

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Leona Lošonská

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Leona Lošonská

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ÚČINNOST BAKTERIOFÁGOVÉHO LYZÁTU NA KMENY
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Leona LOŠONSKÁ**
Osobní číslo: **Z18B0132P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Účinnost bakteriofágového lyzátu na kmeny Staphylococcus aureus**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
- VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- Tisková zpráva. Antibiotická rezistence u lidí i u zvířat je stále větším zdravotním problémem. Praha: SZÚ, 19. 11. 2012
- PANTŮČEK, Roman. Genomika bakteriofágů. Informační listy. 2005, č. 29, s. 6-15. ISSN 1210-6267.
- MURRAY, Patrick. Medical microbiology. 7 edition. Philadelphia: Saunders, 2013, 888 s. ISBN 978-0-323-08692-9.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

Prohlášení

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

V Plzni dne 29. 3. 2021

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Lošonská Leona

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Účinnost bakteriofágového lyzátu na kmeny *Staphylococcus aureus*

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 34

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, MRSA, bakteriofágová terapie

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá bakteriofágovou terapií, jako vhodnou alternativní léčbou stafylokokových infekcí, u nichž selhala antibiotická terapie. V dnešní době se bakteriofágová terapie dostává do popředí zájmu, protože nadměrné užívání antibiotik zapříčinilo vznik antimikrobiální rezistence, která se stala globálním problémem. Mezi nejvíce rezistentní agens patří methicilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA). Teoretická část shrnuje poznatky o kmenech *S. aureus*, konec kapitoly je věnován alternativě k antibiotické léčbě, bakteriofágové terapii. V praktické části je testována účinnost bakteriofágového lyzátu na 30 kmenů *S. aureus* pocházejících z Ústavu mikrobiologie FN Plzeň. Výsledná citlivost byla porovnána s účinností klasické antibiotické léčby. Z výsledků lze vyvodit, že citlivost kmenů *S. aureus* k bakteriofágovému lyzátu je vysoká (93 %). Preparáty obsahující bakteriofágový lyzát by se tak mohly stát velmi dobrou náhradou klasické antibiotické terapie.

Abstract

Surname and name: Lošonská Leona

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Efficiency of bacteriophage lysate on *Staphylococcus aureus* strains

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 34

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, bakteriofage therapy

Summary:

This bachelor thesis deals with bacteriophage therapy as a suitable alternative treatment for staphylococcal infections in which antibiotic therapy has failed. Today, bacteriophage therapy is gaining prominence because the overuse of antibiotics has caused antimicrobial resistance, which has become a global problem. Among the most resistant agents are methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). The theoretical part summarizes the knowledge about *S. aureus* strains, the end of the chapter is devoted to an alternative to antibiotic treatment, bacteriophage therapy. The practical part tests the effectiveness of bacteriophage lysate on 30 strains of *S. aureus* originating from the Institute of Microbiology, University Hospital Pilsen. The resulting sensitivity was compared with the effectiveness of classical antibiotic treatment. From the results it can be concluded that the sensitivity of *S. aureus* strains to bacteriophage lysate is high (93 %). Preparations containing a bacteriophage lysate could thus become a very good substitute for classical antibiotic therapy.

Předmluva

V současnosti je stále větším problémem vznik rezistence patogenních agens na klasickou antimikrobiální léčbu, který má celosvětový charakter. Alternativní léčba využívající bakteriofágovou terapii by mohla tuto nelehkou situaci vyřešit. V případě vzniku rozsáhlých klinických studií by mohly být bakteriofágové preparáty registrovány ve všech zemích a mohly být předepisovány namísto klasických antibiotik. Cílem této práce je prokázat účinnost bakteriofágového lyzátu na kmeny *Staphylococcus aureus*.

Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, PhD. za odborné vedení práce, poskytování cenných rad a materiálních podkladů. Dále velmi děkuji doc. RNDr. Romanu Pantůčkovi, PhD. za přípravu a zprostředkování bakteriofágového lyzátu, bez jehož pomoci by nebylo možné provést tento výzkumný projekt. Poslední poděkování patří celé rodině za podporu během studia.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	19
1.1 Charakteristika rodu <i>Staphylococcus</i>	19
1.2 Obecné vlastnosti zlatého stafylokoka.....	20
1.3 Faktory virulence	20
1.3.1 Povrchové faktory	21
1.3.2 Extracelulární faktory	21
1.4 Onemocnění	23
1.4.1 Invazivní onemocnění.....	24
1.4.2 Toxikózy	25
1.5 Laboratorní diagnostika	27
1.6 Terapie	29
1.7 Citlivost k antibiotikům	30
1.7.1 MRSA.....	31
1.7.2 VRSA	34
2 BAKTERIOFÁGOVÁ LÉČBA	35
2.1 Objev bakteriofágů	35
2.2 Charakteristika bakteriofágů.....	35
2.2.1 Reprodukční cyklus	37
2.3 Počátky a současnost fágové terapie.....	38
2.3.1 Fágová terapie v České republice.....	39
2.4 Porovnání fágové terapie oproti antimikrobiální léčbě.....	40
2.4.1 Výhody fágové terapie.....	41
2.4.2 Možné nevýhody fágové terapie.....	41
PRAKTICKÁ ČÁST	43
3 CÍL PRÁCE	44
4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	45
5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	46
6 METODIKA PRÁCE	47
6.1 Testování citlivosti k antibiotikům	47

Princip diskového difúzního testu	48
Pomůcky	48
Reagencie.....	48
Mikroorganismy	48
Přístroje.....	48
Postup	48
6.2 Příprava bakteriofágového lyzátu	49
Pomůcky	49
Reagencie.....	49
Mikroorganismy	49
Přístroje.....	49
Postup	49
6.3 Testování citlivosti kmenů <i>Staphylococcus aureus</i> k fágovému lyzátu	50
Pomůcky	50
Reagencie.....	50
Mikroorganismy	50
Přístroje.....	50
Postup	50
7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	54
DISKUZE	58
ZÁVĚR.....	61
SEZNAM LITERATURY.....	62
SEZNAM PŘÍLOH	65
PŘÍLOHY	66
Příloha A – Testování bakteriofágového lyzátu	66
Příloha B – Povolení sběru informací ve FN Plzeň.....	68

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Typologie testovaných kmenů <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Graf 2: Citlivost kmenů <i>Staphylococcus aureus</i> k bakteriofágovému lyzátu.....	54
Graf 3: Citlivost kmenů <i>S. aureus</i> k fágovému lyzátu a základní antibiotické sestavě.....	55
Graf 4: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a základní antibiotické sestavě	56
Graf 5: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a rozšířené antibiotické sestavě	56
Graf 6: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a močové antibiotické sestavě	57
Graf 7: Citlivost kmenů <i>S. aureus</i> v závislosti na koncentraci bakteriofágového lyzátu	57

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Staphylococcus aureus</i> , zvětšeno 1000x	20
Obrázek 2: Grampozitivní <i>S. aureus</i> , zvětšeno 100x.....	27
Obrázek 3: Zlatožluté kolonie <i>S. aureus</i> s β -hemolýzou na KA	28
Obrázek 4: Průkaz volné a vázané koagulázy sklíčkovou a zkumavkovou metodou	29
Obrázek 5: Procentuální zastoupení výskytu MRSA ze všech izolátů <i>S. aureus</i> v Evropě	33
Obrázek 6: Procentuální poměr výskytu MRSA v České republice v letech 2000-2019....	33
Obrázek 7: Struktura bakteriofágů (<i>Myoviridae</i>)	36
Obrázek 8: Životní cyklus bakteriofága	38
Obrázek 9: Rozšířená antibiotická sestava diskového difúzního testu.....	49
Obrázek 10: Naočkování půdy stafylokokovou suspenzí.....	51
Obrázek 11: Nanesení bakteriofágového lyzátu na naočkovanou půdu.....	52
Obrázek 12: Citlivé a intermediárně citlivé kmeny <i>S. aureus</i> k bakteriofágovému lyzátu .	53
Obrázek 13: Rezistentní kmeny <i>S. aureus</i> k bakteriofágovému lyzátu	53
Obrázek 14: Testování koncentrací bakteriofágového lyzátu	66
Obrázek 15: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na <i>Streptococcus agalactiae</i>	66
Obrázek 16: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na <i>Enterococcus faecalis</i>	67
Obrázek 17: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na <i>Escherichia coli</i>	67

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Antimikrobiální léčba.....	30
Tabulka 2: Mechanismy rezistence S. aureus k protistafylokokovým látkám	31
Tabulka 3: Bakteriofágový genom	37
Tabulka 4: Zkratky antibiotik a obsah antibiotik v discích	47
Tabulka 5: Citlivost kmenů Staphylococcus aureus k bakteriofágovému lyzátu.....	55
Tabulka 6: Typologie vyšetřovaného klinického materiálu	55

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotika
CA-MRSA	<i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> = komunitně šířící se MRSA
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> = Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CIP	ciprofloxacin
CLI.....	clindamycin
CLSI.....	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> = Institut pro klinické a laboratorní normy
CMP	chloramfenikol
COT	trimetoprim/sulfamethoxazol
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> = koronavirové onemocnění 2019
CXT	cefoxitin
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> = dvouřetězcová DNA
ECDC.....	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> = Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> = imunochemická metoda značená pomocí enzymu
ERY	erytromycin
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> = Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
FN	fakultní nemocnice
FUR.....	furantoin

GEN gentamicin

HA-MRSA *Hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus* = MRSA šířící se v nemocnicích

KA krevní agar

kb kilobáze = jednotka velikosti genomu

LA-MRSA *Livestock-associated Staphylococcus aureus* = forma MRSA kmene spojená s hospodářskými zvířaty

LIS laboratorní informační systém

LNZ linezolid

MH Mueller-Hinton bujón

MHC *major histocompatibility complex* = hlavní histokompatibilní komplex

MPB masopeptonový bujón

MRSA *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* = methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

MSSA *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* = methicilin-citlivý *Staphylococcus aureus*

OXA oxacilin

PBP2' *Penicillin-binding protein 2* = protein 2 vázající penicilin

PG peptidoglykan

PV Panton-Valentinův toxin

RIF rifampicin

RNA ribonukleová kyselina

ssDNA *single-stranded DNA* = jednořetězcová DNA

SSSR Svaz sovětských socialistických republik

SSSS..... *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* = syndrom opařené kůže

TCR..... *T-cell receptor* = receptor T lymfocytů pro antigen

TET tetracyklin

TGC tigecyklin

TSS..... syndrom toxického šoku

TSS-1 toxin syndromu toxického šoku

VISA *Vankomycin intermediate-resistant Staphylococcus aureus* = *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu

VRSA..... *Vankomycin-resistant Staphylococcus aureus* = vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

VSSA *Vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus* = vankomycin-citlivý *Staphylococcus aureus*

WHO *World Health Organisation* = Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Již brzy po objevu antibiotik sám Alexander Fleming varoval před zneužíváním těchto léků, které by mohly zapříčinit vznik bakterií rezistentních na antibiotika. Jak bylo předpovězeno, tak se i stalo. Bakteriální rezistence začala vznikat velmi krátce po jejich zavedení do běžné lékařské praxe z důvodu předepisování antibiotik ve velkém množství a také kvůli jejich chybnému používání. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je následující post-antibiotická éra velmi nebezpečná. Zvyšující se počet infekcí je stále obtížnější léčit, což s sebou nese vysokou nemocnost, úmrtnost a samozřejmě také vysoké finanční náklady. Dokonce by se mohlo stát, že i elementární infekce budou opět smrtelné. Naproti tomu farmaceutické společnosti neprojevují velký zájem o vývoj a výrobu nových antimikrobiálních látek, protože je antibakteriální trh přehlcen, a tudíž není tak výnosný. Vývoj nových terapeutických látek by tak mohl být velkou pomocí v boji proti rezistenci. Ačkoli byly bakteriofágy objeveny již v 19. století, jejich terapeutické využití bylo zastíněno zavedením antibiotik. Kvůli narůstající rezistenci bakterií na antimikrobiální látky nyní zažívá bakteriofágová terapie zasloužené znovuzrození.

Stejně jako jiné bakterie, i stafylokoky si vytvořily různé mechanismy, díky nimž odolávají účinku antimikrobiálních látek. Ani druh *Staphylococcus aureus* není výjimkou. Tento druh patří mezi bakterie, jejichž rezistence na antibiotika představuje značnou komplikaci v průběhu léčby jimi vyvolaných infekcí. Mezi velmi nebezpečné se řadí multirezistentní kmeny, tzv. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), které jsou odolné vůči methicilinu a téměř všem dostupným β -laktamovým antibiotikům. MRSA kmeny jsou původci především nozokomiálních infekcí v nemocničních zařízeních. Při výskytu MRSA infekcí mají tedy lékaři velmi omezené terapeutické možnosti. S využitím bakteriofágových preparátů by mohla být léčba těchto nemocí úspěšnější, neboť včasná a účinná terapie je nejzásadnější.

TEORETICKÁ ČÁST

1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus aureus se řadí k nejčastěji nalézaným lidským patogenům, může se vyskytovat bez jakéhokoliv choroboplodného působení na sliznicích i kůži mnoha lidí. (Votava 2003)

K rozvinutí stafylokokové infekce je třeba, aby byla kožní či slizniční bariéra poškozena a zároveň se do tohoto místa dostalo dostatečně velké množství virulentního kmene. Při splnění těchto podmínek mohou vznikat různá onemocnění od malých hnisavých oděrek až po smrtelné sepse. (Výmola 1983) Kromě pyogenních infekcí dokáže vyvolat i otravy z potravin. (Votava 2003)

1.1 Charakteristika rodu *Staphylococcus*

Stafylokoky, tak jak je známe dnes, byly poprvé pozorovány v 19. století v mikroskopickém preparátu hnisu nohy jednoho mladého muže. O tento objev se v roce 1880 zasloužili Louis Pasteur a Alexander Ogston, kteří prokázali souvislost mezi nalezením velkého množství shluků, trsů a řetízků kulatých organismů a tvorbou hnisavých abscesů. (Votava 2003)

Do rodu *Staphylococcus* bylo doposud zařazeno okolo 50 druhů a poddruhů, z nichž polovinu lze vypěstovat z humánního klinického materiálu. Podle toho, jak jsou schopni koagulovat plazmu, je můžeme rozdělit do dvou základních skupin, na stafylokoky koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní. Z klinického hlediska mají pro člověka největší význam koaguláza-pozitivní stafylokoky druhu *Staphylococcus aureus*, ostatní koaguláza-pozitivní stafylokoky jsou patogeny zvířecího původu. Naopak mezi nejvýznamnější koaguláza-negativní stafylokoky patří druhy *S. epidermis* a *S. saprophyticus*. (Bednář et al. 1996; Votava 2003)

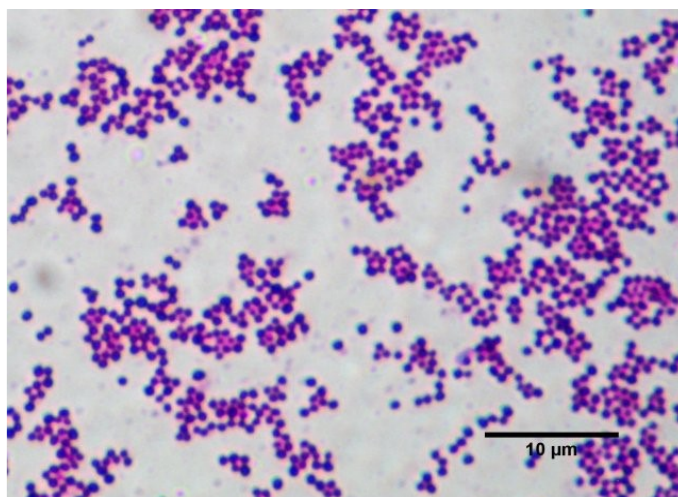
Stafylokoky jsou většinou nesporelující, neopouzdřené a nepohyblivé grampozitivní koky o průměru cca 1 μm . Mohou být uspořádány jednotlivě, ve čtveřicích či velmi krátkých řetízcích, ale nejčastěji tvoří nepravidelné shluky ve tvaru hroznů (řecky *staphylé* = hrozen, *coccus* = bobule). Až na výjimky jsou fakultativně anaerobní a produkují katalázu, tj. rozkládají peroxid vodíku na vodu a kyslík. Díky jejich nenáročnosti na růst je můžeme nalézt v přírodním prostředí, kde ulpívají na povrchu a sliznicích lidského těla či zvířat. (Julák 2006; Votava 2003)

1.2 Obecné vlastnosti zlatého stafylokoka

Tento mikrob je charakterizován jako grampozitivní kok kulovitěho tvaru o průměru 1 až 3 μm . Je kultivačně nenáročný, dobře roste na pevných půdách – krevní agar (KA) s 5 % ovčích erytrocytů, obyčejný KA nebo thioglykolátový bujón. Kolem jeho kolonií, vyrůstajících po 24 hod inkubaci při teplotě 37 °C, se tvoří v různém stupni β -hemolýza. (Votava 2003) Kolonie mohou mít žlutou až zlatou barvu, která je způsobená karotenoidními pigmenty vznikajícími v průběhu jejich růstu. Právě kvůli tomuto zbarvení může být *S. aureus* běžně nazýván jako zlatý stafylokok. (Murray et al. 2012)

Je známo, že stafylokoky dobře odolávají nepříznivým vlivům vnějšího prostředí, a tak *S. aureus* není výjimkou. Zvláště za přítomnosti bílkovin odolává zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, vyschnutí a také toleruje vyšší koncentrace solí až do obsahu 10 % NaCl. Tolerance k takto vysoké koncentraci NaCl lze využít při izolaci těchto agens ze silně kontaminovaných materiálů, jako jsou některé potraviny, výkaly nebo sliznice zvířat. (Bednář et al. 1996; Julák 2006)

