 2013-08-08]

24. Dostupné z [www: http://www.cls.cz/dokumenty/dp\\_mrsa.doc](http://www.cls.cz/dokumenty/dp_mrsa.doc)  
[cit. 2013-08-10]

25. Dostupné z [www:](http://www.bio-rad.com/Diagnostics/pdfs/-cmd/25285a%20MRSA%20Select-stamped.pdf)  
<http://www.bio-rad.com/Diagnostics/pdfs/-cmd/25285a%20MRSA%20Select-stamped.pdf>  
[cit. 2013-08-05]

26. Andrews, J. M.: *Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, ro. 48 (Suppl. 1), s.5-16.

27. Andrysík, T., Machová, I., Petráz, P., Votava, M.: *Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu Staphylococcus. Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2004, ro. 13(5), s.210 - 212. (Petráz, P.: *Doplňující informace k průkazu stafylokokové hyaluronidázy. Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2004, ro. 14(4), s.195 - 196.)

28. Raus, J., Love, DN.: *Characterization of coagulase-positive Staphylococcus intermedius and Staphylococcus aureus isolated from veterinary clinical specimen. J. Clin. Microbiol.*, 1983, ro . 18, s.789-792
29. Essers, L., Radebold, K.: *Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus by a latex agglutination test. J. Clin. Microbiol.*, 1980, ro . 12, s. 641-643.
30. Fournier, JM., Bouvet, A., Mathieu D., Nato, F., Boutonnier, A., Gerbal, R., Brunengo, P., Saulnier, C., Sagot, N., Slizewicz, B.: *New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacilin-susceptible and oxacilin resistant Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol.*, 1993, ro . 31, s. 1342-1344.
31. Dostupné z [www:SEIKEN, Denka. MRSA latex test for PBP2](http://www.SEIKEN, Denka. MRSA latex test for PBP2) [online]. Dostupné online.)
32. Zprávy CEM (SZÚ, Praha); *Mikrobiologický pr kaz MRSA, GISA a GRSA.*, Metodický list . 18, 25.2.2003, NRL pro antibiotika SZÚ
33. Eigner, U. *et al.*: *Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. Clin. Lab.*, 2009, ro . 55(7-8), s. 289-96.
34. Dostupné z [www: http://biomikro.vscht.cz](http://biomikro.vscht.cz) (kv ten 2008)  
[cit. 2013-08-16]
35. SOP . Standardní opera ní postupy pro Odd lení klinické mikrobiologie v Oblastní nemocnici Ji ín

36. Oblastní nemocnice Ji ín a.s., Postup opat ení výskytu MRSA na odd leních v Oblastní nemocnici Ji ín

37. Dostupné z www:

[http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg](http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg)

[cit. 2013-06-16]