

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Rezistencia k makrolidovým antibiotikám u

Streptococcus pyogenes

Bc. Petra Kondulová

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Kondulová**
Osobní číslo: **C17445**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Rezistence k makrolidovým antibiotikům u *Streptococcus pyogenes***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Obecný popis rodu *Streptococcus*, zejména druhu *S. pyogenes*. Morfologie, faktory virulence, onemocnění, identifikace, léčba. Mechanismus rezistence k makrolidovým antibiotikům, coby alternativní terapii u lidí alergických na penicilin. Fenotypové a genotypové metody průkazu, epidemiologie rezistence. Výskyt (%) rezistence k makrolidům ve vybraném časovém období, podíl různých fenotypů.

Experimentální část:

Identifikace *S. pyogenes*, mikro- a makroskopická morfologie, fenotypové testy (bacitracin, pyr test, latex aglutinace). Vyšetření citlivosti k antibiotikům. Disková difúzní metoda, mikrodifúzní bujónová metoda. Fenotypový průkaz rezistence k makrolidovým antibiotikům (D-test). Retro a prospektivní hodnocení výskytu (%) rezistence k makrolidům ve vybraném časovém období, podíl různých fenotypů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

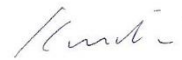
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vladimír Beran, PhD.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. MUDr. Helena Žemličková, PhD.**
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

PREHLÁSENIE

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci použila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o autorskom práve, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o užití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k užitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o užití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pre zverejňovanie záverečných prác a ich základná jednotná formálna úprava, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 8. 5. 2019

.....

Bc. Petra Kondulová

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som rada poďakovala školiteľovi diplomovej práce Mgr. Vladimírovi Beranovi, PhD. za usmerňovanie, odborné rady a konzultácie, ktoré mi vždy ochotne poskytoval počas jej vypracovávania. Ďalej by som rada poďakovala konzultantke práce doc. MUDr. Helene Žemličkovej, PhD., prednostke Ústavu klinickej mikrobiológie vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové za vytvorenie témy diplomovej práce, za možnosť realizácie praktickej časti mojej práce na jej ústave a tiež za metodickú pomoc a cenné rady. V neposlednom rade ďakujem MUDr. Kateřine Kuncovej za jej odborné vedenie, cenné rady, pripomienky a ochotu pri spracovaní diplomovej práce. Osobitě ďakujem patrí mojej rodine a priateľovi za podporu a toleranciu, ktorú mi po celú dobu poskytovali. Moje špeciálne poďakovanie patrí Pánu Bohu.

ANOTÁCIA

Táto diplomová práca je zameraná na izoláciu baktérie *Streptococcus pyogenes* od pacientov vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové vo vybranom časovom období, jej identifikáciu pomocou rôznych fenotypových testov a vyšetrenie citlivosti k antibiotikám. V teoretickej časti práce sú mimo iné riešené mechanizmy rezistencie na vybrané druhy antimikrobiálnych látok. Zaujímal nás súbor pacientov, od ktorých boli získané kmene *Streptococcus pyogenes*, podľa jednotlivých sledovaných rokov či mesiacov, pohlavia, vekových kategórií a druhu odobratého materiálu. Jedným z cieľov bolo vyhodnotenie výskytu rezistencie k makrolidovým antibiotikám fenotypovými metódami. Následne bol u kmeňov *Streptococcus pyogenes* určený fenotyp MLS_B rezistencie. Najvyšší výskyt infekcií spôsobených *Streptococcus pyogenes* bol zaznamenaný u malých detí a v zimných mesiacoch. V rámci celého sledovaného súboru izolátov bola zistená 9,35% rezistencia na erytromycín a 8,14% rezistencia na klindamycín. Z fenotypov rezistencie bol najčastejšie zastúpený fenotyp M s prevalenciou 64,58%, druhým najčastejším bol indukibilný fenotyp rezistencie (22,22%) a najmenej zastúpený bol konštitutívny fenotyp (13,19%).

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Streptococcus pyogenes, výskyt infekcie, identifikácia, fenotyp rezistencie, erytromycín, klindamycín

TITLE

The Resistance to Macrolide Antibiotics in *Streptococcus pyogenes*

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on isolation of *Streptococcus pyogenes* from patients at the University Hospital in Hradec Kralove in the selected time period, its identification using various phenotypic tests and susceptibility testing to antibiotics. The theoretical part of this thesis deals also with mechanisms of resistance to selected types of antimicrobial agents. We were interested in a set of patients from whom *Streptococcus pyogenes* strains were obtained, by reference to years, months, sex, age categories and the type of material taken. One of the objectives was to evaluate the incidence of resistance to macrolide antibiotics by phenotypic methods. Subsequently, the MLS_B resistance phenotype in *Streptococcus pyogenes* was

determined. The highest incidence of infections caused by *Streptococcus pyogenes* was seen in young children in the winter months. Resistance to erythromycin was found to be 9,35% and clindamycin resistance was 8,14% within the entire set of isolates investigated. Of the resistance phenotypes, the most common was M phenotype with a prevalence of 64,58%, the second most frequent was the inducible resistance phenotype (22,22%) and the constitutive phenotype was the least frequent (13,19%).

KEYWORDS

Streptococcus pyogenes, infection rate, identification, phenotyp of resistance, erythromycin, clindamycin

OBSAH

ÚVOD	16
1 TEORETICKÁ ČASŤ	18
1.1 História <i>Streptococcus pyogenes</i>	18
1.2 Charakteristika <i>Streptococcus pyogenes</i>	19
1.3 Antigénna štruktúra a faktory virulencie.....	20
1.4 Charakteristika infekcií zapríčinených baktériou <i>Streptococcus pyogenes</i>	21
1.4.1 Faryngitída a folikulárna tonzilitída.....	22
1.4.2 Impetigo.....	23
1.4.3 Erysipelas – ruža.....	23
1.4.4 Streptokoková celulitída.....	24
1.4.5 Lymfangitída	24
1.4.6 Nekrotizujúca fascitída.....	24
1.4.7 Myozitída.....	25
1.4.8 Puerperálna sepsa.....	25
1.4.9 Šarlach.....	25
1.4.10 Streptokokový syndróm toxického šoku	26
1.4.11 Sterilné post-streptokokové následky	26
1.5 Mechanizmy účinku antibiotík	27
1.6 Genotypová determinácia a fenotypový prejav mechanizmov rezistencie	29
1.6.1 Rezistencia a jej formy	29
1.6.2 Horizontálny a vertikálny prenos génov	30
1.7 Mechanizmy rezistencie.....	31
1.7.1 Modifikácia cieľového miesta	31
1.7.2 Efluxový mechanizmus	32
1.7.3 Metabolický bypass.....	32
2 LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA <i>Streptococcus pyogenes</i>	33

2.1	Mikroskopická a makroskopická morfológia <i>Streptococcus pyogenes</i>	33
2.2	Kultivácia	34
2.3	Biochemické testy.....	34
2.3.1	Bacitracínový test.....	34
2.3.2	PYR test.....	35
2.4	Priamy dôkaz antigénu imunologickými metódami	35
2.4.1	Latexová aglutinácia	35
2.4.2	Rýchly imunochromatografický test.....	35
2.5	MALDI-TOF MS.....	35
2.6	Metódy amplifikácie nukleovej kyseliny	36
2.6.1	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	36
2.6.2	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR)	37
2.7	Sérologické metódy	37
2.7.1	Neutralizačný test.....	37
2.8	Vyšetrenie citlivosti na antibiotiká	37
2.8.1	Disková difúzna metóda.....	38
2.8.2	Bujónový mikrodilučný test	38
2.8.3	Agarový dilučný test	39
2.8.4	E-test	39
3	CIELE	40
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	41
4.1	Klinický materiál	41
4.2	Kultivácia	41
4.3	Bacitracínový test	42
4.4	PYR test	43
4.5	Latexová aglutinácia	45
4.6	Identifikácia <i>Streptococcus pyogenes</i> analyzátorom MALDI Biotyper	48