Obrázek 1: *Staphylococcus aureus*, zvětšeno 1000x



Zdroj: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html>

1.3 Faktory virulence

Staphylococcus aureus produkuje celou řadu genetických, biochemických nebo strukturních rysů, které jsou zodpovědné za překonání obranných reakcí hostitele, a tím umožňují mikroorganismu vyvolat onemocnění. Tyto faktory můžeme nalézt buď na povrchu buňky nebo extracelulárně. (Greenwood et al. 1999; Melter a Castelhana 2019)

1.3.1 Povrchové faktory

Silné polysacharidové pouzdro chrání bakterie před fagocytózou, protilátkami a působením komplementu. (Julák 2006) Mezi nejdůležitější chemické složky stafylokokové buněčné stěny patří peptidoglykan, protein A a kyselina teichoová. (Výmola 1983)

Peptidoglykan (PG) tvoří základní kámen buněčných stěn všech grampozitivních bakterií. (Bednář et al. 1996) „*Stafylokokový peptidoglykan (murein) má na všech zbytcích kyseliny N-acetylmuramové tetrapeptidy, které jsou napříč pospojované pentaglycinovými můstky.*“ (Votava 2003) PG má schopnost stimulovat produkci řady cytokinů prostřednictvím aktivace makrofágů a lymfocytů, čímž zásadně ovlivňuje nespecifickou imunitu organismu. Těmito mechanismy vyvolává v kůži lokální zánětlivou reakci. (Bednář et al. 1996) Hlavní antigenní determinantou všech kmenů *S. aureus* je **kyselina teichoová** polyribitolfosfátového typu, taktéž zvaná polysacharid A. Podle prostorové polohy N-acetylglukosaminové jednotky ji můžeme rozlišit na dva sérotypy, A α a A β , uplatňující se jako adheziny ve vazbě na sliznice a rány, kde se váží na fibronektin. (Bednář et al. 1996; Julák 2006; Votava 2003) Na peptidoglykan je kovalentně navázán druhově specifický **protein A**, který se na rozdíl od předchozích antigenů nalézá na povrchu buněčné stěny. Tato lokalizace mu propůjčuje schopnost vázat Fc oblast imunoglobulinové molekuly, tedy chránit stafylokoka před působením fagocytů, komplementu nebo opsonizací pomocí protilátek. (Julák 2006; Výmola 1983)

1.3.2 Extracelulární faktory

Extracelulární faktory virulence lze rozdělit do dvou skupin, na enzymy a toxiny. „*K enzymům patří koaguláza, hyaluronidáza, fibrinolysin, peniciláza, kataláza, lipáza a nukleáza.*“ (Votava 2003) Ke stafylokokovým toxinům se řadí hemolysin, leukocidin, toxin syndromu toxického šoku, enterotoxin a exfoliatiny. (Julák 2006; Votava 2003)

1.3.2.1 Enzymy

Volná **koaguláza** je termolabilní protein, který vytváří s modifikovaným protrombinem aktivní komplex katalyzující přeměnu fibrinogenu na pevný fibrin. Tvorba fibrinu je příčinou vzniku ohraničených ložisek, abscesů, typických pro stafylokokové infekce. (Votava 2003) Této přeměny se využívá ve zkušebním testu při dourčení zlatého stafylokoka. Dnes už víme, že koagulázy specificky inhibují fagocytózu stafylokoků polymorfonukleáry, a tím je chrání před baktericidním účinkem organismu. (Výmola 1983)

Hyaluronidáza se řadí ke stafylokokovým enzymům hydrolyzujícím kyselinu hyaluronovou, čímž rozrušuje mezibuněčný tmel a pojivové tkáně. Tímto mechanismem umožňuje stafylokokům a jejich toxinům šíření do okolí. (Julák 2006) Pro průkaz tohoto enzymu se využívá dekapsulační test dle profesora Borise Skalky. Princip testu spočívá v tom, že *Streptococcus equii* roste za normálních podmínek na KA v mukózních koloniích. Pokud však kolmo k těmto koloniím přiočkujeme zlatého stafylokoka, dojde k potlačení růstu hlenových kolonií streptokoka. (Votava 2010)

Fibrinolysin, taktéž stafylokináza, vyvolává aktivaci plazmatického plazminogenu na fibrinolytický enzym plazmin, rozpouštějící fibrinové sraženiny. Působí tedy jako invazivní faktor podporující šíření stafylokoků do dalších tkání. (Bednář et al. 1996)

Peniciláza je zodpovědná za rozklad β -laktamových antibiotik. Tato schopnost může být místně přenesena i na jiné patogenní bakterie. Infekce vyvolané stafylokoky produkující penicilázu, které jsou léčené penicilinem, mohou mít mnohem horší průběh než u stafylokoků neprodukující tento enzym. (Výmola 1983)

Mezi další enzymy produkované zlatým stafylokokem patří **kataláza**, která štěpí toxický peroxid vodíku na vodu a kyslík. **Lipáza** pomáhá stafylokokům v šíření do mazových žláz a podkoží pomocí hydrolyzy lipidů. Pravděpodobným úkolem **nukleáz** je napadání jader bílých krvinek. (Votava 2003)

1.3.2.2 Toxiny

Kmeny *Staphylococcus aureus* produkují v různých poměrech čtyři hemolyziny (α , β , γ , δ). **Hemolyzin alfa**, který je kódován jak na bakteriálním chromozomu, tak i na plazmidech, vyvolává různá onemocnění člověka. Je nebezpečný pro mnoho typů buněk, včetně erytrocytů, leukocytů, hepatocytů a krevních destiček. Jeho toxicita spočívá v integraci do hydrofobních oblastí membrány hostitelské buňky, což vede k tvorbě pórů o velikosti 1 až 2 nm. V důsledku toho dochází k perforaci membrány a následné lýze buněk. Alfa hemolyzin je považován za důležitý mediátor poškození tkáně při stafylokokové nemoci. **Beta hemolyzin**, označovaný jako sfingomyelináza C, je termolabilní protein specifický pro sfingomyelin a lysofosfatidylcholin. (Murray et al. 2012) Cytotoxické studie dokázaly, že katalyzuje hydrolyzu membránových fosfolipidů, úměrnou koncentraci sfingomyelinu vystaveného na buněčném povrchu buněk, jako jsou například erytrocyty, fibroblasty, makrofágy a mnohé další. (Výmola 1983) **Gama hemolyzin** je imunogenní toxin složený ze dvou polypeptidových řetězců, vyvolávající v těle pacientů dobrou

protilátkovou odpověď. **Hemolyzin delta** je velmi malý termostabilní peptid s povrchovou aktivitou hemolyzující membrány erytrocytů. (Julák 2006)

Leukotoxický **leukocidin**, nazývaný též Panton-Valentinův toxin (PV) je další dvousložkový peptid skládající se z rychlé složky (F) a pomalé (S), označených podle rychlosti migrace při chromatografii. PV, stejně jako alfa hemolyzin, vytváří póry s následnou zvýšenou propustností membrány pro kationty a osmotickou nestabilitu buněk. (Bednář et al. 1996)

Jen některé kmeny *S. aureus* produkují nízkomolekulární protein, způsobující onemocnění syndrom toxického šoku, **toxin syndromu toxického šoku** (TSS-1). Působí v organismu hostitele jako superantigen, neboť aktivuje pomocí vazby na MHC II molekuly makrofágů a TCR lymfocytů až 30 % populace T lymfocytů, což vede k nadprodukcii dalších pomocných látek, jako jsou například interleukiny 1 a 6 nebo *tumor-necrosis factor α*. Toto masivní uvolnění látek vyvolává klinické příznaky šokového syndromu. (Bednář et al. 1996; Julák 2006)

Enterotoxiny jsou účinné mitogeny rezistentní na var i trávicí enzymy. Stafylokoky produkují několik sérových typů od A do E, nově byly objeveny i méně časté sérotypy G až U. (Greenwood et al. 1999) Enterotoxiny jsou zodpovědné za vznik enterotoxikóz doprovázených silnými průjmy a zvracením. Stejně jako TSS-1 jsou určitým prototypem superantigenů, a mohou tedy vyvolávat i syndrom toxického šoku. (Julák 2006)

Mezi superantigeny také patří **exfoliatiny** štěpící desmoglein 1, který je složkou desmozomů. Desmozomy jsou buněčné struktury specializované na adhezi mezi buňkami. Štěpení způsobuje ztrátu povrchové vrstvy kůže, což vede ke vzniku stafylokokového syndromu opařené kůže. (Cornelissen a Hobbs 2019)

1.4 Onemocnění

Jak již bylo uvedeno, *Staphylococcus aureus* patří mezi nejčastěji nalézané lidské patogeny, vyskytující se většinou na sliznicích i kůži. „*Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci poměrně značně odolný.*“ (Bednář et al. 1996) Proto je až u třetiny lidí infekce bezpříznaková. K propuknutí onemocnění zpravidla dochází při oslabení imunity nebo při porušení kožní či slizniční bariéry a zároveň vystavení organismu velké dávce virulentního kmene. Náchylnější k infekci mohou tedy být pacienti po operačním výkonu, úrazech, zavedenému katetru nebo pacienti s maligním onemocněním. (Bednář et al. 1996)

1.4.1 Invazivní onemocnění

Invazivní onemocnění vznikají po překonání lokálních obranných mechanismů hostitele, kdy v tkáních dochází k pomnožení stafylokoků za vzniku ohraničených zánětlivých ložisek hnisu. Exsudát má zpočátku serózně-fibrózní charakter, po aktivaci leukocytů se stává smetanově žlutým s tendencí k nekrotickým změnám. Okolní tkáň je zanícena a vykazuje Celsovy makroskopické znaky (*rubor, calor, dolor, tumor a functio laesae*). Zlatý stafylokok se vzácně šíří bez ohraničení jako flegmonózní zánět. (Bednář et al. 1996; Julák 2006)

Mezi nejčastější stafylokokové infekce patří různé formy hnisavého onemocnění kůže, obecně nazývaných jako pyodermie. Pomocí svých virulentních faktorů pronikají s povrchu kůže do vlasových folikulů a mazových žlázek, kde způsobují zánět a nekrózu epitelu. Tyto **folikulitidy** se projevují jako žluté pustulky se zarudlým okolím, vyskytující se především v ochlupení. (Julák 2006) Jestliže se leukocytární infiltrace rozšiřuje do sousední škůry, z infikovaného folikulu se postupně vyvíjí **furunkl**. Splývající furunkly lokalizované především na šíji označujeme jako **karbunkl**, který bývá doprovázen horečkou a bakterémií. (Bednář et al. 1996; Julák 2006) *Staphylococcus aureus* často způsobuje zánět mazových žláz na očním víčku, tzv. ječné zrno (**hordeolum**), eventuálně zánět víčka (**blepharitis**) spojený s hnisavým zánětem spojivky (**conjunctivitis**). Zánětlivé onemocnění epidermis zvané **impetigo** se vyskytuje zvláště u dětí v předškolním věku. Jedná se o povrchově uložené puchýře a pustuly zasychající v krusty vyvolané stafylokokovou a streptokokovou infekcí. (Votava 2003) Stafylokoky jsou schopni infiltrovat i do měkkých tkání posledních článků prstů, kdy pronikají skrz záděrky či drobná poranění a způsobují hnisavé záněty zvané **panaricium** a **paronychium**. (Julák 2006) Dokonce mohou infikovat i potní žlázy v axile za vzniku **hidradenitidy**. (Výmola 1983)

Epidemiologicky významný je zánět prsní žlázy, **mastitida**, přicházející zejména v prvních týdnech laktace u žen po porodu. Zdrojem onemocnění většinou bývá novorozenec, který se nakazil stafylokoky v porodnici, nejčastěji nozokomiálními kmeny. Ty se do těla matky dostávají při kojení skrz malé trhlinky okolo prsní bradavky nebo přes mlékovody do prsní žlázy, kde vyvolávají zánětlivé změny. (Bednář et al. 1996; Výmola 1983) Stejně jako u mastitid, endogenní i exogenní původ mají i putridní infekce drobného poranění kůže, popáleniny nebo operační rány. Častokrát samotný *S. aureus* není schopný v čisté ráně vyvolat infekci, proto potřebuje, aby v ráně zůstalo cizí těleso, například zadržaná tříska, špína nebo steh. Tím pro zlatého stafylokoka vzniká ideální vstup do

lidského těla, ve kterém putuje do lymfatických uzlin za vzniku **lymfadenitidy**. Z lymfatických uzlin se dostává do krevního oběhu (vzniká **bakterémie**), která může vést až k těžkému systémovému onemocnění, **sepsi**. (Julák 2006)

Z infikovaných ložisek může být *S. aureus* krví disseminován do kteréhokoliv orgánu v lidském těle, v němž mohou vznikat hnisavé abscesy. Velmi nebezpečná je **akutní endokarditida**, která má bez správné a včasné léčby 100 % letalitu. (Výmola 1983) Na srdečních chlopních dochází k tvorbě zvláštního typu biofilmu, který slouží jako zdroj pro roznášení stafylokoků po těle. Putující stafylokoky v těle indukují vznik dalšího hematogenního rozsevu v kůži, plicích, mozku nebo ledvinách. Následkem hematogenního rozsevu či úrazu může vzniknout **osteomyelitida**. U dětí mezi 5. a 15. rokem postihuje metafýzy dlouhých kostí, u dospělých spíše obratle. Při postižení kloubů se pak vyznačuje hnisavou **artritidou**. (Votava 2003)

Život ohrožující jsou také sekundární **pneumonie** a bronchopneumonie nasedající na infekci vyvolanou virem chřipky. Imunitní systém je již částečně inhibován virovou infekcí, zastavuje se pohyb řasinek, kdy vdechnuté stafylokoky snáze kolonizují plíce. Infekce je možná i aspirací zvratků nebo dlouhodobou intubací. (Julák 2006) Méně časté jsou primární stafylokokové pneumonie, napadající především nejmenší kojence, starce a osoby se slabou imunitou nebo získaným či vrozeným imunodeficitem. (Bednář et al. 1996)

Pseudomembranózní kolitida je endogenní infekce vznikající po léčbě širokospektrálními antibiotiky, vůči kterým je vlastní kmen *S. aureus* odolný. Širokospektrální antibiotika potlačují přirozenou střevní mikroflóru, a tím snáze stafylokokové enzymy a toxické látky poškozují střevní sliznici. Ta je následně pokrytá žlutošedými pablánami obsahujícími fibrin, rozpadlými buňkami a leukocyty. „*Po jejich odloučení jsou patrné eroze a nekrotické vředy mezi zbytky překrvené sliznice.*“ (Bednář et al. 1996) První příznaky se většinou objevují za 3 až 9 dnů po nasazení antibiotik. Zpočátku se onemocnění projevuje kašovitým průjmem, poté stolice obsahuje hlen, v závažných případech se v ní mohou vyskytovat stopy krve či dokonce pablány odloučené sliznice. (Bednář et al. 1996)

1.4.2 Toxikózy

Stafylokokové **enterotoxikózy** vznikají jako otravy po pozření potravin, v nichž jsou obsaženy enterotoxiny produkované stafylokoky. Tyto toxiny jsou odolné vůči teple, proto ohřev jídla zlikviduje pouze bakterie, ale ne toxiny. Jak již bylo dříve zmíněno, toxin působí

jako superantigen. Jen jak se dostane do těla, inkubační doba je velmi krátká a zvracení, průjem nebo nauzea se projeví během prvních 6 hodin, tzn. jakmile se žírné buňky aktivují a uvolní histamin. Již 1 µg může navodit symptomy otravy, do 24 hod však všechny příznaky zcela zmizí. Jen ve vzácných případech může být stafylokoková enterotoxikóza fatální, zvláště u velmi malých dětí nebo právě naopak velmi starých lidí, kteří jsou následkem otravy dehydratováni. (Julák 2006; Melter a Castelhana 2019)

Stafylokokové kmeny produkující TSS-1 nebo enterotoxiny mohou vyvolat onemocnění zvané **syndrom toxického šoku** (TSS). Tato nemoc byla poprvé popsána v roce 1978, její podrobný popis byl vypracován v americkém *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) o několik let později. (Julák 2006) Díky stále vyššímu nárůstu případů u žen bylo zjištěno, že se stafylokokové kmeny mohou rychle množit ve vaginálních vysokoabsorpčních tampónech a produkovat toxiny. Brzy poté však bylo dokázáno, že TSS může postihnout i ostatní pacienty, jelikož jako zdroj pro produkci toxinů může posloužit i infikované poranění. V pochvě nebo v ráně je vhodné aerobní prostředí a neutrální pH pro produkci toxinů. Následně dochází k uvolnění toxinů do krve. Syndrom toxického šoku se projevuje horečkou nad 38,5 °C, hypotenzí a různou formou vyrážky. (Murray et al. 2012) „V České republice bylo v období 1983-2011 zjištěno 159 případů syndromu toxického šoku, z těch bylo 47 případů menstruační formy. Smrtnost těchto onemocnění je však i v našich podmínkách velmi vysoká: u stafylokokového syndromu toxického šoku 11 %.“ (Křížová a Petráš 2012)