4.7	Disková difúzna metóda.....	52
4.8	Fenotypový dôkaz rezistencie k makrolidovým antibiotikám	55
5	VÝSLEDKY.....	59
5.1	Výskyt kmeňov <i>Streptococcus pyogenes</i> v priebehu rokov 2013 – 2017 vo FN HK.....	59
5.2	Výskyt kmeňov <i>Streptococcus pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 podľa jednotlivých mesiacov.....	60
5.3	Výskyt kmeňov <i>Streptococcus pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 vo FN HK podľa vekových kategórií	61
5.4	Výskyt kmeňov <i>Streptococcus pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 v závislosti od pohlavia	63
5.5	Výskyt kmeňov <i>Streptococcus pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v priebehu rokov 2013 - 2017 v závislosti od miesta odberu.....	63
5.6	Vyhodnotenie citlivosti baktérie <i>Streptococcus pyogenes</i> na erytromycín na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017	64
5.7	Vyhodnotenie citlivosti baktérie <i>Streptococcus pyogenes</i> na klindamycín na ÚKM FN HK v rokoch 2013-2017	67
5.8	Fenotypový typ rezistencie v priebehu rokov 2013-2017 na ÚKM FN HK.....	70
6	DISKUSIA	72
7	ZÁVER	77
8	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	79

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: <i>S. pyogenes</i> na agarových platniach s prímiesou ovčej krvi po 24 hod. inkubácii za aeróbných podmienok (Spellerberg and Brandt 2016)	34
Obrázok 2: Aplikácia diskov – bacitracínový test	42
Obrázok 3: Pozitívny bacitracínový test pre identifikáciu baktérie <i>S. pyogenes</i>	43
Obrázok 4: ITEST PYR TEST – vľavo pozitívny výsledok, vpravo negatívny výsledok	44
Obrázok 5: Latexová súprava Prolex™ Streptococcal Grouping	47
Obrázok 6: Testovacia kartička latexovej aglutinácie	47
Obrázok 7: Analyzátor Bruker Daltonik MALDI Biotyper	48
Obrázok 8: Príprava MALDI doštičky	49
Obrázok 9: Výsledný signál na obrazovke.....	51
Obrázok 10: Príprava inokula.....	53
Obrázok 11: Inokulácia rozterom	53
Obrázok 12: Aplikácia diskov pomocou dispenserov	54
Obrázok 13: Hodnotenie veľkosti inhibičných zón	54

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Hodnotenie testu ITEST BACITRACIN S.....	43
Tabuľka 2: Význam hodnôt skóre.....	50
Tabuľka 3: Význam konzistenčných kategórií (A-C)	50
Tabuľka 4: Výsledky identifikácie pomocou analyzátoru Bruker Daltonik MALDI Biotyper	51
Tabuľka 5: Podmienky na detekciu MLS _B fenotypu pomocou difúznej diskovej metódy	55
Tabuľka 6: Hraničné priemery inhibičných zón (IZ) pre citlivé a rezistentné kmene <i>S. pyogenes</i>	56
Tabuľka 7: Fenotypy rezistencie <i>S. pyogenes</i> na antibiotiká zo skupiny MLS _B na základe výsledkov diskovej difúznej metódy.....	57
Tabuľka 8: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 za jednotlivé mesiace	60
Tabuľka 9: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 podľa vekových kategórií.....	62
Tabuľka 10: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017	63
Tabuľka 11: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 v závislosti od miesta odberu.....	64
Tabuľka 12: Citlivosť baktérie <i>S. pyogenes</i> na erytromycín	65
Tabuľka 13: Citlivosť baktérie <i>S. pyogenes</i> na klindamycín	68

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v jednotlivých rokoch 2013 - 2017	59
Graf 2: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> v rokoch 2013 – 2017 rozdelené v jednotlivých rokoch v percentách	59
Graf 3: Počet pacientov v rokoch 2013 - 2017 s identifikovaným kmeňom <i>S. pyogenes</i>	60
Graf 4: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 za jednotlivé mesiace	61
Graf 5: Výskyt kmeňov <i>S. pyogenes</i> izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 v závislosti na veku	62
Graf 6: Počet mužov a žien v rokoch 2013-2017.....	63
Graf 7: Citlivosť baktérie <i>S. pyogenes</i> na erytromycín	65
Graf 8: Percentuálne zastúpenie citlivosti baktérie <i>S. pyogenes</i> na erytromycín	66
Graf 9: Percentuálne zastúpenie kmeňov <i>S. pyogenes</i> citlivých na erytromycín v rokoch 2013 – 2017.....	66
Graf 10: Percentuálne zastúpenie kmeňov <i>S. pyogenes</i> rezistentných na erytromycín v rokoch 2013 - 2017	67
Graf 11: Vývoj trendu citlivosti a rezistencie na erytromycín v rokoch 2013 – 2017.....	67
Graf 12: Citlivosť baktérie <i>S. pyogenes</i> na klindamycín.....	68
Graf 13: Percentuálne zastúpenie citlivosti baktérie <i>S. pyogenes</i> na klindamycín	68
Graf 14: Percentuálne zastúpenie kmeňov <i>S. pyogenes</i> citlivých na klindamycín	69
Graf 15: Percentuálne zastúpenie kmeňov <i>S. pyogenes</i> rezistentných na klindamycín v rokoch 2013 - 2017	69
Graf 16: Vývoj trendu citlivosti a rezistencie na klindamycín v rokoch 2013 - 2017	70
Graf 17: Percentuálne zastúpenie fenotypov rezistencie u izolovaných kmeňov <i>S. pyogenes</i> na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017	70
Graf 18: Percentuálne vyjadrenie fenotypovej rezistencie v jednotlivých rokoch 2013 – 2017	71
Graf 19: Vývoj trendu fenotypovej rezistencie u kmeňov <i>S. pyogenes</i>	71

ZOZNAM SKRATIEK

μg	mikrogram
μl	mikroliter
μm	mikrometer
ARDS	syndróm akútnej respiračnej tiesne
ASLO	antistreptolyzín O
ATB	antibiotiká
ATP	adenozíntrifosfát
bp	bázový pár
CFU	počet jednotiek tvoriacich kolónie (colony forming unit)
CLI	klindamycín
cMLS _B	konštitutívny typ MLS _B rezistencie
CNS	centrálne nervová sústava
CO ₂	carbon dioxide (oxid uhličitý)
CRP	C – reaktívny proteín
CT	počítačová tomografia
DDM	difúzna disková metóda
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EMM	gén kódujúci M-proteín
<i>erm</i>	erytromycínová ribozomálna metyláza
ERY	erytromycín
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Európska komisia pre testovanie citlivosti na antibiotiká)
ESR	leukocytárna rýchlosť sedimentácie erytrocytov
GAS	streptokoky skupiny A (Group A Streptococcus)
HCCA	alfa-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (alfa-cyano-4-hydroxy cinnaminová kyselina)
iMLS _B	inducibilný typ MLS _B rezistencie
IgA	imunoglobulín A
IgG	imunoglobulín G
IZ	inhibičná zóna
KA	krvný agar
kb	kilobáza

MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionitation time of flights mass spectrometry
MBC	minimálna baktericídna koncentrácia
<i>mef</i>	gén kódujúci efluxnú pumpu pre makrolidy
mg	miligram
MH	Mueller Hinton
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
ml	mililiter
MLS _B	rezistencia voči makrolidom, linkozamidom a streptogramínom B
mm	milimeter
MR	magnetická rezonancia
NaCl	chlorid sodný
PANDAS	pediatrické autoimunitné neuropsychiatrické poruchy so streptokokovými infekciami
PBP	penicillin binding proteins
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
pH	potential of hydrogen
PNC	penicilín
PYR	pyrrolidonyl arylamidáza
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomálna ribonukleová kyselina)
SPI	spiramycín
SPICE	Susceptibility Pattern of the Isolates in Central, Eastern and Baltic European Countries
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SSTS	streptokokový syndróm toxického šoku
<i>tet</i>	gén kódujúci efluxovú pumpu pre tetracyklíny
TFA	trichlóroctová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tzv.	takzvaný
ÚKM FN HK	Ústav klinickej mikrobiológie Fakultnej nemocnice Hradec Králové