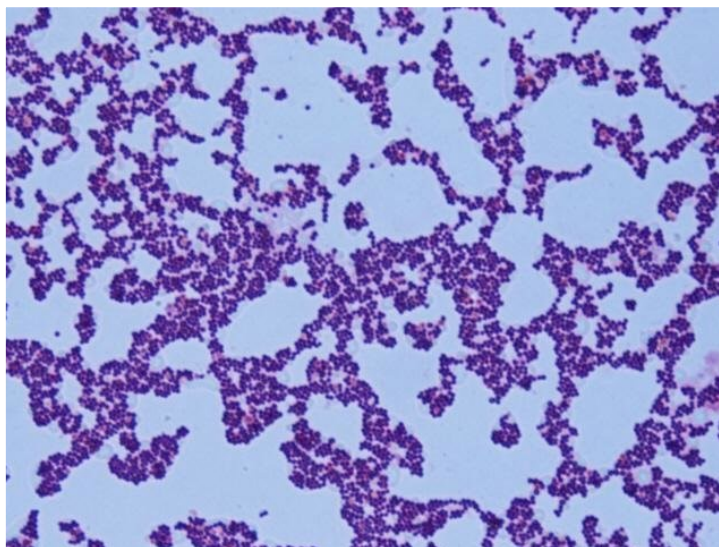
Toxická epidermolýza neboli exfoliativní dermatitida je lokalizované i generalizované onemocnění vyvolané kmeny stafylokoků produkujícími exfoliativní toxin. Toxin je uvolňován z nejrůznějších infikovaných míst v organismu. U novorozenců a nejmenších kojenců se vyskytuje lokalizovaná forma zvaná bulózní impetigo. Tato forma se projevuje vznikem ojedinělých puchýřů s čirou tekutinou na kůži, kdy má jejich okolí fyziologický vzhled. Po zaschnutí puchýřů se zhojí krustou, která se následně odloučí a léze zůstávají bez následků. (Bednář et al. 1996) Pokud se onemocnění rozvine do generalizované formy, můžeme tento stav nazývat jako syndrom opařené kůže (*Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, SSSS; Ritterova nemoc). Na kůži vznikají kromě puchýřů i rozsáhlé eroze, dochází ke spontánnímu odlupování celých plátů povrchových vrstev kůže. (Julák 2006) Obnažené plochy epidermis jsou červené hyperemické, lesklé a vlhké. Třetí forma toxické epidermolýzy je taktéž generalizovaná, tzv. Rašův typ. Pro Rašův typ je charakteristický vznik exantému kůže trupu a končetin a exantému sliznice. (Bednář et al. 1996)

1.5 Laboratorní diagnostika

Diagnostika kmenů *Staphylococcus aureus* je založena na mikroskopickém a kultivačním průkazu z příslušného materiálu. Podle povahy onemocnění může být základním materiálem odsátý hnis z abscesů, ran a popálenin, sloužící ke zhotovení mikroskopického preparátu, dále se využívá sputum pacientů, stolice, krev, moč nebo výtěr z nosu a stěry z perinea. Při podezření na potravinovou intoxikaci mohou posloužit jako základní vyšetřovací materiál zvracky. (Greenwood et al. 1999) Jelikož jsou stafylokoky odolné vůči vlivům vnějších podmínek, není třeba dbát zvláštních opatření při odběru a transportu materiálu. (Votava 2010)

Mikroskopicky můžeme po obarvení podle Grama pozorovat grampozitivní koky ve shlucích a četné leukocyty (Obr. 2). Pouhá mikroskopie však nemusí stačit pro odlišení stafylokoků od jiných grampozitivních koků. (Votava 2010)

Obrázek 2: Grampozitivní *S. aureus*, zvětšeno 100x

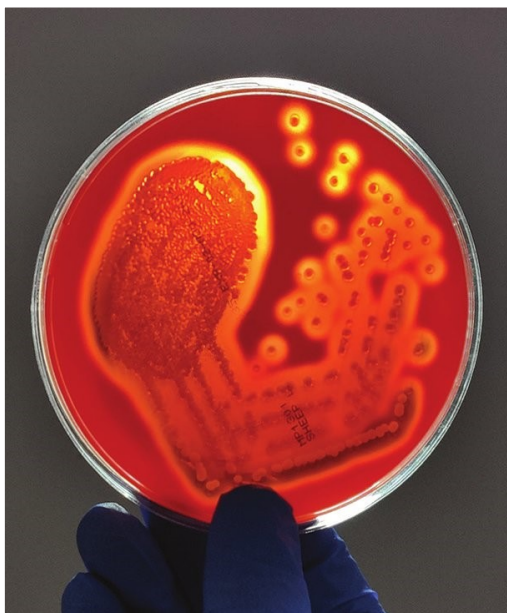


Zdroj: https://www.researchgate.net/publication/322243680_Molecular_Characterization_of_Staphylococcus_aureus_of_Camel_Camelus_dromedarius_Skin-Origin

Kultivační průkaz stafylokoků se provádí na běžných laboratorních půdách, převážně na krevním agaru. Pro záchyt agens z kontaminovaného materiálu je vhodné použít selektivní půdu, například KA s 10 % NaCl, agar s mannitolem a solí, Columbia agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou nebo agar s fenylethylalkoholem. Všechny tyto půdy se odečítají za 48 až 72 hod z důvodu počátečního potlačení jak gramnegativní flóry, tak do jisté míry i samotných stafylokoků. K záchytu a identifikaci MRSA kmenů slouží speciální chromogenní půdy s přidavkem vhodného antibiotika, například cefoxitinu. Na

neselektivních půdách vyrůstají kolonie po 24 hod inkubaci, vhodné je odečíst i za 48 hod kvůli zjištění, zda kultura neobsahuje více kmenů stafylokoka. Kolonie jsou velké 1 až 3 mm, neprůhledné, krémové konzistence a vždy pigmentované. Pigment může být nejdříve bílý až šedobílý, po několika dnech je charakteristicky zlatožlutý. Zlatý stafylokok produkuje hemolyzin, který je zodpovědný za hemolýzu, ta se bohužel nedá s jistotou využít ani k orientačnímu odlišení *S. aureus* od ostatních kmenů stafylokoků. (Votava 2010)

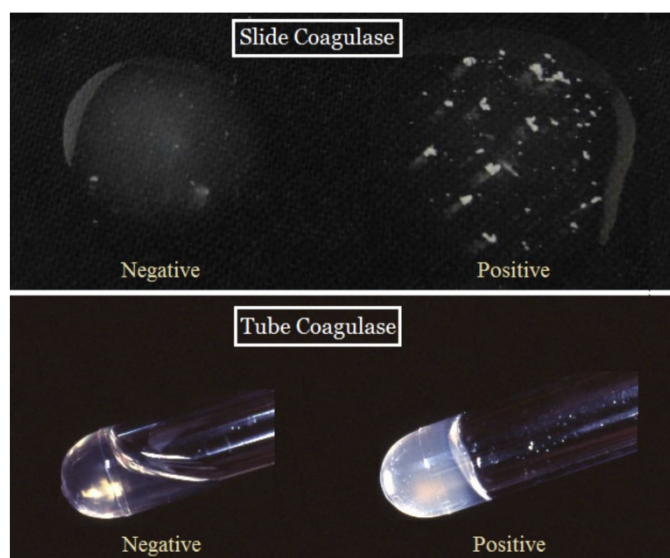
Obrázek 3: Zlatožluté kolonie *S. aureus* s β -hemolýzou na KA



Zdroj: https://www.researchgate.net/publication/337982683_Childhood_blistering_distal_dactylitis_An_uncommon_cutaneous_manifestation_of_Staphylococcus_aureus

Identifikace *S. aureus* se provádí pomocí testu koagulace králičí plazmy. Pro průkaz podezřelých kolonií se využívá vázaná koaguláza, tzv. *clumping-factor*. Ze suspektní kolonie se na sklíčku připraví hustá homogenní suspenze, do které se přidá kapka králičí nebo prasečí plazmy. Pokud dojde do 10 s k aglutinaci, vyvolanou přeměnou fibrinogenu na fibrin, test můžeme považovat za pozitivní a testovaný vzorek za kmen *S. aureus*. V opačném případě je potřeba otestovat tvorbu volné koagulázy zkumavkovým testem. Izolovaná kolonie se rozmíchá v asepticky naplněných zkumavkách s lyofilizovanou králičí plazmou a po 4 hod inkubaci při 37 °C se pátrá po chuchvalci sražené plazmy. (Votava 2010)

Obrázek 4: Průkaz volné a vázané koagulázy sklíčkovou a zkumavkovou metodou



Zdroj: <http://laboratorytests.org/coagulase-test/>

K určení kmenů *S. aureus* se dále využívá dekapsulačního testu dle profesora Borise Skalky, založeného na průkazy hyaluronidázy. (Votava 2010) „*Test využívá schopnost S. aureus potlačit tvorbu pouzder u Streptococcus equii, což se projeví po 24 hod kultivaci půlkruhovou zónou bez hleny v místě naočkování stafylokoka kolmo ke streptokokovi.*“ (Janečková 2013)

Pro průkaz stafylokokových toxinů, jako jsou enterotoxiny nebo TSS-1, se používají metody ELISA, latexové aglutinace, imunoprecipitace nebo molekulárními metodami. (Julák 2006)

Fagotypizace zjišťuje citlivost kmene stafylokoka k sadě 23 typů bakteriofágů, čímž dokážeme určit tzv. fagotyp kmene. Toho se využívá při hromadném výskytu stafylokokových kmenů u různých osob a jejich okolí. Díky rozlišení jednotlivých fagotypů lze přesně určit zdroj a způsob šíření. (Greenwood et al. 1999) V současnosti se využívají převážně molekulárně biologické metody.

1.6 Terapie

Povrchové stafylokokové infekce se hojí spontánně. U lokalizovaných infekcí je primární terapií chirurgické ošetření s vypuštěním hnisu a případné odstranění cizího tělesa s řádnou drenáží, aby hnis mohl i nadále volně odtékat. (Votava 2003) Současně, zvláště u hluboké a generalizované infekce, je nutné jak chirurgické ošetření, tak i antibiotická terapie.

(Julák 2006) Z důvodu narůstající antibiotické rezistence je dnes vhodnou alternativou pro léčení stafylokokových infekcí bakteriofágová léčba.

1.7 Citlivost k antibiotikům

Ačkoli Alexander Fleming objevil účinek penicilinu právě na samotném zlatém stafylokoku vykazujícím přirozenou citlivost k antimikrobiálním látkám (Tab. 1), nyní je přes 90 % kmenů rezistentních. (Greenwood et al. 1999)

Tabulka 1: Antimikrobiální léčba

Antibiotika účinná proti stafylokokům	Látky bez protistafylokokového účinku
peniciliny*	mecilinam
cefalosporiny	termocilin
aminoglykosidy	monobaktamy
tetracykliny	polymyxiny
makrolidy	nitroimidazoly
linkosamidy	chinolony**
glykopeptidy	
fluorochinolony***	
rifampicin	
kyselina fusidová	
trimetoprim	
chloramfenikol	

* rezistence je běžná; ** kyselina nalidixová a další; *** ciprofloxacin a další

Zdroj: Greenwood et al. 1999

Tato rezistence začala vznikat velmi krátce po jejich zařazení do běžné lékařské praxe, kdy se předepisování antibiotik stalo každodenní rutinou. K tvorbě odolnosti přispělo i podávání antibiotik zvířatům pro jejich léčbu a zvýšení tvorby svaloviny. „*Studie Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) o zdravotní zátěži, která je spojena s rezistencí vůči antibiotikům, zveřejněná 5. listopadu 2018, odhaduje, že zhruba 33 000 lidí zemře každý rok v důsledku infekce způsobené bakteriemi odolnými vůči antibiotikům.*“ (Žemličková 2018)

Stafylokoky začaly být rezistentní, protože získaly plazmid kódující schopnost tvořit penicilinázu, β -laktamázu, jež otvírá β -laktamový kruh v molekule penicilinu, čímž penicilin ztrácí svůj antimikrobiální účinek. (Votava 2003) Později bylo vyrobeno několik semisyntetických penicilináza-rezistentních penicilinů, jako je oxacilin (v zahraničí se

používal příbuzný methicilin), kloxacilin a flukloxacilin. Cefalosporiny I. generace a enzymové inhibitory β -laktamáz, kyselina klavulanová a sulbaktam, byly také odolné vůči působení penicilinázy. Výsledkem mutace genu *mecA*, jenž kóduje jednu z esenciálních bílkovin poutajících penicilin ve stěně bakterie (PBP2'), je vznik rezistence k oxacilinu a ostatním β -laktamům. Tyto kmeny, tzv. multirezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*, mohou bohužel být rezistentní i vůči jiným protistafylokokovým antibiotikům - gentamicinu, erytromycinu a tetracyklinu. Mnohonásobné mutace nejspíše vznikají na sebe se navazujícími mutacemi a přenosem plazmidů nesoucích geny rezistence (Tab. 2). „V přenosu genů z plazmidu na chromozom se také uplatňují transpozomy.“ (Greenwood et al. 1999)

Tabulka 2: Mechanismy rezistence *S. aureus* k protistafylokokovým látkám

Látka	Mechanismus rezistence	Lokalizace genů
peniciliny*	β -laktamy	plazmid
methicilin**	změněná bílkovina PBP2'	chromozom
cefalosporiny	změněná bílkovina PBP2'	chromozom
chloramfenikol	acetyltransferáza	plazmid
tetracyklin	snížená akumulace	plazmid
erytromycin	metylace ribozomu	plazmid
streptomycin	změněná ribozomová bílkovina	chromozom
ostatní aminoglykosidy	enzymatická modifikace	plazmid
kys. fusidová	změněný faktor G	chromozom
rifampicin	změněná RNA-polymeráza	chromozom

* kromě methicilinu, nafcilinu a izoxazolylpenicilinů; ** včetně nafcilinu a izoxazolylpenicilinů

Zdroj: Greenwood et al. 1999

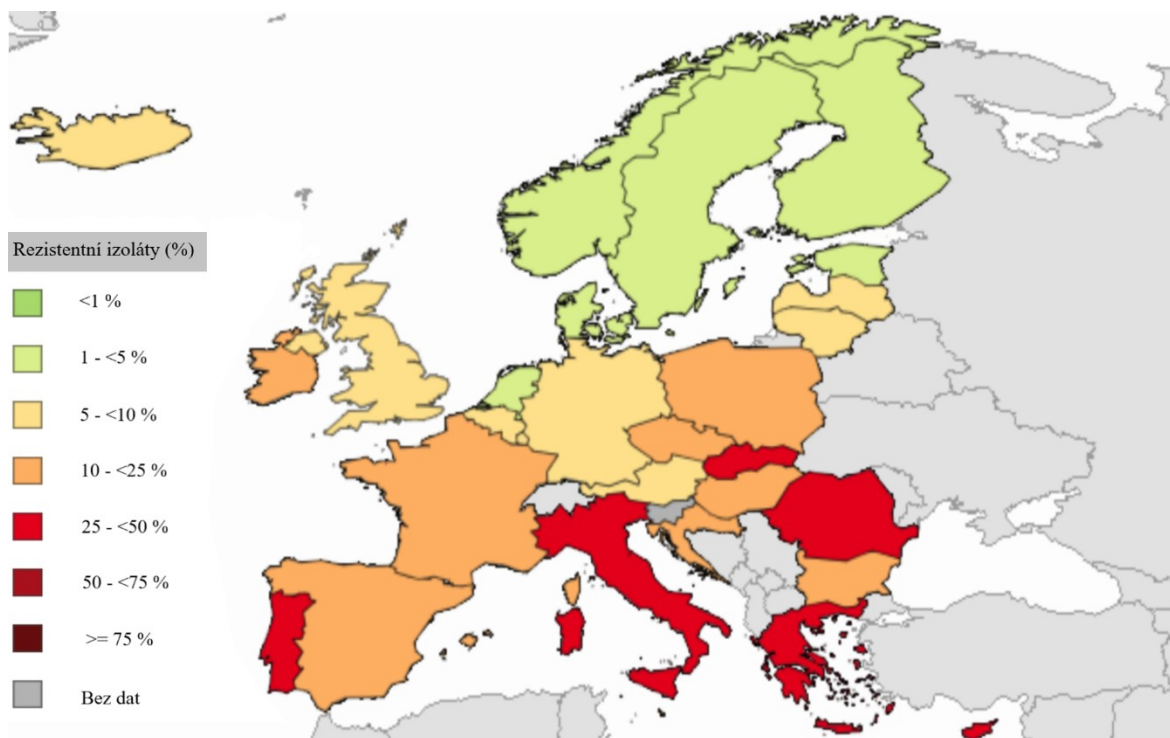
1.7.1 MRSA

Zkratka MRSA pochází z anglického názvu *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Již z názvu vyplývá, že se jedná o multirezistentní kmeny zlatého stafylokoků odolné proti methicilinu. MRSA kmeny mají tedy schopnost vzdorovat téměř všem dostupným β -laktamovým antibiotikům. Statistiky upozornily na to, že 40 až 70 % nozokomiálních infekcí vyvolaných *S. aureus* na celém světě je právě způsobeno MRSA kmeny. První MRSA byl nahlášen v nemocnici ve Velké Británii roku 1961 po podání methicilinu pacientovi, který byl doposud neúspěšně léčen na stafylokokovou infekci pomocí penicilinu. (Rachman et al. 2017)

Obecně lze MRSA rozdělit do dvou hlavních skupin známých jako MRSA pocházející z nemocnic (z angl. slova *hospital-acquired*; HA-MRSA) a komunitní MRSA (z angl. slova *community-acquired*; CA-MRSA). Celosvětově je většina MRSA infekcí původu ze zdravotnických zařízení. V současné době byla objevena další forma MRSA kmenů spojená s hospodářskými zvířaty, tzv. LA-MRSA. Při porovnání MRSA pocházejících z nemocnic a z veřejných komunit byla odhalena velká odlišnost těchto dvou hlavních skupin. Nemocniční MRSA postihuje většinou starší pacienty, oslabené a chronicky nemocné. HA-MRSA vykazuje vysokou antimikrobiální rezistenci, ale menší virulenci a nedostatek schopností pro kolonizaci. Mezitím komunitní MRSA izoláty napadají mladé a zdravé lidi, jako jsou děti, studenti nebo sportovci. CA-MRSA mají nízkou antimikrobiální rezistenci, za to jsou vysokovirulentní a obsahují PV gen. (Rachman et al. 2017)

Na obrázku 5 můžeme pozorovat situaci jednotlivých států v Evropě v boji proti rezistenci *Staphylococcus aureus* vůči antibiotikům. Tímto sběrem dat se zabývá Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí, které každoročně publikuje zprávy o výsledku studie. Poslední informace pocházejí z roku 2019. V Evropě si nejobstojněji vedou severské státy – Norsko, Švédsko, Finsko s 1 až <5 % podílu MRSA kmenů ze všech izolátů *S. aureus*. V posledních letech ekonomické velmoci, jako je Velká Británie, Německo nebo Belgie, úspěšně snížily počet podílu MRSA izolátů na 6 %. O něco vážnější situace nastává v České republice, Polsku, Francii a Španělsku, kde se podíl MRSA vyšplhal mezi 10 až <25 %. Nejkritičtější situace probíhá v jižní a jihovýchodní Evropě. Výskyt v těchto zemích dosáhl 25 až <50 %. Navzdory stále se zvyšujícím případům infekcí způsobených MRSA kmeny je situace ve většině zemí stabilní. (ANON. 2021)

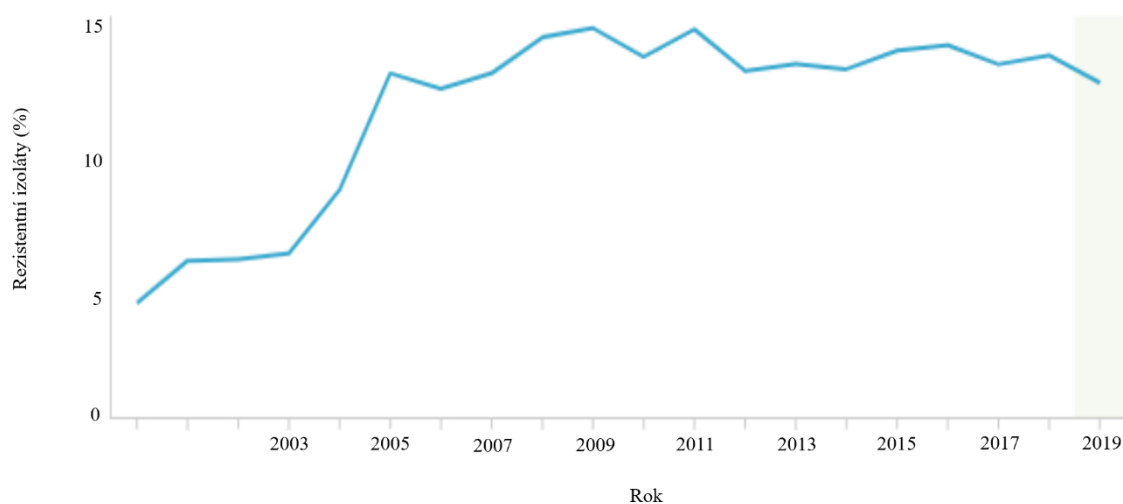
Obrázek 5: Procentuální zastoupení výskytu MRSA ze všech izolátů *S. aureus* v Evropě



Zdroj: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (upraveno)

Výskyt MRSA kmenů má v České republice od roku 2000 vzestupný trend (Obr. 6). Obrovský zlom nastal v roce 2003, kdy se z původních 6 % poměr MRSA za dva roky zdvojnásobil na necelých 13 %. Od té doby se hodnoty prevalence drží mezi 12 a <15 %. Maximálních hodnot bylo dosaženo v roce 2009 (14,6 %). V současné době zůstává situace stabilizovaná, dokonce se i mírně zlepšila. (ANON. 2021)

Obrázek 6: Procentuální poměr výskytu MRSA v České republice v letech 2000-2019



Zdroj: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (upraveno)

1.7.2 VRSA

Pro náhradní terapii MRSA infekcí byl vyhrazen dobře účinný vankomycin, ke kterému byly dlouho všeobecně citlivé kmeny stafylokoků. Postupně se však začaly objevovat kmeny se sníženou citlivostí k vankomycinu. (Schindler 2014) Tyto izoláty *S. aureus* se sníženou senzitivitou k vankomycinu klasifikuje Institut pro klinické a laboratorní normy (CLSI) do tří skupin. Jedná se o vankomycin citlivé kmeny *S. aureus* (*Vancomycin-susceptible S. aureus*; **VSSA**), kmeny se sníženou citlivostí (*Vancomycin intermediate-resistant S. aureus*; **VISA**) a konečně i vysoce rezistentní kmeny (*Vancomycin-resistant S. aureus*; **VRSA**). Při potvrzení, zda se jedná o VRSA izolát, by měla být provedena molekulárními metodami přítomnost determinantů rezistence. (Cong et al. 2020)

Rezistence VRSA je způsobena genem *van* a operonem, který je přítomen na plazmidech. Ačkoli je léčba infekcí způsobených VRSA náročná, celkový počet lidských infekcí VRSA je dosud omezený. První VRSA kmen byl nahlášen roku 2002 v Michiganu, USA. Ve stejném roce byl objeven i další VRSA též v USA, konkrétně v Pensylvánii. Od té doby bylo celkem nahlášeno 52 VRSA kmenů nesoucích *van* geny. (Cong et al. 2020)

2 BAKTERIOFÁGOVÁ LÉČBA

Antibakteriální rezistence je v dnešní době hlavním a rostoucím globálním zdravotním problémem. Světová zdravotnická organizace (*World Health Organisation*; WHO) ve své první celosvětové zprávě o rezistenci na antibiotika z roku 2014 zdůraznila nebezpečí nadcházející post-antibiotické éry, kdy by mohly být zcela elementární infekce opět smrtelné. V Evropě, zejména v zemích s vysokou rezistencí vůči jiným lékům, stále stoupá rezistence na antibiotika, což velmi omezuje terapeutickou léčbu. Na druhé straně farmaceutické společnosti projevují menší zájem o vývoj a výrobu nových antimikrobiálních látek hlavně z toho důvodu, že je antibakteriální trh méně výnosný než ostatní trhy. Vývoj terapeutických látek, které jsou alternativami k antibiotikům, může být velkou pomocí v boji proti rezistenci. Bakteriofágy a léky na bázi bakteriofágů mají obrovský potenciál stát se jednou z nejuspěšnějších alternativ k antibiotikům. (Kakasis a Panitsa 2019)

2.1 Objev bakteriofágů

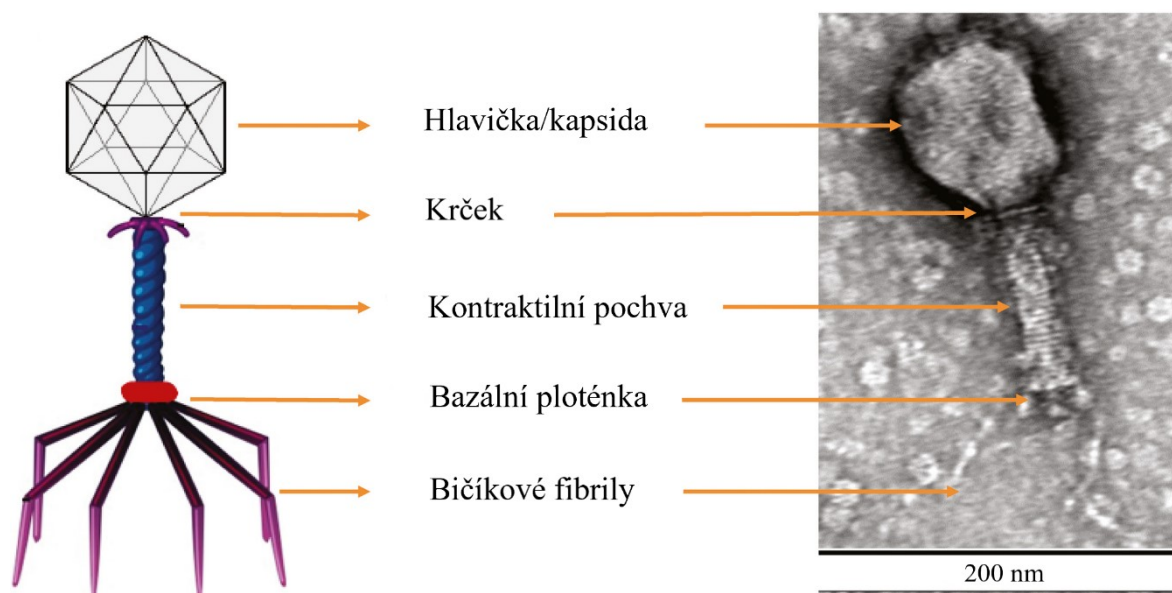
První zpráva o antiseptickém účinku řek Gangy a Jumny v Indii na bakterie *Vibrio cholerae* byla zaznamenána britským bakteriologem Ernestem Hankinem v roce 1896. Důvod tohoto účinku nebyl v té době prozatím znám. (Wittebole et al. 2014) Další zprávu týkající se podobného jevu nazval Frederick Twort jako „*An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses*“, publikoval ji roku 1915. (Kwiatek et al. 2019) Autor studoval růst bakteriálních kolonií na agarovém médiu a popsal neznámé entity způsobující vznik projasněných míst na agaru, kde se nedařilo růstu bakteriím. Twort však nebyl schopen alespoň částečně prokázat svou hypotézu kvůli nedostatku financí. O dva roky později, Felix d'Herelle pozoroval podobný fenomén v kulturách stolice u pacientů zotavujících se z bacilární úplavice. Na rozdíl od Tworta byl přesvědčen, že příčinou inhibice růstu bakterií byla přítomnost virů „požírajících“ bakterie. Tyto viry byly pojmenovány bakteriofágy (řecky *phagein* = jíst) a objeveny d'Herellem na pařížském Pasteurově institutu. (Wittebole et al. 2014)

2.2 Charakteristika bakteriofágů

Bakteriofágy, zkráceně fágy, jsou viry infikující a replikující se v hostitelské buňce bakterií. Fágy patří mezi nejhojnější organismy, jejich počet se odhaduje na 10^{31} a dokáží kolonizovat i ta nejdrsnější prostředí na planetě, jako jsou například vulkanické prameny. (Kwiatek et al. 2019) Bakteriofágy mají relativně jednoduché složení. Obsahují struktury složené z proteinů (60 %), které zapouzdřují genom nukleových kyselin (40 %). Jak je

znázorněno na obrázku 7, fág, průměrně velký 20–200 nm, se skládá z hlavičky, tzv. kapsidy, obsahující lineární nebo cirkulární nukleovou kyselinu, která je pomocí krčku spojena s bičíkem situovaným v kontraktilní pochvě. Na hexagonální bazální ploténku bičíku nasedají bičíkové fibrily pro snadné přichycení fágu na povrchové receptory bakterie. (Ye et al. 2019)

Obrázek 7: Struktura bakteriofágů (*Myoviridae*)



Zdroj: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5694/mja2.50355> (upraveno)

Kvůli podobnosti ve struktuře virionů, organizaci genomu a expresi genetického materiálu jsou bakteriofágy klasifikovány jako jediný řád *Caudovirales*, zahrnující tři čeledi *Siphoviridae* (61,7 %), *Myoviridae* (24,5 %) a *Podoviridae* (13,9 %). (Sharp 2001) Pro čeleď *Siphoviridae* (např. fág λ) je charakteristická absence stažitelné pochvy, bičík je dlouhý, tenký a flexibilní. Naproti tomu bičík zcela chybí zástupcům čeledi *Podoviridae* (např. fág T7). „Fágy čeledi *Myoviridae* (např. fág T4) mají bičík opatřený kontraktilní pochvou, která jim umožňuje injekci fágové nukleové kyseliny do hostitelské buňky.“ (Eyer 2008) Z tabulky 3 je zřejmé, že bakteriofágové genomy se skládají buď z jednořetězcové nebo dvouřetězcové DNA nebo RNA a jejich velikost se může lišit od 4 do 725 kb. (Sharp 2001)

Tabulka 3: Bakteriofágový genom

Bakteriofág	Nukleová kyselina	Velikost genomu
T1	dsDNA	50 kb
T3, T7	dsDNA	40 kb
T5	dsDNA	130 kb
T2, T4, T6	dsDNA	170 kb
λ	dsDNA	48,5 kb
G	dsDNA	725 kb
ϕ X174	ssDNA	4,5 kb
M13	ssDNA	6,4 kb
PRD1	dsDNA	15 kb
SSV1	dsDNA	15,5 kb
MS2	ssDNA	4 kb
ϕ CH1	dsDNA	55 kb
ϕ 6	3 segmenty RNA	13,4 kb

Zdroj: Sharp 2001

2.2.1 Reprodukční cyklus

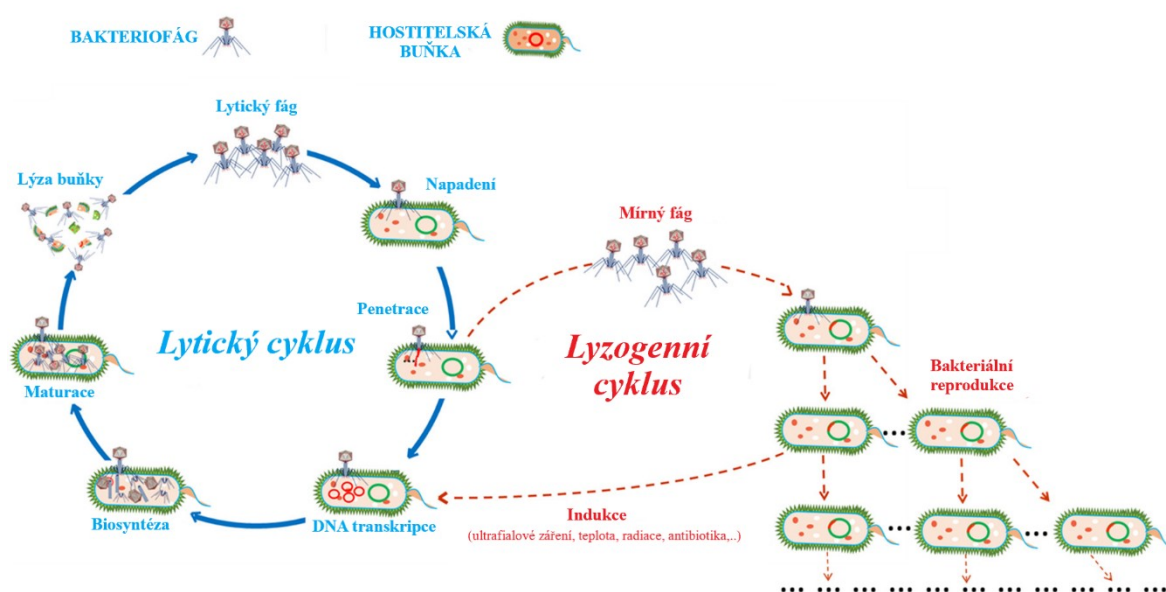
Bakteriofágy lze také rozdělit na lytické fágy a fágy temperované, neboli mírné, na základě toho, zda je jejich genom integrován do bakteriálního genomu či nikoliv. (Ye et al. 2019)

Protože jsou bakteriofágy viry, jsou schopni reprodukce pouze v hostitelské buňce. Fungují tedy jako nitrobuněční parazité, kteří infikují vhodné buňky, do kterých zabudují svoji genetickou informaci. Životní cyklus fága začíná rozpoznáním hostitelské buňky pomocí specifických bílkovin, jež mají v kapsidě, a receptorů lokalizovaných na povrchu hostitelské buňky. Po napadení do sebe bílkoviny fága a bílkoviny receptorů hostitelské buňky zapadnou jako zámek a klíč. Tímto vstupem do buňky je zahájeno rozmnožování fágů. (Závodská 2006)

Lytický cyklus zahrnuje několik fází, bez kterých by nebyla možná reprodukce. Po připojení bakteriofága na hostitelskou buňku dochází k penetraci, kdy fág pomocí kontraktálního bičíku dostane dovnitř napadené buňky svoji nukleovou kyselinu a přinutí ji vytvářet nové bílkoviny podle jeho genetické informace. Hostitelská buňka začne syntetizovat proteiny, které tvoří kapsidy fágů. Z nově vytvořených kapsid a molekul nukleových kyselin se stávají nové bakteriofágy. Lytický cyklus končí lýzou hostitelské buňky kvůli migraci nově vytvořených fágů ven z buňky. (Závodská 2006)

Naproti tomu mírné fágy, procházející **lyzogením cyklem**, obvykle integrují své genomy do jaderné DNA hostitelské buňky, a tím se stávají součástí jejího genomu. Během buněčného cyklu bakteriální hostitelské buňky se fágová společně s bakteriální DNA replikuje a během mitózy se dostává do dceřiných bakteriálních buněk. Dceřiné buňky mají ve svém chromozomu zabudovanou i fágovou DNA, kterou mohou dále předávat. Pod tlakem rušivých faktorů (např. ultrafialového záření, ionizujícího záření, vysoké teploty nebo antibiotik) je pravděpodobné, že se lyzogení cyklus přemění na cyklus lytický. (Ye et al. 2019; Závodská 2006)

Obrázek 8: Životní cyklus bakteriofága



Zdroj: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412019305410> (upraveno)