ÚVOD

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) alebo streptokoky skupiny A (GAS) sú hlavnými ľudskými patogénmi, ktoré spôsobujú široké spektrum ochorení. *S. pyogenes* je grampozitívny β -hemolytický kok, ktorý nevytvára spóry a má tendenciu rásť v retiazkach. Produkuje veľké množstvo extracelulárnych enzýmov a toxínov. Infekcie spôsobené touto baktériou zvyčajne začínajú v hrdle alebo na koži. Spektrum infekcií sa pohybuje od miernej faryngitídy a lokalizovaných kožných infekcií (impetigo) až po stredne ťažké až ťažké prejavy foriem šarlatovej horúčky, pneumónie, bakteriémie, eryzipel, celulitídy a život ohrozujúce stavy, ako je nekrotizujúca fascitída a syndróm toxického šoku. Imunitne sprostredkované klinické stavy spojené s infekciou GAS zahŕňajú reumatickú horúčku, post-streptokokovú glomerulonefritídu, artritídu a pediatrické autoimunitné neuropsychiatrické poruchy spojené so streptokokovými infekciami (PANDAS). Prejavy akútnej infekcie *S. pyogenes* postihujú prevažne školákov, no v posledných rokoch došlo k prudkému nárastu ochorení na celom svete.

Celosvetovo trpí vážnou chorobou GAS viac ako 18 miliónov ľudí. Táto záťaž je hlavnou príčinou chorôb a úmrtia detí a mladých dospelých, vrátane tehotných žien, v krajinách chudobných na zdroje.

V liečbe streptokokových infekčných ochorení sa najčastejšie využíva penicilín, na ktorý sú kmene *S. pyogenes* dlhodobo veľmi dobre citlivé. Problém však nastáva u pacientov, ktorí sú alergickí na β -laktámové antibiotiká. U týchto pacientov sú liekom voľby v závislosti od diagnózy makrolidové, linkozamidové, resp. tetracyklínové antiinfekčné liečivá.

Antibiotická rezistencia tohto organizmu sa v posledných rokoch mení a je to hlavne kvôli nevhodnému použitiu širokospektrálnych antibiotík. Početnosť rezistencie GAS k rôznym antibiotikám sa celosvetovo zvyšuje.

Antibiotická rezistencia sa stáva celosvetovým problémom. Súčasný trend negatívneho vývoja poukazuje na nutnosť účelného a uvážlivého podávania antibiotík, ktoré jediné môžu súčasný stav zlepšiť. Predpokladom účelnej preskripcie antiinfekčných liečiv je poznanie mechanizmov rezistencie a aktuálnych prehľadov regionálnych citlivostí najčastejších pôvodcov infekcií. Z času na čas je potrebný dohľad, aby sa monitorovali zmeny v profile antibiotickej citlivosti GAS s cieľom usmerniť lekárov, aby si vybrali vhodné antibiotiká.

Cieľom diplomovej práce je identifikácia izolovaných kmeňov *S. pyogenes* na Ústave klinickej mikrobiológie vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové (ÚKM FN HK) a výskyt

rezistencie kmeňov *S. pyogenes* počas rokov 2013 – 2017 vo FN HK a poskytnúť prehľady ich citlivosti a rezistencie voči makrolidovým antibiotikám.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 História *Streptococcus pyogenes*

Streptokokové ochorenia sú známe už po stáročia. Pôvodné spisy Hippokrata zo štvrtého storočia pred naším letopočtom sa zmiňujú prvýkrát o *S. pyogenes* (Leyro 2008). Konkrétne ide o symptómy, ktoré vznikajú pri ochoreniach spôsobených týmito mikroorganizmami. Hippokrates ako prvý popísal symptómy, ktoré súviseli s tzv. „mäsožravými“ baktériami. O niekoľko tisíc rokov neskôr ďalší výskumník Theodor Billroth, popísal zopár dôležitých vlastností a charakteristík týkajúcich sa infekcií zapríčinených hore uvedenými baktériami (Leyro 2008; Wang et al., 2017).

Prvý popis streptokokovej infekcie sa pripisuje rakúskemu chirurgovi Theodorovi Billrothovi v roku 1874, keď opísal organizmus v prípadoch erysipelas a infekcií rany (Abraham, Sistla 2018). Popísal tieto "malé organizmy" (Kettenkokken), ktoré sa nachádzajú buď izolované alebo usporiadané v pároch, niekedy v reťazcoch so štyrmi až dvadsiatimi alebo viacerými bunkami. Názov pozostáva z dvoch gréckych slov strepto – tvoriace reťazky a coccus – bobuľa. Formálny vstup streptokokov do histórie prišiel v roku 1879, kedy Louis Pasteur izoloval mikroorganizmus z maternice a krvi žien s febrilnou horúčkou. Dokázal, že streptokok bol etiologickým činiteľom zodpovedným za chorobu, ktorá pôsobila najvyššiu úmrtnosť žien a novorodencov v tom čase. Vývoj názvu streptokoka pochádza od Friedricha Julia Rosenbacha v roku 1884, ktorý skúmal baktérie izolované z hnisavých lézií a tento druh bol pomenovaný *S. pyogenes* (grécky, pyo hnis a genes formujúce). Predtým Fehleisen izoloval streptokoky od pacienta s eryzipelas a Rosenbach ich pomenoval ako *Streptococcus erysepaltis*. Neskôršie prehľady však ukázali, že neexistujú žiadne osobitné charakteristiky spojené s organizmami izolovanými zo špecifických ochorení a Andrews a Christie navrhli, že skôr nazvané druhy *pyogenes*, *erysepaltis*, *scarlatinae* a *puerperalis* sú zahrnuté do jediného názvu *S. pyogenes* (Leyro 2008; Murray et al., 2014; Ferretti, Köhler 2016).

Ďalšie dôležité kroky vpred pri diferenciacii streptokokov boli urobené v roku 1903 pánom Hugom Schottmuellerom, ktorý zaviedol kultiváciu na krvných platniach. Významný je aj rok 1919, kedy spolu s pánom Jamesom H. Brownom popísali α , β a γ typy hemolýzy. Štúdiou hemolytických streptokokov sa okolo roku 1930 zaoberala Rebecca C. Lancefieldová. Kvôli ich sérotypizácii "na základe reakcií zrážania M-proteínu" dokázala klasifikovať beta-hemolytické streptokoky do viacerých sérotypov. Poukázala tak na dôležitosť M-proteínu v patogenéze ochorení a post-streptokokových následkov spôsobených kmeňmi *S. pyogenes*. V roku 1933 Lancefieldová použila rozdiely medzi povrchovými antigénmi medzi rôznymi

streptokokmi na ich ďalšie rozdelenie do skupín označených písmenami A až X. Kmene z ľudských chorôb boli klasifikované ako skupina A; kmene z hovädzieho dobytku a mliečnych zdrojov ako skupina B; kmene z rôznych živočíšnych zdrojov ako skupina C (Leyro 2008; Ferretti, Köhler 2016).

1.2 Charakteristika *Streptococcus pyogenes*

Rod *Streptococcus* predstavuje grampozitívne, fakultatívne anaeróbne, kataláza negatívne, kokovité baktérie, ktoré majú sférický až ovoidný tvar s priemerom od 0,6 do 1 μm , zoskupené často vo dvojiciach alebo v retiazkach. Na obohatených pôdach vytvárajú veľmi drobné kolónie (Bálint et al., 2007). Streptokoky sú nepohyblivé, nesporulujúce, nehydrolyzujú eskulín, nerastú v prítomnosti 6,5% NaCl a 40% žľových solí a ani pri pH vyššom ako 9 (Votava et al., 2005). Do skupiny A podľa Lancefieldovej zaraďujeme *S. pyogenes* na základe stenovej polysacharidovej substancie C (obsahuje N-acetylglukozamín a ramnózu). Širokú zónu β -hemolýzy *S. pyogenes* typicky vytvára na krvnom agare, preto sa nazýva aj ako beta-hemolytický streptokok skupiny A alebo GAS (group A *Streptococcus*; Spellerberg, Brandt 2016; Berwal et al., 2019).

Streptokoky skupiny C a G sú veľmi podobné streptokokom skupiny A. Do tejto skupiny patria *S. equisimilis*, *S. zooepidemicus*, *S. equi* (skupina C), *S. bovis* (nehemolytický) a *S. canis* (skupina G). Často sa izolujú z materiálov horných dýchacích ciest, menej často z hemokultúr imunosuprimovaných pacientov, u ľudí vo vyššom veku a chronicky chorých. Na krvnom agare takisto vytvárajú zónu β -hemolýzy. Môžu spôsobovať ochorenia ako impetigo, eryzipel a šarlach. Nie sú však primárne patogénne a k vzniku týchto ochorení dochádza u prechodne alebo trvalo imunodeficientných, či imunokompromitovaných pacientov. Navyše u predisponovaných pacientov (umelé chlopne, reumatická horúčka) môžu vyvolať endokarditídy (Bálint et al., 2007).

S. pyogenes je pre človeka primárne patogénny. Streptokoky skupiny A sa vyskytujú len v ľudskej populácii. V prírode sa voľne nenachádzajú. Okrem jedincov, u ktorých sa infekcia touto baktériou prejaví, sa môže izolovať aj od tzv. „nosičov“. U nosičov je *S. pyogenes* prítomný najmä na sliznici nazofaryngu, zriedkavejšie na koži, a klinicky sa nemanifestuje ochorením. Prevalencia nosičstva závisí od vekovej skupiny v oblasti. V detskej populácii sa odhaduje približne na 15-20%, u dospeljej populácie je nižšia (Stevens et al., 2000).

Prenos infekcie môže byť priamy alebo nepriamy. Priamy prenos je sprostredkovaný kvapôčkami nazofaryngeálneho sektrétu pri kýchaní, kašľaní alebo rozprávaní nosiča, resp.

chorého jedinca. Streptokoky majú schopnosť prežívať krátky čas na neživých predmetoch ako sú kľučky, poháre a kuchynský riad. Je teda možný aj nepriamy prenos prostredníctvom týchto predmetov. Je však menej častý. Keďže je prenos infekcie z človeka na človeka najčastejší, vrchol incidencie infekcií zapríčinených touto baktériou je v zimných mesiacoch a hlavne v detských kolektívoch (Smith et al., 2010; Leung, Hon, Leung 2018).

1.3 Antigénna štruktúra a faktory virulencie

Streptokoky skupiny A obsahujú viacero antigénnych štruktúr a extracelulárnych produktov dôležitých v patogenéze ochorení, ako aj v imunitnej odpovedi organizmu. Medzi najdôležitejšie patrí:

Polysacharid C sa nachádza na bakteriálnom povrchu, Na základe tohto antigénu zaradujeme *S. pyogenes* do skupiny A podľa Lancefieldovej (Bednář 1999).

Proteín M je najdôležitejším antigénom s vláknitou štruktúrou, ktorý určuje virulenciu. Umožňuje adhérenciu na epitel slizníc a bráni fagocytóze. Je základom serotypizácie kmeňov *S. pyogenes* a pomocou nej môžeme rozlíšiť viac ako 100 antigénne odlišných sérotypov. U niektorých typov proteínu M bola dokázaná štrukturálna podobnosť s proteínmi bazálnej membrány obličiek, tzv. nefritogénnych sérotypov (typ 2, 6, 12, 49, 55) a u iných, tzv. reumatogénnych sérotypov (1, 3, 5, 14, 18, 19, 24) bola dokázaná príbuznosť s antigénmi sarkolémy kardiomyocytov. Tieto sérotypy *S. pyogenes* môžu mať významnú úlohu v patogenéze post-streptokokových sterilných komplikácií a následkov. Protilátky proti proteínu M majú protektívny charakter, ale sú typovo špecifické – chránia iba pred infekciou rovnakým sérotypom. **Proteín T** má zatiaľ neznámu funkciu v patogenéze ochorení, no využíva sa v typizácii (Votava et al., 2005; Bálint et al., 2007; Teraon 2012).

Medzi ďalšie faktory virulencie patria kyselina lipoteichoová, hyaluronidáza, deoxyribonukleáza, streptokinázy, proteinázy a antigény streptolysin O i S. Dôkaz protilátok proti hyaluronidáze, deoxyribonukleáze-B ale najmä proti streptolysínu O (ASLO) patria medzi významné nepriame laboratórne diagnostické parametre, či ukazovatele post-streptokokových následkov (Bálint et.al., 2007; Teraon 2012).

Kyselina lipoteichoová napomáha adhézii a tvorbe biofilmu a je spoluzodpovedná za hydrofóbnosť (Votava et al., 2005).

Hyaluronidáza má antigénny charakter. Štiepi kyselinu hyaluronovú v medzibunkovom tmeli a spojive, a tým uľahčuje prenikanie streptokokov tkanivom (Bednář 1999; Votava et al., 2005).

Deoxyribonukleáza B depolymerizuje kyselinu deoxyribonukleovú z rozpadnutých buniek. Je antigénna a využíva sa v nepriamej diagnostike na dôkaz protilátok proti nej (Bednář 1999; Votava et al., 2005).

Streptokináza je enzým aktivujúci fibrínolytický systém, ktorý katalyzujevpremenu plazminogénu na plazmín. Zároveň sa uvoľňujú chemotaktické faktory a zvyšuje sa tak permeabilita ciev tým, že enzým pôsobí na komplementový systém (Bednář 1999; Teraon 2012).

Streptolyzín O je oxygenlabilný hemolyzín, ktorý má toxické vlastnosti pre erytrocyty, leukocyty a monocyty. Aktívny je len v redukovanej forme. Viaže sa na cieľové miesto obsahujúce cholesterol v cytoplazmatickej membráne erytrocytov, leukocytov, trombocytov a iných buniek. Deštruuje cytoplazmatickú membránu a spôsobuje smrť buniek (Bednář, 1999). Je antigénny a protilátky proti nemu (antistreptolyzín O, ASLO) slúžia k retrospektívnej diagnostike prekonaných streptokokových infekcií a prípadných neskorých následkov (Votava et al., 2005; Teraon 2012).

Streptolyzín S je na rozdiel od streptolyzínu O oxygenstabilný a neimunogénny hemolyzín. Je zodpovedný za smrť leukocytov, ktoré fagocytovali pyogénne streptokoky (Votava et al., 2005).

Z extracelulárnych produktov majú dôležitú úlohu v patogenéze najmä **pyrogénne toxíny**, ktoré sa podieľajú na vzniku exantémových ochorení, ale aj ťažkých invazívnych infekcií vrátane nekrotizujúcej fasciitídy („mäsožravé streptokoky“) a syndrómu toxického šoku. Pyrogénne toxíny patria taktiež medzi superantigény. Známe sú tri typy pyrogénnych toxínov (A, B, C) a protilátky proti nim sú typovo špecifické (Bálint et al., 2007).

1.4 Charakteristika infekcií zapríčinených baktériou *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes (GAS) je jednou z najdôležitejších príčin bakteriálnych infekcií kože a mäkkých tkanív po celom svete. Spôsobuje infekcie v povrchovej keratinovej vrstve (impetigo), povrchovej epiderme (eryzipel), subkutánnom tkanive (celulitída), fascii (nekrotizujúcej fasciitíde) alebo svaloch (myozitída). Je to tiež etiologický agens horúčky

a syndrómu streptokokového toxického šoku. Impetigo je život neohrožujúca infekcia, ale môže viesť k poststreptokokovej akútnej glomerulonefritíde. Celulitída a eryzipel môžu byť mierne alebo stredne závažné, zatiaľ čo nekrotizujúca fascitída, myozitída a syndróm streptokokového toxického šoku sú život ohrozujúce (Stevens, Bryant 2016).