2.3 Počátky a současnost fágové terapie

Po objevení bakteriofágů byla myšlenka fágové terapie přijata s nadšením a v mnoha případech i realizována. (Kakasis a Panitsa 2019) Roku 1917 v Paříži zahájila společnost d'Herelle testování fágové léčby na lidských pacientech s těžkou úplavicí. I přes počáteční nedůvěru byla léčba účinná, pacienti se začali zotavovat do 24 hod po podání první léčebné dávky. První klinická studie vyšla roku 1921, sepsal ji Bruynoghe a Maisin. Bakteriofágy sloužily k léčbě kožních furunklů a karbunklů, do jejichž okolí byl injekčně aplikován specifický fág. Bruynoghe a Maisin popsali jasný důkaz klinické regrese infekce do 48 hod se snížením bolesti, otoku a horečky pacientů. (Wittebole et al. 2014)

Objevení a zavedení antibiotik ve 40. letech 20. století vyústilo k upuštění od výzkumu bakteriofágů. Vývoj a používání fágové terapie pokračovalo pouze v Polsku, Rusku, Gruzii a v celém SSSR. Především na Západě zůstala fágová terapie kontroverzním tématem, protože existovalo velmi málo publikovaných studií splňujících tehdejší standardy klinického výzkumu. (Nikolich a Filippov 2020)

Většina historických dat o používání a vývoji fágové terapie je spojena se dvěma místy: Hirszfeldovým institutem imunologie a experimentální terapie v polské Vratislavi a Eliavovým institutem v Tbilisi, který se nachází v Gruzii. Hlavním zaměřením institutu Eliava byla výroba a terapeutické použití fágových koktejlů zaměřujících se na specifické patogenní bakterie. Naproti tomu Hirszfeldův institut byl především zaměřen na výzkum fágové terapie. Oba instituty jsou v provozu dodnes. (Kakasis a Panitsa 2019)

Nadměrné užívání antibiotik v posledních letech zapříčinilo stále se zvyšující mikrobiální rezistenci, a proto se bakteriofágy dostaly do popředí výzkumu. Vyspělé země si jsou vědomy velkého potenciálu fágové léčby, a tak Belgie a Francie schválily terapeutické použití fágů, zatímco například ve Spojených státech výzkum stále probíhá. (Nikolich a Filippov 2020)

2.3.1 Fágová terapie v České republice

Od 70. let 20. století probíhal výzkum fágové léčby i na území tehdejšího Československa pod vedením RNDr. Jiřího Pillicha, CSc. na Biofyzikálním ústavu Akademie věd v Brně. Fágové preparáty nazývané jako Stafal, Stava a Stava-nasal, připravované pomocí virulentních a polyvalentních stafylokokových fágů, sloužily k inhibici stafylokokových furunkulóz, osteomyelitid, mastitid a dalších infekcí. Později výrobu fágových preparátů převzaly společnosti SEVAC, a. s. a Sevapharma, a. s. (Eyer et al. 2007)

V současnosti se léčiva Stava a Stava-nasal v ČR již nevyrábějí. (Eyer et al. 2007) Ve spolupráci s Ústavem experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně se soukromá firma Bohemia Pharmaceuticals, s. r. o. zabývá další inovací protistafylokokového přípravku Stafal®. (ANON. nedatováno)

2.3.1.1 Stafal®

Stafal® je protistafylokokový bakteriofágový preparát sloužící k lokální léčbě. Obsahuje vysoce účinné polyvalentní virulentní fágové partikule se silným a okamžitým rozpouštěcím účinkem. (ANON. 2014) Působí na celou škálu kmenů *Staphylococcus aureus*, včetně kmenů MRSA. „*V současné době je tekutý Stafal® registrován na Slovensku jako léčivý přípravek společnosti Bohemia Pharmaceuticals. Ve spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně probíhá neustálý vývoj stabilnější lyofilizované práškové formy. Na rozdíl od kapalných formy má minimální dobu použitelnosti 30 měsíců.*“ (ANON. nedatováno)

Tento přípravek je standardizovaný podle koncentrace specifických bakteriofágových částic, jejichž počet musí v 1 ml dosahovat minimálně 1×10^7 . Používá se k eliminaci stafylokokových buněk z ložisek a potencionálních zásobáren infekce (především z horních cest dýchacích). Stafal® se také stal lékem pro chronické stafylokokové infekce, především u infekcí postihující hluboko uložené měkké tkáně, u nichž hrozí přechod do sepse. (ANON. 2014)

Jeho aplikace je velmi různorodá. Pacientovi se může aplikovat přímo do postiženého místa pomocí obvazů a gáz namočených v léku Stafal®, sprejováním nebo výplachem. Při použití léku do nosních dírek se podávají 1 až 2 kapky. Podle klinického nálezu se zpravidla aplikuje 2x denně. (ANON. 2014)

2.4 Porovnání fágové terapie oproti antimikrobiální léčbě

Antibiotika byla objevena v době, kdy ještě měly bakteriální infekce vysokou úmrtnost. Tím se stala vysoce atraktivními, především díky svému širokospektrálnímu účinku, který umožňuje jejich použití proti širokému spektru bakteriálních kmenů bez nutnosti přesného určení infekčního agens. Nicméně tato hlavní výhoda byla také velkou nevýhodou. Vzhledem k tomu, že jsou antibiotika relativně nespecifická vůči bakteriím, eliminují také organismu prospěšnou komenzální mikroflóru, zejména ve střevě - po perorálním podání antibiotik. Tento vliv na lidský organismus je dále spojen s vedlejšími účinky, jako jsou střevní potíže nebo sekundární infekce. (Ganeshan a Hosseinidoust 2019)

S pomocí bakteriofágů bychom se mohli těmto problémům zcela vyhnout, protože bakteriofágy jsou velmi specifické. To znamená, že lze vyrobit taková fágová terapeutika, která by byla účinná proti konkrétní infekci. Tím dojde k likvidaci pouze původců infekce a střevní mikrobiom zůstane zachován. Bohužel nic není jednoduché, jak se zdá. Mnoho

infekcí je polymikrobiálních, což by vyžadovalo použití spíše fágových koktejlů namísto čistého preparátu tvořeného jedním druhem fága. (Ganeshan a Hosseinidoust 2019)

2.4.1 Výhody fágové terapie

Na základě klinických studií z minulých let má fágová terapie v určitých případech vyšší účinnost než léčba pomocí běžných antibiotik. (Eyer et al. 2007)

Jak již bylo uvedeno výše, velkou výhodou bakteriofágů je jejich vysoká specifita, tj. obvykle postihují pouze patogenní mikroby, a tudíž nijak neohrožují přirozenou mikroflóru člověka. (Sulakvelidze et al. 2001)

Bakteriofágy na rozdíl od antibiotik, která jsou metabolizována a vylučována z těla ven, se replikují přímo v místě infekce. Tím pádem jsou k dispozici přesně tam, kde je jejich potřeba. (Sulakvelidze et al. 2001)

U bakteriofágové léčby dosud nebyly popsány žádné závažné nežádoucí účinky. Objevilo se pár méně významných vedlejších účinků, nejspíše spojených s endotoxiny uvolňovanými z lyzovaných bakterií. Tyto účinky však lze pozorovat i u antibiotické léčby. (Sulakvelidze et al. 2001)

Velkou výhodou fágů je jejich obrovská rozmanitost. V biosféře se vyskytují ve velkém množství, proto je relativně rychlé a snadné nové fágy vyhledat a izolovat, i když si bakterie vytvoří vůči nim rezistenci. (Ganeshan a Hosseinidoust 2019)

„Mechanismus bakteriální rezistence na antibiotika a fágy je zcela odlišný.“ (Ganeshan a Hosseinidoust 2019) Tudíž bakterie, které jsou rezistentní na antibiotika, mohou být léčené pomocí fágové terapie a naopak. Tato kombinace terapie představuje zajímavou strategii léčení vysoce rezistentních infekcí. (Ganeshan a Hosseinidoust 2019)

2.4.2 Možné nevýhody fágové terapie

I přes všechny uvedené výhody, existuje několik omezení v používání této léčby.

Velkou nevýhodou fágové terapie je potřeba rychle určit přesnou příčinu vzniku infekce. Vysoká specifita fágové terapie proti specifickým patogenům je hlavní výhodou, ale také značně komplikuje jejich podání. Klinický vzorek musí být izolován, kultivován a identifikován pomocí standardních mikrobiologických diagnostických postupů. Poté se musí stanovit citlivost etiologického mikroorganismu k fágu. Nakonec může být vybrán vhodný bakteriofágový preparát. Ve výsledku je tento proces velmi zdlouhavý. Problém by mohl být

vyřešen s pomocí použití polyvalentních fágů a směsí z nich připravených, díky nimž by fágy působily na široké spektrum bakterií. (Eyer et al. 2007; Wittebole et al. 2014)

Mezi další nevýhodu fágové terapie můžeme řadit potenciální schopnost bakteriofágů přenést DNA z jedné bakteriální buňky na jinou. Tento přenos genetického materiálu, tzv. transdukce, by mohl být zodpovědný za přenos různých determinant patogenity a faktorů virulence, které by mohly vést k vývoji nového mikroba, nebo dokonce odolnější bakterie. (Wittebole et al. 2014)

Bakteriofágy jsou na rozdíl od běžných antibiotik složeny pouze z proteinů a nukleových kyselin. Tudíž jako biologicky aktivní látky mají schopnost interagovat s lidským imunitním systémem a dalšími buňkami v těle, kde se mohou aktivně replikovat a vyvíjet. (Ganeshan a Hosseinidoust 2019)

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Vzhledem k narůstajícímu výskytu rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* k oxacilinu (tzv. MRSA) se alternativní terapie stafylokokových infekcí stále více dostává do povědomí mnoha vědců. Fágová terapie by mohla v budoucnu nahradit běžné antibiotické preparáty.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit účinek a citlivost bakteriofágového lyzátu k izolovaným kmenům *S. aureus* a porovnat ji s citlivostí k testovaným antibiotikům.

4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

- 1) Jaká je účinnost fágového lyzátu na izolované kmeny *S. aureus*?
- 2) Jaké rozdíly ve výsledcích můžeme pozorovat mezi citlivostmi kmenů MSSA a MRSA k fágovému lyzátu?
- 3) V jaké nejnižší koncentraci je fágový lyzát ještě účinný?
- 4) Jaké jsou rozdíly citlivostí kmenů *S. aureus* k fágovému lyzátu a antibiotikům?

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pro výzkum této bakalářské práce bylo použito 30 kmenů *Staphylococcus aureus*, které byly izolovány z klinických vzorků na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň. Tyto vzorky pocházely od pacientů z ambulantních i lůžkových zařízení FN Plzeň, sbírány byly po dobu dvou měsíců na jaře roku 2020. Původ klinických materiálů je velmi rozmanitý. Kmeny *S. aureus* byly izolovány ze závažných ran na různých místech těla, dále ze sputa, z nosu, tracheálního aspirátu, bronchoalveolární laváže, moče, krve nebo z výtěru z uretry či pochvy. V izolovaných kmenech se vyskytovaly především MRSA kmeny, které byly tvořeny HA-MRSA, objevil se však i jeden případ CA-MRSA.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Testování citlivosti k antibiotikům

Stanovení citlivosti na antibiotika bylo testováno diskovým difúzním testem na Mueller-Hinton (MH) půdě. Testy byly prováděny na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a jejich vyhodnocení se řídilo dle interpretačního kritéria EUCAST. Výsledky vyšetření citlivosti byly zaznamenány v LIS.

Základní sestavu testovaných antibiotik tvořil erytromycin (ERY), cefoxitin (CXT), gentamicin (GEN), trimetoprim/sulfamethoxazol (COT), tetracyklin (TET) a clindamycin (CLI). V případě močových infekcí byla základní sestava doplněna o furantoin (FUR) a oxacilin (OXA). Při prvním záchytu MRSA byla použita rozšířená antibiotická sestava, kterou tvořil rifampicin (RIF), linezolid (LNZ), tigecyklin (TGC), chloramfenikol (CMP) a ciprofloxacin (CIP). Pokud se však materiál dostal od stejného pacienta do laboratoře opakovaně, již se tyto rozšířené sestavy ATB nedělaly, sledovaly se pouze základní. Pokud se jednalo o důležitý materiál s možnými závažnými zdravotními komplikacemi, prováděla se rozšířená kombinace i opakovaně.

Tabulka 4: Zkratky antibiotik a obsah antibiotik v discích

Zkratka v LIS	Zkratka Oxoid	Disk µg	Antibiotikum
CXT	FOX 30	30	Cefoxitin
CIP	CIP 5	5	Ciprofloxacin
CLI	DA 2	2I	Clindamycin
ERY	E 15	15	Erytromycin
FUR	F 100	100	Furantoin
GEN	CN 10	10	Gentamicin
CMP	C 30	30	Chloramfenikol
LNZ	LZD 10	10	Linezolid
OXA	OX 1	1	Oxacilin
RIF	RD 5	5	Rifampicin
TET	TE 30	30	Tetracyklin
TGC	TGC 15	15	Tigecyklin
COT	SXT 25	25	Trimetoprim/ sulfamethoxazol

Zdroj: vlastní

Princip diskového difúzního testu

Principem metody je to, že mikrob nevyroste kolem antibiotického disku, který je položený na vhodném kultivačním médiu. Po difúzi ATB do média dojde k vytvoření zóny inhibice okolo tohoto disku. Velikost vytvořené inhibiční zóny, respektive její průměr, je porovnáván s hraniční inhibiční zónou, tzv. break-pointem udaným výrobcem. Překročí-li velikost inhibiční zóny hraniční zónu, znamená to, že je testovaná bakterie k antibiotiku citlivá. (Votava 2010)

Pomůcky

rukavice, bakteriologické kličky, tampóny, zkumavky, Pasteurovy pipety, plynový kahan

Reagencie

Mueller-Hinton (MH) agar, antibiotické disky, zkumavky s fyziologickým roztokem

Mikroorganismy

kmeny *Staphylococcus aureus*

Přístroje

denzitometr, vortex, dispensory ATB disků, digitální posuvné měřítko, inkubátor 35 +/- 1 °C

Postup

Na pracovním místě byly připraveny zkoumané kultury, zkumavky s fyziologickým roztokem a také misky, které bylo potřeba popsat pomocí laboratorních čísel (vždy písmenem a trojčíslím). Přibližně 4 až 5 kolonií zkoumaného kmene *S. aureus* bylo přeneseno bakteriologickou kličkou do zkumavky s fyziologickým roztokem. Denzita inokula byla upravena denzitometrem na hodnotu odpovídající 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Správnou hustotu jsme poznali podle toho, že narostlé kolonie začaly splývat. Do 15 minut od přípravy inokula jej bylo nutné v několika směrech naočkovat sterilním tamponem tak, aby byl povrch kultivačního média (MH agar) rovnoměrně pokryt. Následně do 15 minut od naočkování inokula byly na povrch půdy naraženy pomocí dispensorů požadované antibiotické sestavy. Bylo zkontrolováno, zda ATB disky přiléhaly celou plochou a následně byly naočkované půdy vloženy do inkubátoru dnem vzhůru. Po 18 až 20 hodinách od počátku inkubace byly změřeny průměry inhibičních zón pomocí digitálního posuvného měřítka. Výsledky diskového difúzního testu byly interpretovány podle pravidel pro odečítání EUCAST.

Obrázek 9: Rozšířená antibiotická sestava diskového difúzního testu



Zdroj: vlastní

Na obrázku 9 můžeme pozorovat rezistenci testovaného MRSA kmene k ciprofloxacinu, kdy není vytvořena žádná inhibiční zóna kolem papírového disku nasyceného příslušným množstvím antibiotika. Ostatní inhibiční zóny kolem disků antibiotik (rifampicinu, linezolidu, tigecyklinu a chloramfenikolu) překročily referenční velikost zóny udanou výrobcem, to znamená, že je kmen k těmto antibiotikům citlivý.

6.2 Příprava bakteriofágového lyzátu

Pomůcky

rukavice, zkumavky, pipety, provzdušňovací láhev, sterilní baňka

Reagencie

masopeptonový bujón (MPB), sterilní 0,22 % CaCl_2 , chloroform (CHCl_3)

Mikroorganismy

kmeny *Staphylococcus aureus*, bakteriofág (resp. stafylofág)

Přístroje

inkubátor 30 °C

Postup

Jeden den před výrobou fágového lyzátu bylo připraveno inokulum *S. aureus*, jehož denzita odpovídala 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Do 100 ml čerstvého masopeptonového bujónu bylo naočkováno 2 ml narostlého stafylokokového inokula. Za

intenzivní aerace bylo v provzdušňovací láhvi při teplotě 30 °C inkubováno další 4 hodiny. Po kultivaci bylo asepticky přidáno 10 ml sterilního 0,02M CaCl₂ a 5 ml příslušného fágového lyzátu. Po 1 hodině byla provzdušňovací láhev přemístěna z inkubátoru do temna a teploty laboratoře. Za 24 hod byl lyzát sterilizován přidavkem 5 až 10 kapek CHCl₃ na 10 ml lyzátu. Takto sterilizovaný lyzát se nechal působit 1 až 2 hodiny. Nakonec byl lyzát pomocí pipety přemístěn do sterilní baňky. Vytvořený fágový lyzát byl skladován v lednici při teplotě 4 °C. (Kopecká a Rotková 2017)

6.3 Testování citlivosti kmenů *Staphylococcus aureus* k fágovému lyzátu

Pomůcky

rukavice, bakteriologické kličky, tampóny, zkumavky, Pasteurovy pipety, plynový kahan

Reagencie

krvní agar (Oxoid, Německo), fyziologický roztok (Ardeapharma, a. s., Česká republika), fágový lyzát (vyrobený doc. RNDr. Romanem Pantůčkem, PhD. na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně, Česká republika)

Mikroorganismy

kmeny *Staphylococcus aureus*

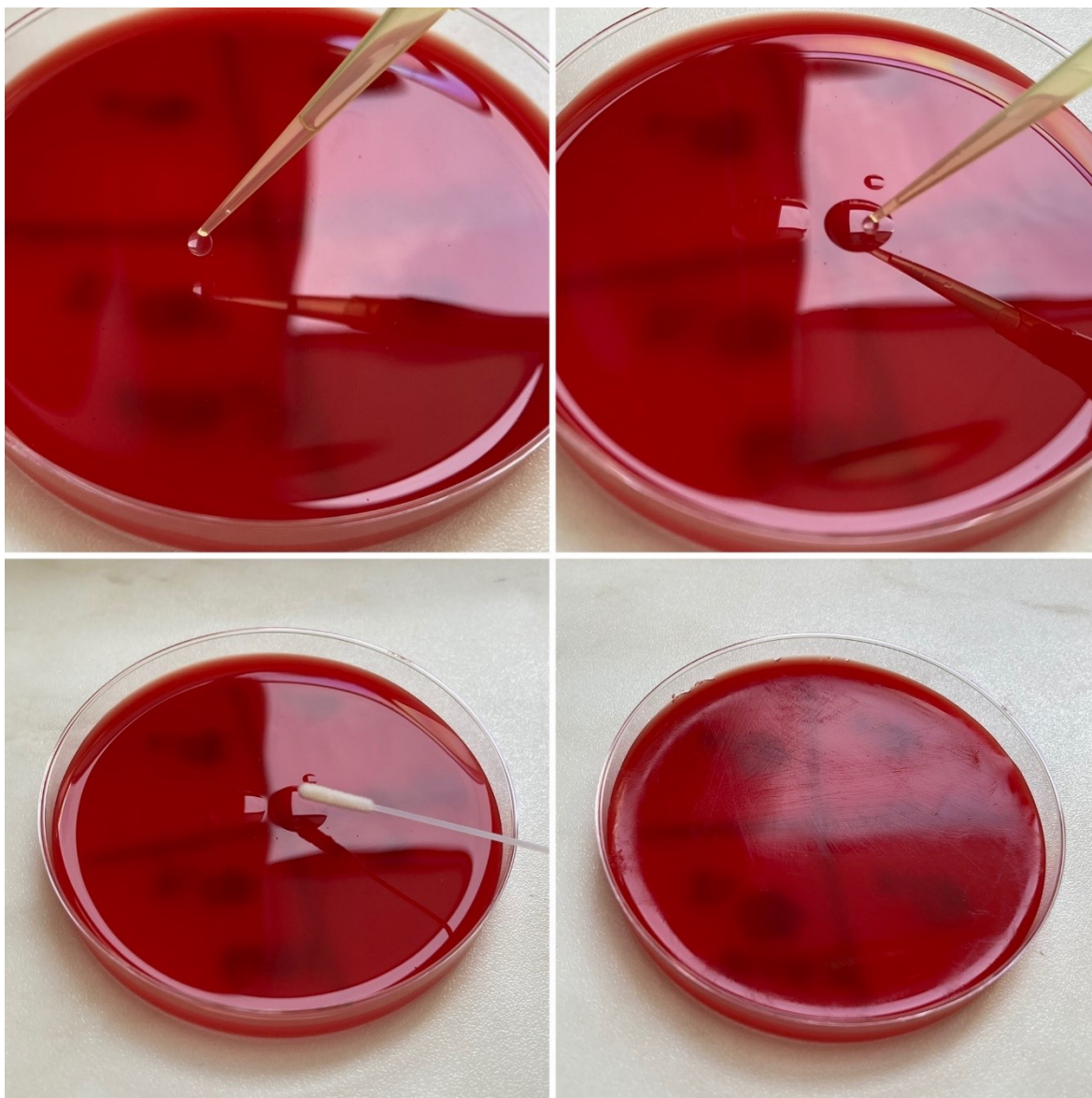
Přístroje

spektrofotometr Spekol, inkubátor

Postup

Na místo, kde byl prováděn výzkum, byly postupně připraveny vyšetřované kultury, popsané krevní agary (číslem kultury, rozdělené na 4 kvadranty podle koncentrace lyzátu), stojan s popsanými zkumavkami pro fyziologický roztok a fágový lyzát. Několik kolonií bylo přeneseno bakteriologickou kličkou do zkumavky s fyziologickým roztokem. Na spektrofotometru Spekol byla připravena suspenze o zákalu 10⁻⁶. Pomocí pipety bylo nanášeno 20 µl stafylokokové suspenze na povrch krevního agaru. Sterilním tampónem byla suspenze všemi směry rovnoměrně rozetřena. Takto naočkovaná půda se nechala 5 min inkubovat při laboratorní teplotě.

Obrázek 10: Naočkování půdy stafylokokovou suspenzí



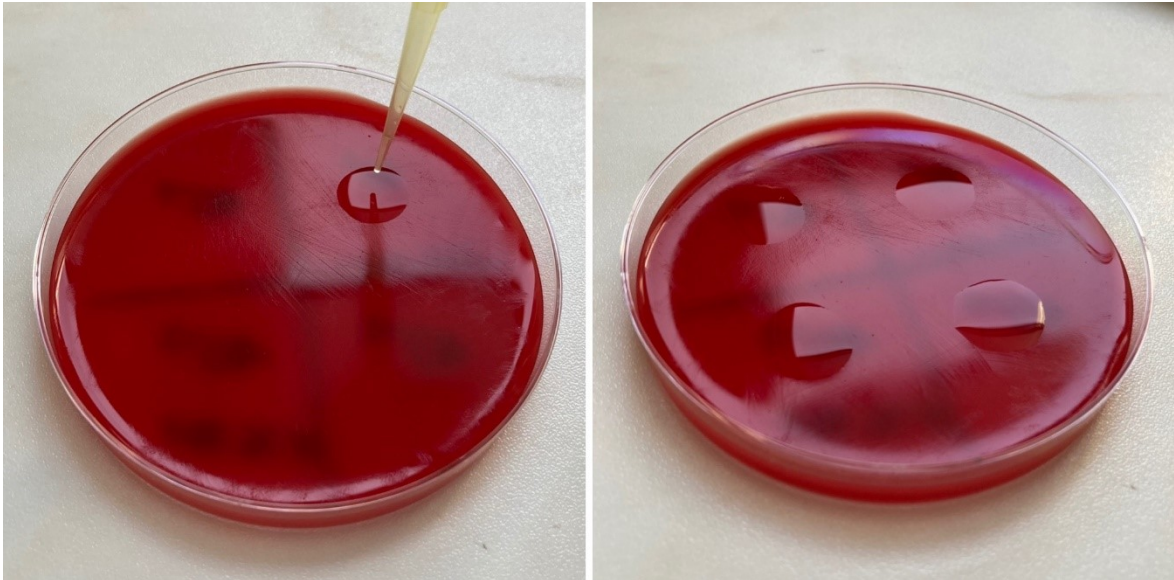
Zdroj: vlastní

Během inkubace byl připraven bakteriofágový lyzát, který bylo potřeba naředit. Lyzát byl naředěn na koncentrace 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dle schématu:

- 10^0 : 1 ml fágového lyzátu
- 10^{-1} : 1 ml fyziologického roztoku + 1 ml fágového lyzátu
- 10^{-2} : 1 ml fyziologického roztoku + 1 ml roztoku o koncentraci 10^{-1}
- 10^{-3} : 1 ml fyziologického roztoku + 1 ml roztoku o koncentraci 10^{-2}

Po inkubaci bylo postupně pipetováno na povrch agaru po 10 μ l různé koncentrace fágové suspenze tak, aby se jednotlivé kapky nespojily a zároveň se nerozlily ke stěnám misky. Misky byly následně vloženy do inkubátoru (ne dnem vzhůru, jinak by se kapky slily) a kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C.

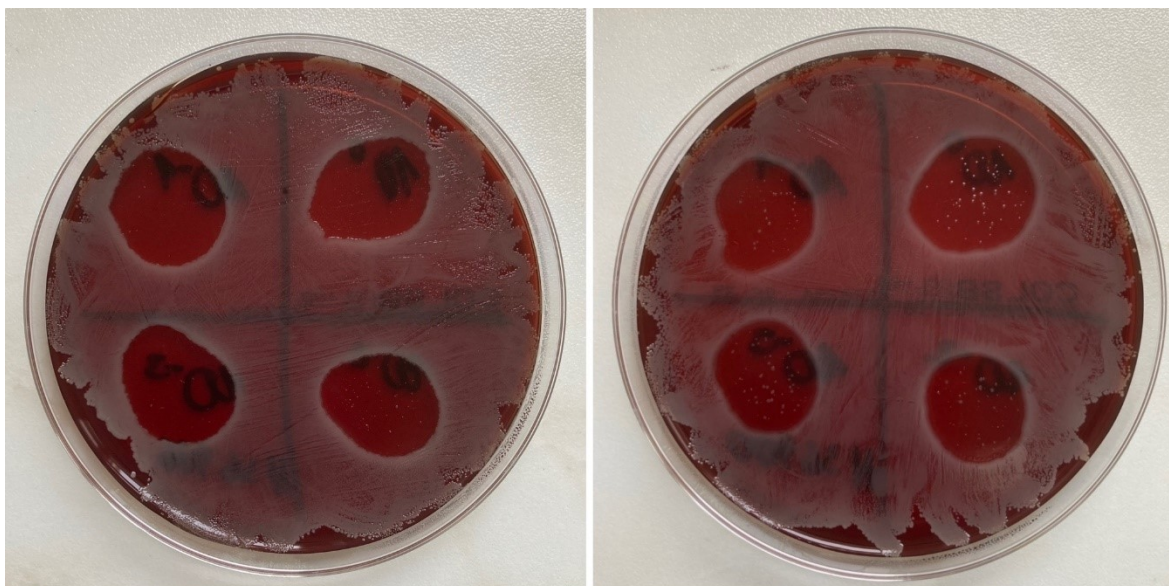
Obrázek 11: Nanesení bakteriofágového lyzátu na naočkovanou půdu



Zdroj: vlastní

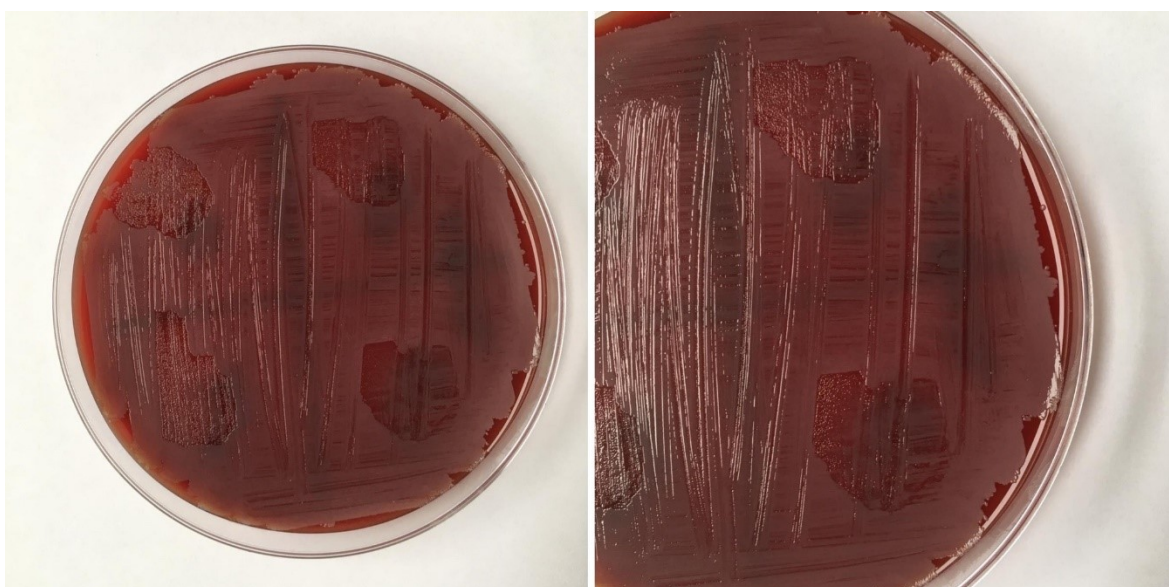
Po této kultivaci bylo možné odečíst výslednou citlivost daného stafylokokového kmene k fágovému lyzátu. Za citlivé kmene byly považovány ty, které v místě napipetovaného lyzátu vykazovaly konfluentní nebo semikonfluentní lyzi. Necitlivé kmene k fágovému lyzátu byly ty, u kterých lyze vůbec neproběhla.

Obrázek 12: Citlivé a intermediárně citlivé kmeny S. aureus k bakteriofágovému lyzátu



Zdroj: vlastní

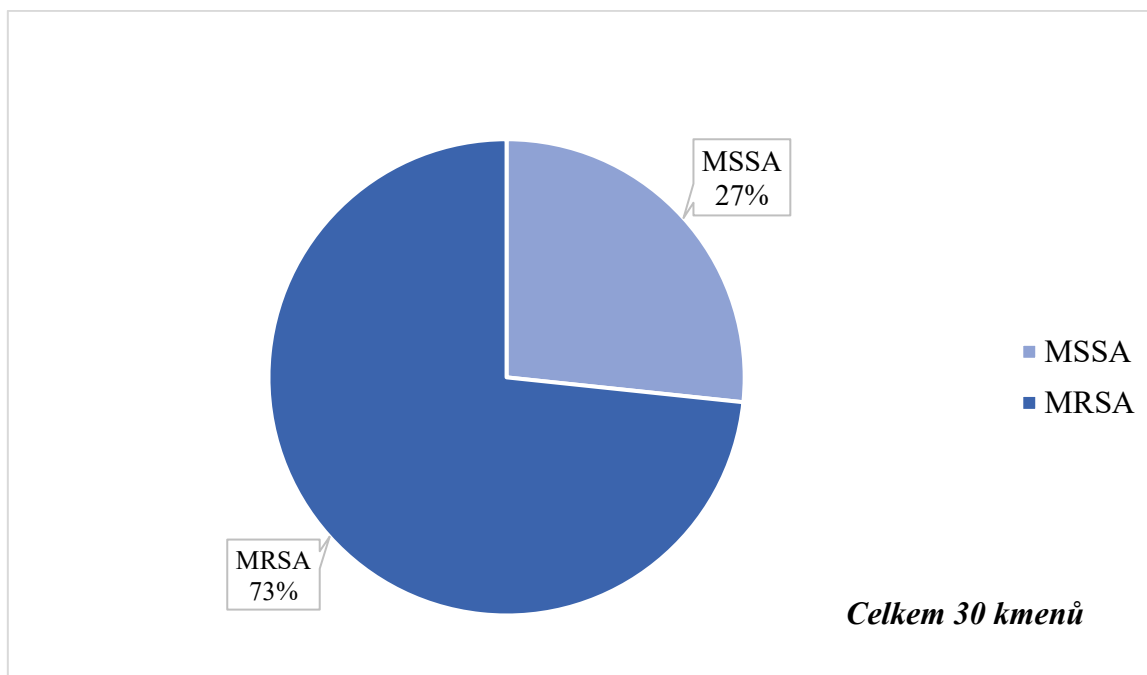
Obrázek 13: Rezistentní kmeny S. aureus k bakteriofágovému lyzátu



Zdroj: vlastní

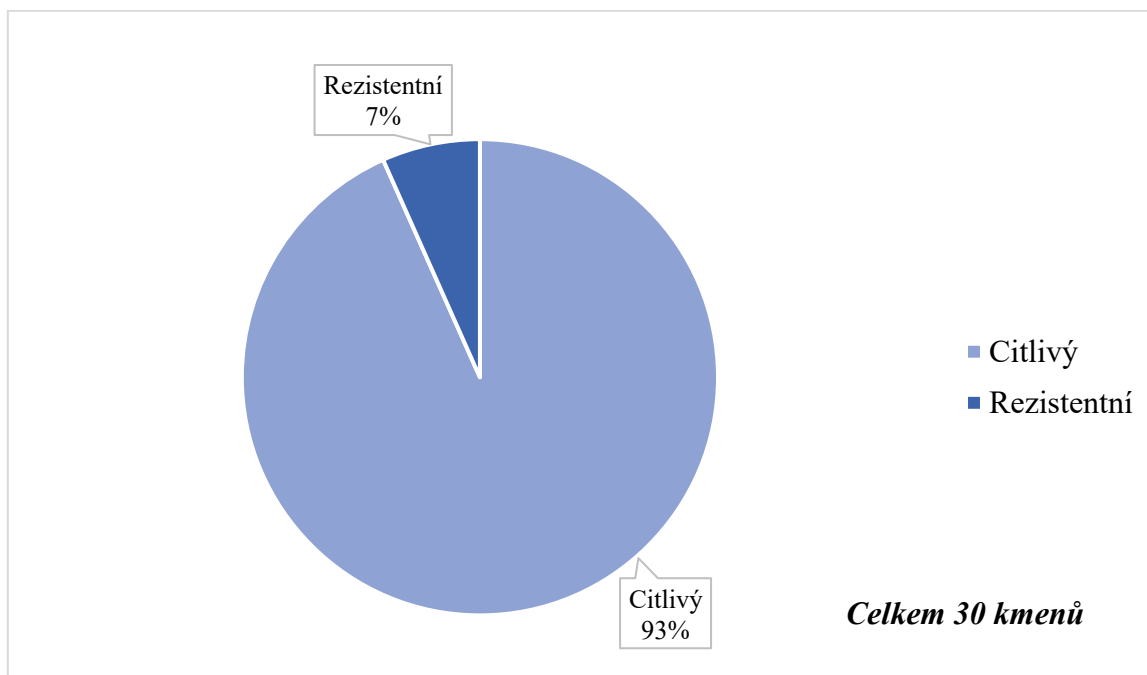
7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Graf 1: Typologie testovaných kmenů *Staphylococcus aureus*