Výskyt veľmi rýchleho priebehu infekcií spôsobených *S. pyogenes* od polovice 19. storočia klesal, no začiatkom 80-tych rokov 20. storočia začal opäť stúpať a zvýšila sa aj letalita v dôsledku streptokokovej sepsy. Základným miestom vstupu *S. pyogenes* sú horné dýchacie cesty a zároveň sú aj primárnym miestom prepuknutia infekcie. Infekcia sa šíri kvapôčkovým prenosom, no ďalším veľmi častým spôsobom prenosu infekcie je kontakt s infikovanou kožou (Greenwood, Peutherer 2002).

Infekcie spôsobené kmeňmi *S. pyogenes* môžeme v podstate rozdeliť na 3 skupiny:

1. Infekcie horných dýchacích ciest, nekomplikované infekcie kože a mäkkých tkanív – eryzipel, pyodermia, ektyma a celulitída;
2. Vážne invazívne infekcie – nekrotizujúca fascitída, sepsa vrátane puerperálnej sepsy, streptokokový syndróm toxického šoku – STSS;
3. Postinfekčné sterilné autoimunitné následky – reumatická horúčka a post-streptokoková glomerulonefritída (Bálint et al., 2007)

1.4.1 Faryngitída a folikulárna tonzilitída

Ide o najčastejší typ ochorenia vyvolávaný baktériou *S. pyogenes*. Toto ochorenie sa začína náhle. Prejavuje sa bolesťou hrdla, submandibulárnou lymfadenopatiou, vysokou horúčkou a triaškou, ktoré sa objavia dva až štyri dni po expozícii patogénu. Typická je bolesť pri prehĺtaní, naopak kašeľ a zachrípnutie nie sú typickým prejavom, skôr sú vzácne (Martins et al., 2014). Uvula je edematózna, tonzily hypertrofické, začervenané, na ktorých sa môže vyskytovať sivobiely exsudát a príležitostne môže byť v kryptách hnis. V dutine ústnej je zvyčajne lokalizovaná nekomplikovaná faryngitída. Bolesť, začervenanie a horúčka môžu ustúpiť do 3 až 4 dní aj bez liečby. V súčasnosti sa však liečia aj nezávažné formy faryngitíd a tonzilitíd. Terapia je zameraná aj na predchádzanie vzniku post-streptokokových následkov (Stevens et al., 2000; Tang et al., 2019). Avšak, v závislosti na povahe kmeňa, na stave imunitného systému jedinca a v závislosti od liečby môžu tieto ochorenia progradovať do hnisavých infekcií hlavy a krku, bakteriémie, šarlachu, syndrómu streptokokového šoku, reumatickej horúčky alebo post-streptokokovej glomerulonefritídy. Až u 75% dospelých a starších ľudí sa ochorenie prejavuje typickými symptómami a príznakmi, čo vedie

k jednoduchému určení diagnózy. Diagnostika je sťažená absenciou čo i len jedného typického príznaku. Odlíšenie streptokokovej faryngitídy od vírusovej nie je možná bez mikrobiologického alebo sérologického vyšetrenia (Stevens et al., 2000; Greenwood, Peutherer, 2002). Diagnostike významne napomáha aj stanovenie tzv. markerov zápalu ako napr. C-reaktívny proteín (Greenwood, Peutherer 2002). Terapeuticky sa podáva fenoxymetylpenicilín alebo cefadroxil (Kumar, Clark 2012; Beneš 2018).

1.4.2 Impetigo

Impetigo je najčastejšou bakteriálnou infekciou kože u detí vo veku od 2 do 5 rokov (Pereira 2014). Ide o mimoriadne infekčné ochorenie s výskytom malých epidémií u detí s nízkym hygienickým štandardom alebo malnutríciou. Zdrojom infekcie je človek so streptokokovou infekciou, prípadne bezpríznakový nosič. Najprv dochádza ku kolonizácii neporušenej kože a následne infekcia preniká do intradermálnych štruktúr (Bálint et al., 2007). Existujú dva hlavné typy: nebulózne (70% prípadov) a bulózne (30% prípadov). Nebulózne impetigo alebo impetigo contagiosa je spôsobené *Staphylococcus aureus* alebo *S. pyogenes* a je charakterizované medovo sfarbenými chrastami na tvári a končatinách. Impetigo primárne postihuje kožu alebo sekundárne infikuje bodnutie hmyzom, ekzém alebo herpetické lézie. Bulózne impetigo, ktoré je spôsobené výlučne *Staphylococcus aureus*. Výsledkom sú veľké ochabnuté buly a je pravdepodobnejšie, že postihnú intertriginózne oblasti. Obe dva typy zvyčajne vymiznú v priebehu dvoch až troch týždňov bez zjazvenia a komplikácie sú zriedkavé, pričom najzávažnejšia je post-streptokoková glomerulonefritída. Aplikujú sa lokálne antibiotiká napr. mupirocin a kyselina fusidová, ale u ťažších stavov sa podávajú aj celkové antibiotiká p. o. (Hartman-Adams, Banvard, Juckett 2014; Pereira 2014).

1.4.3 Erysipelas – ruža

Erysipelas je infekčné ochorenie charakterizované akútnym zápalom kože a podkožného tkaniva. Choroba je najčastejšie spôsobená β -hemolytickými GAS (*S. pyogenes*), menej často streptokokovými skupinami B, C, G (Kozłowska et al., 2016). Týka sa najmä starších ľudí a mladých dospelých. Miestom vstupu infekcie sú často malé poranenia a odreniny kože. Erysipelas je charakterizovaný náhlým nástupom a rýchlym priebehom s prítomnosťou systémových príznakov ako je vysoká horúčka, zimnica a niekedy regionálna lymfadenopatia. V okolí miesta vstupu infekcie vzniká dobre ohraničený zápal pokožky s sčervenaním a edémom. Červené pruhy často pozorované v priebehu lymfatických ciev indikujú šírenie infekcie. Najčastejšie miesto erysipelas sú nohy, tvár (motýľovitý tvar), menej obvyčajné sú horné končatiny a iné oblasti tela. V ťažších prípadoch vzniká nekrotizácia kože, ktorá sa

prejavuje vznikom pľuzgierov v postihnutej oblasti. Proces môže postupovať do flegmóny až gangrény a zriedka môže vzniknúť ako komplikácia sepsa. Existuje niekoľko klinických foriem erysipelas: erytematózne, bulózne, gangrenózne a migrans. Laboratórne testy sa typicky preukazujú zvýšeným C-reaktívnym proteínom (CRP), vysokou leukocytárnou, rýchlosťou sedimentácie erytrocytov (ESR) a zvýšeným titrom antistreptolýzínu O (ASLO). Najčastejšie komplikácie zahŕňajú opakovaný výskyt ochorenia, vaskulitídu, lymfangitídu, flegmónu, trombózu a ulcerácie kože. Základom liečby sú systémové antibiotiká (Bálint et al., 2007; Kozłowska et al., 2016).

1.4.4 Streptokoková celulitída

Streptokoková celulitída je akútny zápal kože a mäkkých podkožných tkanív. Zvyčajne vzniká z infekcie popálenín, rán alebo chirurgických rezov. Klinické nálezy zahŕňajú lokálnu bolesť, citlivosť, opuch a erytém. Proces sa môže rýchlo rozšíriť na veľké plochy kože. Medzi systémové prejavy patrí horúčka, triaška a malátnosť a môže sa vyskytnúť súvisiaca lymfangitída, bakteriémia alebo oboje. Na rozdiel od erysipelasu, lézia nie je zvýšená a je skôr ružovej farby (Stevens, Bryant 2016).

1.4.5 Lymfangitída

Ide o kožnú infekciu ako celulitída alebo erysipelas s jasne červenými pruhmi postupujúcimi i proximálne, ktorá môže postihnúť lymfatické uzliny. Lymfangitída je závažné ochorenie a pacienti by mali byť hospitalizovaní. V iniciálnej terapii by im mali byť podávané antibiotiká parenterálne kvôli možnému vzniku septických komplikácií (Stevens et al., 2000).

1.4.6 Nekrotizujúca fascitída

Nekrotizujúca fascitída inak nazvaná streptokoková gangréna je zriedkavý infekčný proces charakterizovaný rýchlym, širokým výskytom nekrózy kože, podkožného tkaniva a povrchovej fascie. Postihnutie hlavy a krku je zriedkavé, ale nesie významnú morbiditu a mortalitu (Shang, Zhang, Hou 2017; Ferzli et al., 2019). Prípady sa vyskytujú častejšie u jedincov s oslabeným imunitným systémom. Infekcie môžu byť monomikrobiálne alebo polymikrobiálne a pôvodcovia zahŕňajú anaeróby (*Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* atď.), ako aj *Staphylococcus aureus*. Infekcia vzniká na podklade triviálneho alebo nejasného poranenia. V priebehu 24hod vzniká opuch, miesto poranenia je teplé a začervenané. Býva prítomná bolesť a proces sa rýchlo šíri proximálnym a distálnym smerom. Medzi 24 – 48hod erytém kože tmavne, mení sa na tmavofialovú cyanotickú až tmavomodrú farbu.

Vznikajúce pľuzgiere a buly vyplnené čírou žltkastou tekutinou. Na štvrtý až piaty deň vzniká gangréna (Bálint et al., 2007; Smith et al. 2018).

1.4.7 Myozitída

Ide o zriedkavú infekciu, ktorá je klinickým obrazom podobná nekrotizujúcej fascitíde. V poslednej dobe incidencia streptokokovej myozitídy mierne vzrástla v Nórsku, Švédsku a USA. Baktérie prenikajú do svalového tkaniva trhlkami alebo hematogénne. Silná bolesť, edém, erytém, zvýšená teplota a narušenie funkcie svalov môžu byť jedinými príznakmi infekcie. Najčastejšie je postihnutá jedna svalová skupina, avšak u pacientov, ktorí sú septickí, dochádza k postihnutiu viacerých svalových skupín alebo tvorbe abscesov (Stevens et al., 2000; Cavagnaro S. M. et al., 2017).

1.4.8 Puerperálna sepsa

Ide o ochorenie, ktoré vzniká v šestonedelí. Puerperálna sepsa zostáva hlavnou príčinou úmrtnosti matiek na celom svete. *S. pyogenes* je organizmus spojený s vysokou mierou chorobnosti a úmrtnosti na puerperálne infekcie. Keď sa spája so sepsou, známou ako syndróm streptokokového toxického šoku, miera úmrtnosti sa blíži 30 - 50%. GAS môžu spôsobiť invazívne infekcie vo forme endometritídy, nekrotizujúcej fascitídy alebo syndrómu streptokokového toxického šoku. Klinický obraz žien s puerperálnymi GAS infekciami je často atypický s extrémnymi teplotami, nezvyčajnou vaginálnou bolesťou a bolesťou končatín. Produkcia toxínov môže dovoliť, aby sa GAS rozšíril cez tkanivá a spôsobil nekrózu. Zobrazovacie metódy ako počítačová tomografia (CT) a magnetická rezonancia (MR) môžu upozorniť na edém uteru a peritoneálny výpotok. Diagnostická laparoskopia a hysterektómia môžu byť život zachraňujúcim úkonom (Stevens et al., 2000; Sivanesan, Singh, Burch 2010).

1.4.9 Šarlach

V súčasnosti šarlach prebieha ako mierne až stredne ťažké ochorenie. Môže byť spôsobené streptokokmi skupiny A, prípadne C a G, produkujúcimi pyrogénny exotoxín typu C, tzv. erytrogénny toxín. Baktérie sa často šíria kašľaním alebo kýchaním pacientov alebo nosičov, medzi ktorými sú deti pomerne náchylné na infekcie, najmä vo veku 5 až 15 rokov. Inkubačná doba tohto ochorenia je 1-2 dni. Klinické príznaky a symptómy infikovaných sú zvyčajne charakterizované horúčkou, angínou, difúznou červenou vyrážkou celého tela a zjavnou deskvamáciou kože po vyrážke, zatiaľ čo u malého počtu pacientov sa môže tiež vyvinúť poškodenie srdca, obličiek a kĺbov v dôsledku alergií po chorobe. Na podnebí vzniká enantém a niekedy aj petechie. Jazyk je najprv belavo povlečený a asi od 3. dňa je červený s

papilami – malinovitý jazyk. Súčasne sa na koži objavuje drobnoskvvrnitá vyrážka, sprvu na podbruší a na vnútorných stranách stehien, v axilách, bočných častiach trupu a flexorových častiach končatín, ktorá sa šíri na celé telo okrem dlaní a stupají. Na lícach je erytém s typickým periorálnym vyblednutím (tzv. Filatovov príznak). Exantém má charakter malých makúl a papúl veľkosti 1 – 2mm. Po zatlačení prechodne vymizne. Na posledných článkoch prstov v okolí nechtov a na ušiach sa vyskytujú biele, lesklé papuly (tzv. Šrámkov príznak). V ďalšom priebehu červeň vyrážky ustupuje, koža sa stáva drsnou a olupuje sa v malých šupinkách (Bálint et al., 2007; Zhang et al., 2017, Wang et al., 2019).

1.4.10 Streptokokový syndróm toxického šoku

Ide o ťažké ochorenie spojené s bakteriémiou, hypertermiou, toxickým pyrogénnym priebehom, produkciou erytrogénneho toxínu, renálnym zlyhaním, hypotenziou a syndrómom akútnej respiračnej tiesne (ARDS). Vzniká progresiou nekrotizujúcej fascitídy, celulitídy alebo myozitídy. Tento syndróm môže vznikáť aj pri pneumónii, peritonitíde či osteomyelitíde. Hoci streptokokový syndróm podobný toxickému šoku môže postihovať ľudí všetkých vekových kategórii, zvýšené riziko hrozí imunodeficientným pacientom s HIV, rakovinou, diabetes mellitus, s ochoreniami srdca a pľúc, s infekciami varicella-zoster virom, narkomanom a alkoholikom (Murray et al., 2013). Až v 30% prípadov končí smrteľne. Liečba musí byť urgentná. Podávajú sa i. v. antibiotiká v kombinácii penicilín s klindamycínom. Patogenéza nie je jednoznačne známa. Predpokladá sa, že sa na nej podieľajú streptokoky produkujúce pyrogénny toxín B alebo C (tzv. mäsožravé streptokoky; Bálint et al., 2007).

1.4.11 Sterilné post-streptokokové následky

Ide o choroby, ktoré vznikajú po období akútnej infekcie. *S. pyogenes* môže byť ešte stále prítomný v organizme. Príčinou týchto chorôb je aj skrížená imunitná reakcia medzi protilátkami a štrukturálne podobnými antigénmi v tele, to znamená vlastnými štruktúrami tkanív. Tvorba protilátok, imunitná reakcia so štrukturálne podobnými antigénmi v tkanivách a s antigénmi streptokokov, vytváranie imunokomplexov či ich ukladanie do tkanív má za následok poškodenie organizmu. K týmto chorobám patrí reumatická horúčka a akútna post-streptokoková glomerulonefritída (Stevens et al., 2000).

1.4.11.1 Reumatická horúčka

Je to akútne horúčkovité postihnutie s prejavmi migrujúcej polyartritídy, endokarditídy. Najzávažnejšie je postihnutie srdca, ktoré môže skončiť aj srdečným zlyhaním, vznikom chlopňovej vady. Vzniká približne v 3. týždni po streptokokovej angíne. U detí a mladých

dospelých sa prvýkrát sa vyskytuje vo veku od 5 do 15 rokov. Ide o následok neliečenej infekcie GAS. Postihuje srdce, kožu, kĺby a CNS. V súčasnej dobe sa vyskytuje na Strednom a Ďalekom Východe, vo Východnej Európe a Južnej Amerike, no v minulosti sa často vyskytovala aj v Českej republike. Diagnóza sa stanoví na základe prítomnosti dvoch alebo viacerých hlavných klinických príznakov. V terapii sa uplatňuje absolútny pokoj na lôžku. Podáva sa fenoxymetylpenicilín a u alergických pacientov sa užíva klaritromycín. Akákoľvek rozvíjajúca sa streptokoková infekcia by mala byť okamžite liečená (Kumar, Clark 2012).