Zdroj: vlastní

Graf 2: Citlivost kmenů *Staphylococcus aureus* k bakteriofágovému lyzátu



Zdroj: vlastní

Tabulka 5: Citlivost kmenů *Staphylococcus aureus* k bakteriofágovému lyzátu

<i>Staphylococcus aureus</i>	Citlivý	Rezistentní
MSSA	6	2
MRSA	22	0

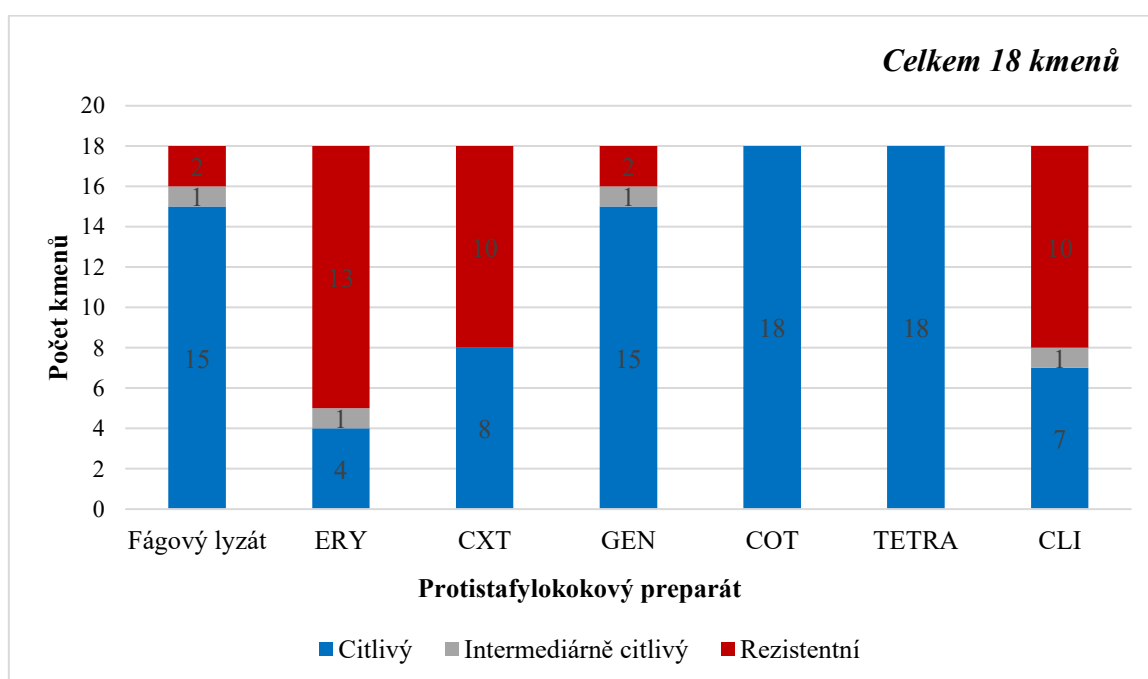
Zdroj: vlastní

Tabulka 6: Typologie vyšetřovaného klinického materiálu

Klinický materiál	MSSA	MRSA	Celkem
Bronchoalveolární laváž	0	2	2
Krev	0	4	4
Moč	0	2	2
Stěr z centrálního žilního katetru	0	1	1
Stěr z rány	8	2	10
Sputum	0	2	2
Tracheální aspirát	0	1	1
Výtěr z krku	0	1	1
Výtěr z nosu	0	5	5
Výtěr z pochvy	0	1	1
Výtěr z uretry	0	1	1
Celkem	8	22	30

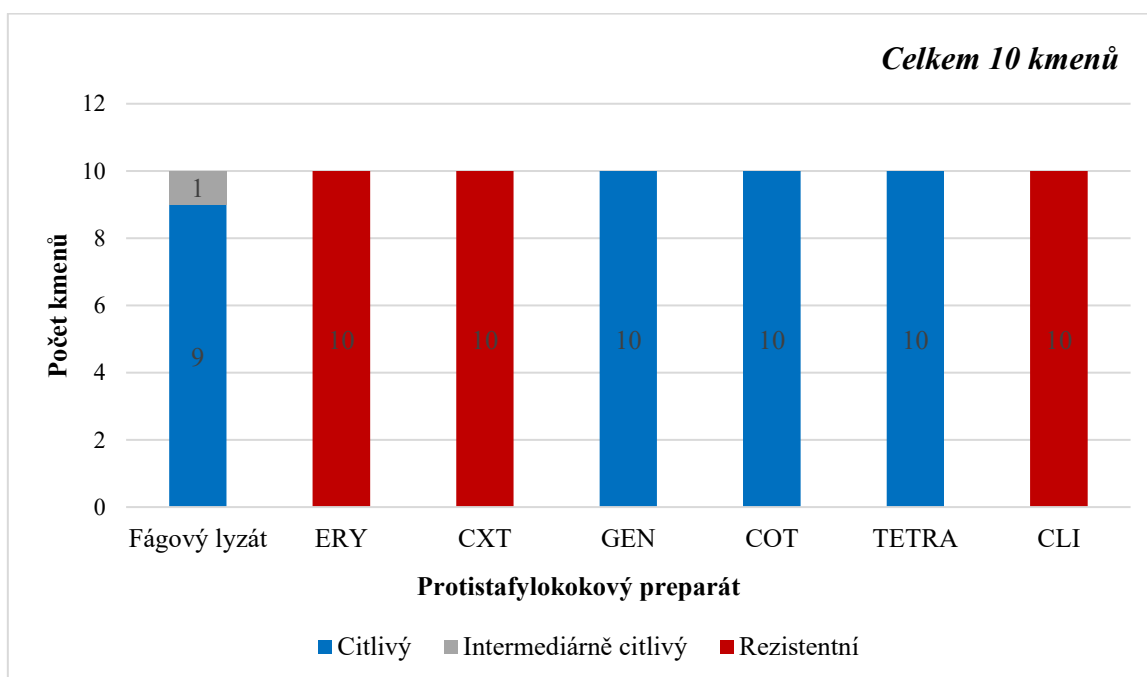
Zdroj: vlastní

Graf 3: Citlivost kmenů *S. aureus* k fágovému lyzátu a základní antibiotické sestavě



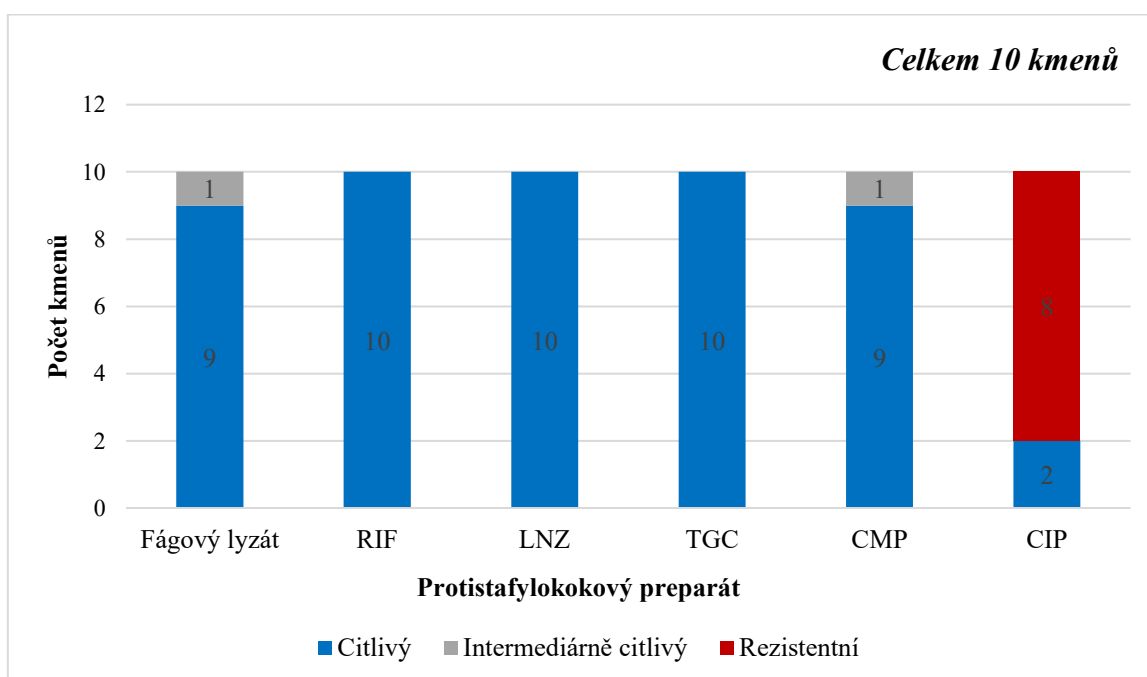
Zdroj: vlastní

Graf 4: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a základní antibiotické sestavě



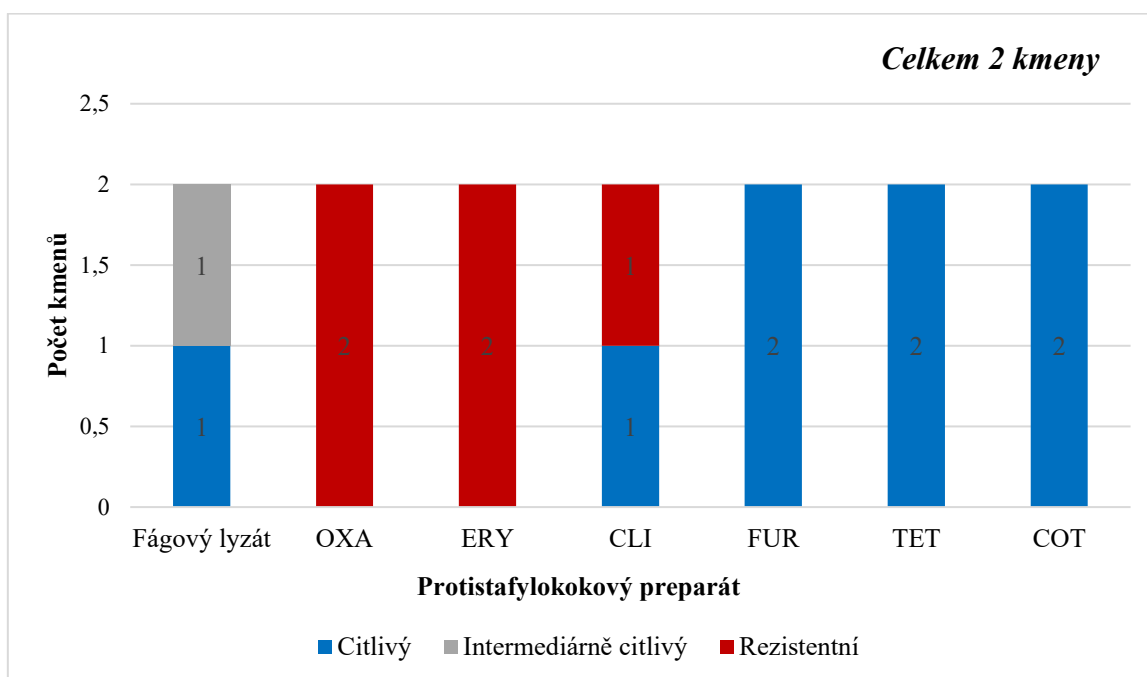
Zdroj: vlastní

Graf 5: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a rozšířené antibiotické sestavě



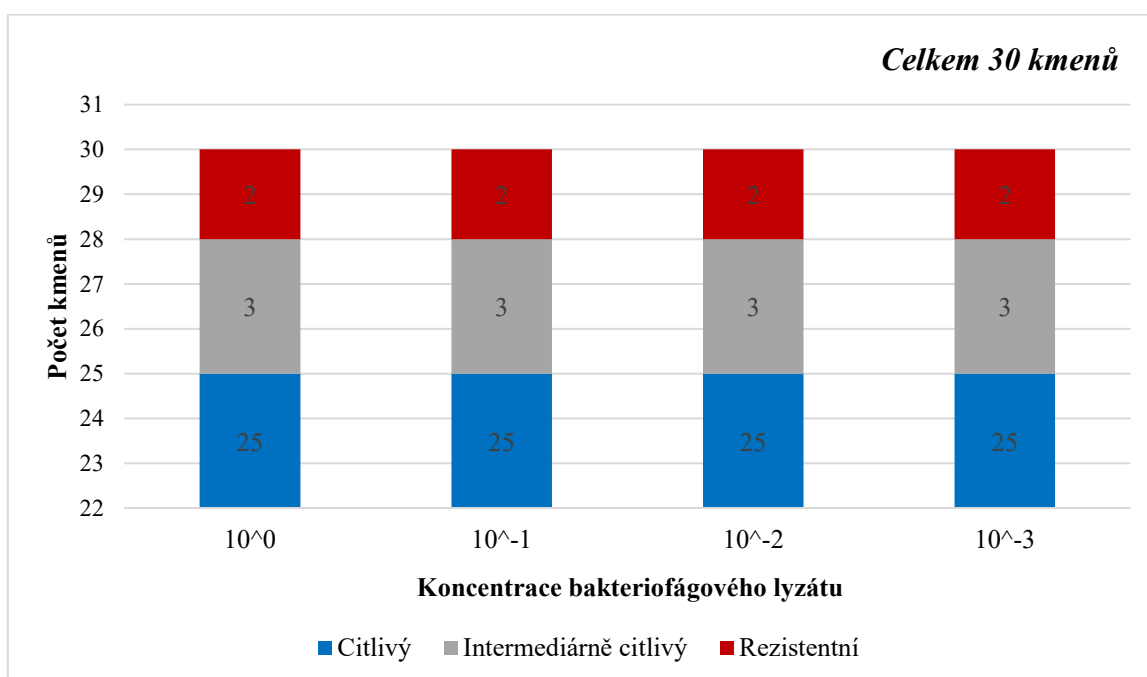
Zdroj: vlastní

Graf 6: Citlivost MRSA kmenů k fágovému lyzátu a močové antibiotické sestavě



Zdroj: vlastní

Graf 7: Citlivost kmenů *S. aureus* v závislosti na koncentraci bakteriofágového lyzátu



Zdroj: vlastní

DISKUZE

Vzhledem k narůstající bakteriální rezistenci vůči antimikrobiálním látkám se alternativní léčby, jako je bakteriofágová terapie, opět dostávají na výsluní. Česká farmaceutická společnost Bohemia Pharmaceuticals ve spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně začala vyrábět bakteriofágový preparát pod názvem Stafal®. Tento preparát je určen na širokou škálu kmenů *Staphylococcus aureus*, včetně MRSA. Bohužel pro náš výzkum nemohl být použit z důvodu přerušené výroby v návaznosti na COVID-19 pandemii. Za účelem hledání nových alternativ v léčbě rezistentních partikulí bylo cílem tohoto výzkumu ověřit citlivost kmenů *S. aureus* k fágovému lyzátu s ohledem na budoucí použití fágů v terapii.

V této bakalářské práci byl k výzkumu použit soubor 30 vzorků kmenů *S. aureus* pocházejících od pacientů z ambulantních i lůžkových zařízení FN Plzeň. Tento soubor obsahoval 8 (27 %) citlivých kmenů *S. aureus* (MSSA) a 22 (73 %) methicilin-rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA) (Graf 1). Rozdílné poměry v zastoupení MRSA kmenů v klinických vzorcích uvádějí studentky Janečková (2013) (10 %) a Hochmanová (2018) (7,4 %), jejichž pilotní studie byly provedeny v úzké spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně. Tento rozdílný poměr v zastoupení je zcela zřejmý. Pro naši studii byl použit mnohem menší počet vzorků, vzorky nebyly sbírány kontinuálně a důraz byl kladen především na sběr MRSA kmenů, protože představují mnohem větší globální problém. Jak ve své studii uvádí Belbase et al. (2017), hlavním zdrojem MRSA u hospitalizovaných pacientů je kolonizovaný zdravotnický personál, což způsobuje vyšší míru infekcí mezi nimi. Náš výzkumný soubor obsahoval pouze 1 (1 %) kmen komunitně přenášených MRSA (CA-MRSA), zdrojem těchto komunitně šířících se infekcí mohou být právě kolonizovaní zdravotničtí pracovníci, kteří přenášejí MRSA do své domácnosti, a tím je šíří do komunity. „*Přijetí pacienti, kteří byli během pobytu v nemocnici kolonizováni, mohou také působit jako alternativní zdroje pro komunitní infekce MRSA.*“ (Belbase et al. 2017)

Staphylococcus aureus je jedním z nejčastěji nalézaných bakteriálních patogenů, které osidlují lidský organismus. Z tohoto důvodu je můžeme izolovat z nejrůznějších míst či tekutin (Tab. 6). Mezi nejčastější klinický materiál, odkud byl *S. aureus* izolován, patřil stěr z rány (33 %). Tímto jsme ověřili, že k propuknutí onemocnění zpravidla dochází při porušení kožní bariéry a zároveň při vystavení organismu velké dávce virulentního kmene. Náchylnější k infekci tedy bývají pacienti po operačním výkonu nebo úrazech. Kmeny

MRSA byly nejčastěji izolovány z výtěru z nosu (23 %). To odpovídá výsledkům statistik, kdy je většina nozokomiálních infekcí vyvolaných *S. aureus* způsobena právě MRSA kmeny. (Rachman et al. 2017)

Tato studie prokázala, že mikrobiální rezistence na běžná antibiotika stále roste, s výjimkou trimetoprimu/sulfamethoxazolu a tetracyklinu, ke kterým byly v naší studii všechny kmeny *S. aureus* citlivé (Graf 3). V důsledku hojného využívání erytromycinu k léčbě zejména primárních stafylokokových onemocnění, je jeho role v terapii stále omezenější kvůli zvyšující se rezistenci. (Ansari et al. 2014) V našem souboru vzorků bylo celkem 72 % kmenů *S. aureus* rezistentních na erytromycin, ve srovnání s předchozími obdobnými studii v Brně, které vykazují rezistenci 24 % (Janečková 2013) a 16 % (Hochmanová 2018). Tento rozdíl je dán tím, že náš soubor obsahoval mnohem větší zastoupení MRSA kmenů, které jsou vůči erytromycinu odolné.