1.4.11.2 Akútna glomerulonefritída

Je to zápalové, imunokomplexové ochorenie glomerulov, ktoré vzniká ako následok infekcie nefritogénnymi kmeňmi streptokokov (M typy 2, 6, 12, 49, 55). Výskyt vo vyspelých krajinách dlhodobo klesá. V aktívnej fáze ochorenia je pozorovaná proliferácia mezangiálnych a endotelových buniek a exsudát neutrofilov a monocytov. Imunofluorescenčne je dokázaná C3 zložka komplementu a IgG pozitivita. 1 - 2 týždne po infekcii vzniká akútny nefritický syndróm charakterizovaný opuchom tváre a viečok, miernou proteinúriou, mikroskopickou hematúriou, oligúriou, zvýšeným krvným tlakom a nešpecifickými príznakmi. K diagnostike pomôže klinický obraz a dôkaz zníženia C3 zložky komplementu v krvi. V terapii sa uplatňuje reštrikcia sodíka a tekutín, podávanie diuretík, antihypertenzív. Podávajú sa penicilínové antibiotiká a v prípade alergie na penicilín makrolidy 7 - 10 dní (Stevens et al., 2000; Češka et al., 2010).

1.5 Mechanizmy účinku antibiotík

V terapii streptokokových ochorení sa môže podávať viacero druhov antibiotík. Jednoznačne najčastejšie sú aplikované penicilínové antibiotiká, a to najmä vďaka veľmi dobrej dlhodobo pretrvávajúcej citlivosti kmeňov *S. pyogenes*. Pri ochoreniach pacientov alergických na penicilíny, v prípade citlivosti, je možné podať antiinfekčné látky makrolidového, linkozamidového, tetracyklínového a glykopeptidového radu. V terapii infekcií močových ciest sú účinné antimikrobiálne chemoterapeutiká, ako je kotrimoxazol a ofloxacín.

Mechanizmus účinku penicilínových antibiotík je sprostredkovaný ich väzbou na enzýmy (transpeptidázy, karboxypeptidázy), ktoré sa zúčastňujú na zosieťovaní peptidoglykánu (základná zložka bunkovej steny) z N-acetylglukozamínu a kyseliny N-acetylmurámovej. Tieto enzýmy sa označujú aj ako PBP – penicillin-binding proteins (penicilín viažuce proteíny). Väzba penicilínu na PBP zastaví v rastúcich baktériách vznik peptidoglykánu a podnieti uvoľnenie autolytických enzýmov, ktoré zabezpečia deštrukciu tvoriacej sa bunkovej steny. Pôsobia baktericídne.

Makrolidové antibiotiká inhibujú proteosyntézu. Viazu sa na ribozomálnu RNA, kde zabraňujú uvoľneniu tRNA na vznik peptidovej väzby. Pôsobia bakteriostaticky.

Linkozamidové antibiotiká inhibíciou peptidyltransferázy bránia vzniku peptidovej väzby, a tým aj predĺženiu molekuly proteínu. Takisto pôsobia bakteriostaticky. Táto vlastnosť sa využíva tak, že sa kombinujú s penicilínmi, pričom pôsobia na inhibíciu tvorby erytrogénneho toxínu, prípadne inhibíciu enzýmov, a tak pôsobia synergicky.

Tetracyklínové antibiotiká podobne ako predchádzajúce dve skupiny pôsobia prostredníctvom inhibície proteosyntézy. Svojou väzbou na ribozómy bránia komplexu aminoacyl - tRNA naviazať sa na príslušné miesto ribozómu. Výsledný účinok je bakteriostatický (Votava et al., 2005).

Napriek viac ako 50 ročnému rozsiahlemu a v niektorých krajinách aj voľnopredajnému užívaniu penicilínu na liečbu infekcií spôsobovaných *S. pyogenes* si mikroorganizmus zachováva veľmi dobrú citlivosť voči tomuto antibiotiku. K dnešnému dňu nebol zistený žiaden penicilín rezistentný kmeň *S. pyogenes*. V roku 1998 bola ukončená štúdia, ktorá sa zaoberala citlivosťou streptokokov skupiny A na penicilín. Vyhodnocovalo sa veľké množstvo vzoriek izolovaných v priebehu posledných 80 rokov a výsledok neodhalil žiadne markantné zmeny v citlivosti kmeňov *S. pyogenes* na penicilín (Macris et al., 1998).

Napriek mutáciám a šíreniu génov, ktoré sprostredkujú rezistenciu na antibiotiká, sa však rezistencia nevyvíja u všetkých mikroorganizmov uniformne. Rezistencia na penicilín sa vyskytuje u niektorých *S. pyogenes* príbuzných grampozitívnych baktérií, napr. penicilín-rezistentný *S. pneumoniae* a β -laktamázu (penicilinázu) produkuje penicilín-rezistentný *Staphylococcus aureus* (Breiman et al., 1994).

Predpokladá sa, že vzniku rezistencie na penicilín u kmeňov *S. pyogenes* bráni niekoľko faktorov. Jedným z nich by mohla byť produkcia najmenej 4 odlišných typov extracelulárnych DNA-áz, ktoré môžu do značnej miery limitovať možnosť získania exogénnej DNA a môžu pôsobiť preventívne pri vzniku antibiotickej rezistencie. Navyše sa u izolovaných *S. pyogenes* bežne vyskytuje fágmi kódovaný DNA restričný systém 2. typu. Replikácia alebo inkorporácia nemodifikovanej alebo odlišne modifikovanej DNA je v dôsledku existencie tohto restričného systému značne obmedzená. Kombinácia extracelulárnych a intracelulárnych nukleáz spoločne vytvára teoreticky impozantnú bariéru (Horn et al., 1998).

Ďalším z preventívnych mechanizmov vzniku rezistencie je neschopnosť expresie β -laktamáz alebo ich potenciálny toxický vplyv na kmene *S. pyogenes*. Existujú dôkazy, že gény rezistencie na penicilín pochádzajúce od stafylokokov sú prítomné aj u β -laktamáza produkujúcich enterokokov. Zatiaľ čo väčšina β -laktamáz stafylokokov sú inducibilné extracelulárne enzýmy, β -laktamázy enterokokov sú exprimované obvyčajne konštitutívne. Rezistencia na penicilín medzi streptokokmi, ktoré nepatria do skupiny A, takmer úplne vyplýva z nízkej afinity penicilínu k PBP a nie je modifikovaná expresiou β -laktamáz. Nedostatok génov kódujúcich β -laktamázy medzi kmeňmi streptokokov je pozoruhodný nález bez jasného vysvetlenia. V roku 1982 Gutmann a Tomasz sledovali účinok mutagénne pôsobiacich látok na streptokoky skupiny A. Pomocou etylmetánsulfonátu sa im podarilo vytvoriť penicilín-rezistentné laboratórne kmene *S. pyogenes*. Tieto mutanty produkovali PBP s nízkou afinitou k penicilínu, avšak súčasne mali nízky rastový potenciál a mnoho morfológických abnormalít (napr. zníženú produkciu proteínu M). Sledovanie poukázalo aj na to, že indukcia penicilínovej rezistencie môže spôsobiť závažné zmeny v metabolizme týchto mikroorganizmov a vedie k neefektívnej reprodukcii a rýchlej deštrukcii baktérií (Gutmann et al., 1982).

1.6 Genotypová determinácia a fenotypový prejav mechanizmov rezistencie

1.6.1 Rezistencia a jej formy

Rezistencia na antimikrobiálne chemoterapeutiká je jedna z foriem liekovej rezistencie, prostredníctvom ktorej sú subpopulácie mikroorganizmov, najčastejšie ide o baktérie, schopné prežívať expozíciu voči jednej alebo viacerým skupinám odlišných antiinfekčných látok.