V této bakalářské práci jsme zkoumali účinnost bakteriofágového lyzátu na kmeny *S. aureus*. Celkem bylo z 30 vyšetřovaných kmenů 28 (93 %) kmenů citlivých a 2 (7 %) kmeny *S. aureus* rezistentních k bakteriofágovému lyzátu (Tab. 5). Tyto dva kmeny patří mezi MSSA, jsou stejného původu, tj. byly izolovány ze stěru z rány a vykazují odolnost vůči působení erytromycinu. Bakteriofágový lyzát působil proti všem MRSA kmenům, tzn. byl 100 % účinný (Graf 4, 5, 6). Janečková (2013) se domnívá, že tato vysoká citlivost by mohla být dána vysokou epidemiologickou příbuzností kmenů MRSA. Tento závěr je však nutné potvrdit pomocí molekulárně-biologických metod. Velmi podobného výsledku se dopracovali i Dvořáčková et al. (2020), kteří publikovali ke konci roku 2020 studii, jejímž cílem bylo otestovat náchylnost vybraných kmenů *S. aureus* k antimikrobiálním látkám a preparátu Stafal®. Zkoumaný soubor zahrnoval i podíl kmenů rezistentních na methicilin (MRSA), zjištěných v laboratořích Mikrobiologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno v letech 2011-2018. Dvořáčková et al. (2020) uvedli, že 99 % kmenů MRSA bylo citlivých na bakteriofágový preparát Stafal®.

Bakteriofágový lyzát jsme testovali ve 4 koncentracích: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} . Na grafu 7 můžeme vidět citlivost kmenů *S. aureus* v závislosti na koncentraci lyzátu. Bohužel koncentrace fága nezávisela na citlivosti *S. aureus*. Proto jsme provedli kontrolní test, abychom se ujistili, zda lyzát například svojí hustotou neodplaví zlatého stafylokoka. Pokus spočíval v tom, že jsme na naočkovanou půdu, rozdělenou opět do čtyř kvadrantů, postupně napipetovali fyziologický roztok a fyziologický roztok s bakteriofágovým lyzátem

v poměrech 100:1, 50:1 a 25:1. Výsledky tohoto testu naše obavy vyvrátily (viz Příloha A, Obr. 14). Dalším úkolem bylo zjistit minimální koncentraci lyzátu, která ještě bude inhibičně působit proti stafylokokům. Postupným ředěním lyzátu desítkovou řadou jsme se dostali až na hodnotu 10^{-11} , nižší koncentrace lyzátu již nepůsobily. Takto nízká koncentrace lyzátu mohla způsobit horší přilnutí fágů k bakteriálním stěnám, čímž nemohlo dojít ke zničení bakterií. Ačkoli byl náš bakteriofágový lyzát určen primárně pro inhibici *S. aureus*, vyzkoušeli jsme ho použít i na jiné bakterie (viz Příloha A, Obr. 15, 16 a 17). Jak jsme předpokládali, fágový lyzát nepůsobil na tyto bakterie. Je však zajímavé, že tyto bakterie vykazovaly souvislý růst na krevním agaru, zatímco u rezistentních kmenů *S. aureus* byla vidět ohraničená místa přesně tam, kde byl lyzát napipetován (Obr. 13).

ZÁVĚR

V posledních několika desetiletích stoupá vlivem nadměrného předepisování a užívání antibiotik bakteriální rezistence, která vyžaduje okamžitá řešení. Dnes je prozatím většina infekcí relativně dobře léčitelná. Za pár let se však může stát, že lidé budou umírat i na dříve terapeuticky nenáročná primární onemocnění. Vývoj nových antibiotik je v nedohlednu, protože farmaceutické firmy nechtějí vyrábět nová antibiotika z důvodu nízkých zisků. Vhodnou strategií k vyřešení tohoto celosvětového problému by mohlo být využití alternativních terapií, například bakteriofágové léčby.

Bakteriofágová léčba má poměrně dlouhou historii. Zažila jak vrchol raného nadšení po jejich objevení, tak i úpadek kvůli zavedení antibiotik. Dnes se jí však dostává zasloužené pozornosti. Zatímco většina západoevropských zemí nemá v alternativní léčbu příliš velkou důvěru, v Polsku, Rusku a Gruzii je bakteriofágová léčba součástí běžné terapie bakteriálních infekcí. Proto je potřeba se zaměřit na průkaz bezpečnosti a účinnosti této léčby, kdy je důležité provádět více moderních randomizovaných klinických studií.

Pro výzkumné účely této práce byly použity kmeny *Staphylococcus aureus*, které sloužily jako hostitelské buňky pro bakteriofágy. Ačkoli Alexander Fleming objevil účinek penicilinu právě na samotném zlatém stafylokoku, dnes se tyto kmeny řadí k jedné z nejobávanějších globálních hrozeb z důvodu zvyšujících se antimikrobiálních mechanismů, kvůli nimž jsou stafylokoky odolné vůči působení většiny klasických antibiotik.

V rámci této výzkumné práce bylo celkem otestováno 30 kmenů *S. aureus* k bakteriofágovému lyzátu. Poměrnou většinu kmenů *S. aureus* tvořily MRSA kmeny. Zjistili jsme, že účinnost bakteriofágového lyzátu je velmi dobrá, 93 % kmenů *S. aureus* bylo citlivých a 7 % kmenů rezistentních. Mezi tyto rezistentní kmeny nepatřily kmeny MRSA, jejich citlivost byla 100 %. Nejnižší koncentrace lyzátu, která ještě účinně působila vůči stafylokokům, byla změřena do hodnoty 10^{-11} . Při porovnání bakteriofágového lyzátu s účinností antibiotik lze říci, že jsou stafylokoky v laboratorních podmínkách mnohem citlivější k fágovému lyzátu než k běžně používaným antimikrobiálním látkám. Na základě výsledků zjištěných testováním bakteriofágového lyzátu se domníváme, že je tato alternativní léčba vhodným kandidátem pro léčbu stafylokokových infekcí, u nichž klasická antibiotická léčba již selhala. K ověření účinnosti této terapie v *in vivo* podmínkách bude ale pravděpodobně potřeba ještě celé řady testů.

SEZNAM LITERATURY

ANON., 2014. Příbalový leták Stafal. *ipil.sk* [online] [vid. 2021-02-07]. Dostupné z: <https://ipil.sk/stafal>

ANON., 2021. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. *European Centre for Disease Prevention and Control* [online] [vid. 2021-02-07]. Dostupné z: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>

ANON., nedatováno. *Bohemiapharm-en-sk* [online] [vid. 2021-02-07]. Dostupné z: <https://www.bohemiapharm.eu/en/>

ANSARI, Shamshul, Hari Prasad NEPAL, Rajendra GAUTAM, Nabin RAYAMAJHI, Sony SHRESTHA, Goma UPADHYAY, Anju ACHARYA a Moti Lal CHAPAGAIN, 2014. Threat of drug resistant *Staphylococcus aureus* to health in Nepal. *BMC Infectious Diseases* [online]. **14**, 157 [vid. 2021-03-08]. ISSN 1471-2334. Dostupné z: [doi:10.1186/1471-2334-14-157](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-157)

BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. B.m.: Marvil.

BELBASE, Ankit, Narayan Dutt PANT, Krishus NEPAL, Bibhusan NEUPANE, Rikesh BAIDHYA, Reena BAIDYA a Binod LEKHAK, 2017. Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. **16** [vid. 2021-03-06]. ISSN 1476-0711. Dostupné z: [doi:10.1186/s12941-017-0194-0](https://doi.org/10.1186/s12941-017-0194-0)

CONG, Yanguang, Sijin YANG a Xiancai RAO, 2020. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research* [online]. **21**, 169–176 [vid. 2021-02-07]. ISSN 2090-1232. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jare.2019.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005)

CORNELISSEN, Cynthia Nau a Marcia Metzgar HOBBS, 2019. *Lippincott® Illustrated Reviews: Microbiology, Fourth Edition*. 4th ed. B.m.: Wolters Kluwer Health. ISBN 978-1-975118-31-0.

DVOŘÁČKOVÁ, M., F. RŮŽIČKA, M. DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ, L. VACEK, D. BEZDĚKOVÁ, M. BENEŠÍK, P. PETRÁŠ a R. PANTŮČEK, 2020. Therapeutic potential of bacteriophages for staphylococcal infections and selected methods for in vitro susceptibility testing of staphylococci. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J.E. Purkyne* [online]. **69**(1), 10–18. ISSN 1210-7913. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326711/>

EYER, Luděk, 2008. Bakteriofágy a fágové lytické enzymy: naděje v léčbě bakteriálních infekcí. *Universitas - revue Masarykovy univerzity* [online]. **0**(4) [vid. 2021-02-07]. ISSN 1212-8139. Dostupné z: <https://journals.muni.cz/universitas/article/view/524>

EYER, Luděk, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jiří DOŠKAŘ, 2007. Nové perspektivy fágové terapie [online]. **13**(6), 231–235 [vid. 2021-02-07]. ISSN 1211-264X. Dostupné z: <https://www.muni.cz/vyzkum/publikace/747097>

GANESHAN, Sharita a Zeinab HOSSEINIDOUST, 2019. Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics* [online]. **8**(3), 131. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics8030131

GREENWOOD, David, Richard C. B. SLACK a John F. PEUTHERER, 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada. ISBN 80-7269-365-0.

HOCHMANOVÁ, Natálie, 2018. *Porovnání účinnosti antibiotické a alternativní fágové terapie u klinicky významných stafylokoků* [online]. Brno [vid. 2021-03-06]. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/hb46z/>

JANEČKOVÁ, Tereza, 2013. *Účinnost fágového přípravku Stafal na Staphylococcus aureus* [online]. Brno [vid. 2021-02-07]. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/c5cve/>

JULÁK, Jaroslav, 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1270-4.

KAKASIS, Athanasios a Gerasimia PANITSA, 2019. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **53**(1), 16–21 [vid. 2021-02-07]. ISSN 0924-8579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004

KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ, 2017. *Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, Cytologie a morfologie bakterií | Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online] [vid. 2021-02-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakteriofag.html

KŘÍŽOVÁ, Pavla a Petr PETRÁŠ, 2012. Syndrom toxického šoku, SZÚ. *Státní zdravotní ústav* [online] [vid. 2021-02-07]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/syndrom-toxickeho-soku>

KWIATEK, Magdalena, Sylwia PARASION a Aleksandra NAKONIECZNA, 2019. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **128**(4), 985–1002. ISSN 1365-2672. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14535

MELTER, Oto a Rute CASTELHANO, 2019. *The MicroBook*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3871-3.

MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER, 2012. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier. ISBN 978-0-323-08692-9.

NIKOLICH, Mikeljon a Andrey FILIPPOV, 2020. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics* [online]. **9**(3), 135. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9030135

RACHMAN, Abdul, Zarizal SUHAILI a Mohd Nasir MOHD DESA, 2017. The Evolution and Dissemination of Methicillin Resistance Determinant in *Staphylococcus aureus*. In: *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus* [online]. Rijeka: InTech. ISBN 978-953-51-2983-7. Dostupné z: doi:10.5772/65514

SHARP, Richard, 2001. Bacteriophages: Biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. **76**(7), 667–672. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.434

SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů 2., doplněné a přepracované vydání*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4771-2.

SULAKVELIDZE, A., Z. ALAVIDZE a J. G. MORRIS, 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **45**(3), 649–659. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie: speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA, Miroslav, 2010. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-8.

VÝMOLA, František, 1983. *Stafylokokové infekce*. Praha: Avicenum.

WITTEBOLE, Xavier, Sophie DE ROOCK a Steven M OPAL, 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* [online]. **5**(1), 226–235 [vid. 2021-02-07]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.25991

YE, Mao, Mingming SUN, Dan HUANG, Zhongyun ZHANG, Hui ZHANG, Shengtian ZHANG, Feng HU, Xin JIANG a Wentao JIAO, 2019. A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment International* [online]. **129**, 488–496 [vid. 2021-02-07]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.05.062

ZÁVODSKÁ, Radka, 2006. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Praha: Scientia. ISBN 80-86960-15-3.

ŽEMLIČKOVÁ, Helena, 2018. Tisková zpráva k Evropskému antibiotickému dni 2018, SZÚ. *Státní zdravotní ústav* [online] [vid. 2021-02-07]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/tiskova-zprava-k-evropskemu-antibiotickemu-dni-2018>

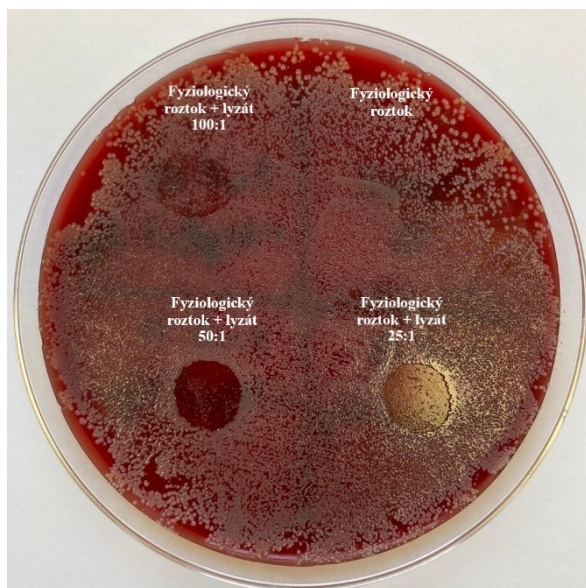
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Testování bakteriofágového lyzátu
- Příloha B – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

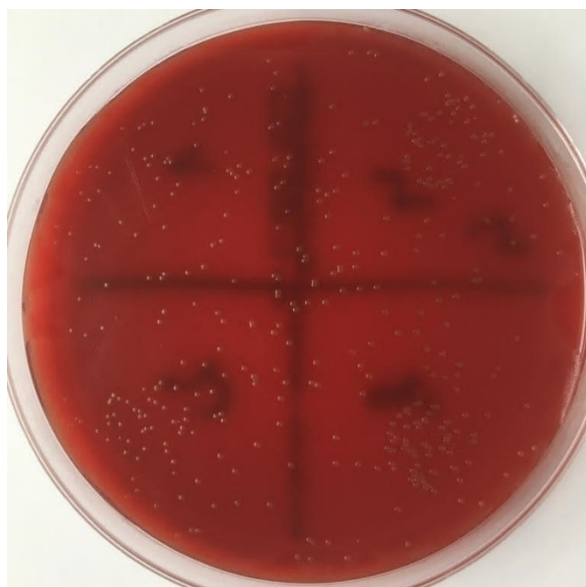
Příloha A – Testování bakteriofágového lyzátu

Obrázek 14: Testování koncentrací bakteriofágového lyzátu



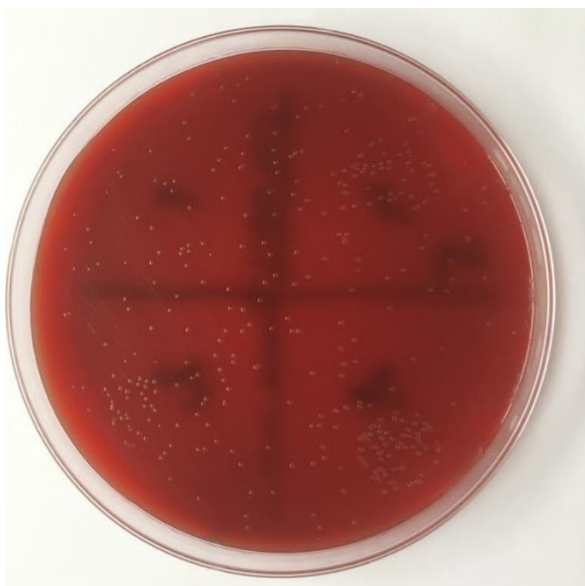
Zdroj: vlastní

Obrázek 15: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na *Streptococcus agalactiae*



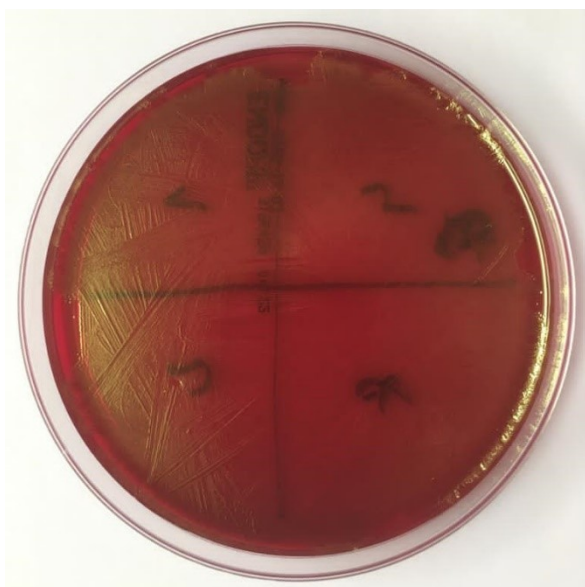
Zdroj: vlastní

Obrázek 16: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na *Enterococcus faecalis*



Zdroj: vlastní

Obrázek 17: Testování účinnosti bakteriofágového lyzátu na *Escherichia coli*



Zdroj: vlastní

Příloha B – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

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

Vážená paní

Leona Lošonská

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií - Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách / analýzách a výsledcích těchto metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Účinnost bakteriofágového lyzátu na kmeny Staphylococcus aureus*“.

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

27. 2. 2020