Existujú mikroorganizmy, ktoré sú prirodzene rezistentné voči pôsobeniu určitých antimikrobiálnych látok. Tento druh geneticky získanej rezistencie nazývame primárna rezistencia. Napríklad gramnegatívne črevné tyčinky z čelade *Enterobacteriaceae* sú prirodzene rezistentné na základné penicilíny, makrolidy či linkozamídy. *Pseudomonas aeruginosa* je rezistentná voči kotrimoxazolu alebo mikroorganizmy, ktoré nemajú bunkovú stenu (napr. mykoplazmy) sú rezistentné voči pôsobeniu β -laktámových antibiotík. Druhý typ rezistencie je získaná rezistencia na antibiotiká. Ide o situáciu, kedy sa kmene primárne citlivé na dané antibiotikum stávajú voči nemu rezistentné. Genetickým podkladom vzniku získanej rezistencie môže byť mutácia alebo získanie génov prostredníctvom plazmidov či transpozónov. Tretím typom rezistencie je tzv. skrížená rezistencia, kedy si bakteriálny kmeň

po styku s jedným antibiotikom vyvíja voči nemu rezistenciu a súčasne s tým aj na viacero odlišných skupín antibiotík s podobnou štruktúrou alebo mechanizmom účinku.

Mechanizmy rezistencie môžeme charakterizovať z genotypového a fenotypového hľadiska. U kmeňov *S. pyogenes* rozlišujeme dva hlavné fenotypy – MLS_B a M (Edelstein 2003).

Pri MLS_B ide o rezistenciu na makrolidy, linkozamídy a streptogramín B, ktorá je sprostredkovaná enzýmom metyltransferázou. Metyláciou jedného adenínu na 50S podjednotke prokaryotického ribozómu sa zabráni väzbe erytromycínu na rRNA ribozómu. Metyltransferáza môže byť inducibilná ($iMLS_B$) alebo konštitutívna ($cMLS_B$) v závislosti od typu *erm* (erythromycin ribosomal methylase) génu, ktorým je kódovaná. Pri M fenotype ide o rezistenciu na makrolidy, ale nie na linkozamídy a streptogramín B. Tento fenotyp rezistencie je zabezpečený aktívnym efluxom antibiotika z bunky efluxovými pumpami, ktoré sú kódované *mef* (macrolide efflux pump) génmi (Edelstein 2003).

Fenotypy rezistencie k antibiotikám MLS_B a M sa vyšetrujú bežne vykonávanou diskovou difúznou metódou (Urbášková et al., 2007).

1.6.2 Horizontálny a vertikálny prenos génov

Horizontálny prenos génov, taktiež známy aj ako laterálny prenos génov, je prenos genetického materiálu (deoxyribonukleovej kyseliny) medzi bakteriálnymi bunkami, ktoré sú často fylogeneticky odlišné. Horizontálny prenos génov je z veľkej časti možný v dôsledku existencie mobilných elementov DNA, ako sú napríklad plazmidy, transpozóny (tzv. skákajúce gény) a integróny. Bakteriofágy tiež napomáhajú horizontálnemu prenosu génov (Russell et al., 2005). Tieto mobilné elementy DNA sa medzi bakteriálnymi bunkami môžu prenášať prostredníctvom konjugácie, transdukcie a transformácie.

Konjugácia predstavuje jednosmerný prenos DNA z donorovej bunky do bunky recipientnej prostredníctvom špeciálnych štruktúr, tzv. konjugačných pilusov (sex-pilusov). Tento proces vyžaduje priamy kontakt buniek a preto nie je ovplyvňovaný prítomnosťou nukleáz v extracelulárnom prostredí. Konjugácie sú schopné len bunky, ktoré vlastnia tzv. F faktor. Je to plazmidová DNA, ktorá obsahuje informáciu pre syntézu spomenutých sex-pilusov a ďalších molekúl potrebných pre transfer DNA. F plazmid sa prenáša len z donorových buniek (označené F^+) do recipientných, ktoré tento plazmid nemajú (F^-). Pri prenose F plazmidu dochádza zároveň k jeho replikácii, takže z donorovej bunky sa F plazmid nevytráca. Následne

po konjugácii získajú recipientné bunky fenotyp F⁺ a samy môžu byť donorom tohto plazmidu pre ďalšie bunky (Shelyakin et al., 2019).

Medzi kmeňmi *S. pyogenes* sú konjugáciou prenášané gény typu *erm*, ktoré nesú genetickú informáciu pre syntézu metylázy. Tento prenos prebieha z erytromycín makrolidy rezistentných kmeňov *S. pyogenes* na makrolidy erytromycín citlivé kmene.

Plazmid nesúci *erm* gén bol v poslednej dobe popísaný aj u kmeňov *S. pyogenes*. Plazmid označený pRW35 (4962 bp) obsahuje tri rôzne ORF *erm* oblasti a predpokladá sa, že pRW35 je schopný rozsiahleho šírenia (Woodbury et al., 2008).

Pod pojmom transdukcia rozumieme prenos DNA prostredníctvom bakteriálnych vírusoch – bakteriofágov. Využitím chýb pri replikácii vírusových častíc – viriónov môže dôjsť k prenosu vlastných génov bakteriálnej bunky do iných bakteriálnych buniek prostredníctvom fágov. Niekedy totiž dochádza k zabudovaniu cudzorodej bakteriálnej DNA do hlavičiek vírusových častíc, ktoré ju následne šíria medzi bakteriálnymi bunkami a tým pádom prenášajú gény hostiteľskej bunky. Bunky, ktoré od fágov prijali cudzorodú DNA, nazývame transduktanty. DNA je počas transdukcie chránená obalmi, takže podobne ako pri konjugácii, nie je tento proces ovplyvnený prítomnosťou nukleáz.

Transformácia je proces, pri ktorom dochádza k prenosu „holej“ DNA z extracelulárneho priestoru do bakteriálnej bunky bez vektorov. Bunkový kontakt pre transformáciu nie je potrebný. Bakteriálne bunky sa za normálnych okolností snažia prijatiu cudzorodej DNA vyhnúť – bunková stena nie je priepustná pre DNA. Okrem toho sa v bunke nachádza účinný reštrikčno-modifikačný systém (nukleázy degradujúce cudzorodú DNA).

Oproti tomu existuje bežný vertikálny (klonálny) prenos génov sprostredkovaný delením genetického materiálu z materských buniek do buniek dcérskych v priebehu bunkového delenia (Varaldo et al., 2008).

1.7 Mechanizmy rezistencie

1.7.1 Modifikácia cieľového miesta

Rezistencia na makrolidy u kmeňov *S. pyogenes* vychádza primárne z modifikácie cieľového miesta prostredníctvom metyláz kódovaných *erm* génmi. Gény *erm* – *ermA* a *ermB*, ktoré môžu byť prenášané plazmidmi a transpozónmi, zabezpečujú metyláciu adenínu na rRNA 23S ribozomálnej podjednotky. Gén *ermA* je inducibilne exprimovaný a determinuje mikroorganizmom nízky stupeň rezistencie na makrolidy, zatiaľ čo linkozamidy

a streptogramín B (MLS_B), ktorých väzbové miesta sa prekrývajú, zostávajú viac-menej účinné. Oproti tomu *ermB* môže byť konštitutívne alebo inducibilne exprimovaný a kóduje mikroorganizmom zvýšenú rezistenciu na MLS_B (Edelstein 2003).

Rezistencia na tetracyklíny je sprostredkovaná *tet* génmi. Medzi streptokokmi GAS sa najčastejšie vyskytujú dva typy *tet* génov – *tet M* a *tet O*. Proteíny nimi kódované, podobne ako produkty *erm* génov, modifikujú cieľové miesto účinku tetracyklínov na ribozómoch. Väzbou na ribozómoch spôsobujú alteráciu v ich konformácii, čím zabraňujú väzbe tetracyklínov na ribozómy. Proteínové produkty oboch génov *tetM* a *tetO* majú ribozóm dependentnú GTP-ázovú aktivitu. Následná hydrolyza GTP poskytuje energiu na konformačné zmeny ribozómov. Mikroorganizmy sa stávajú rezistentnými na tetracyklíny prostredníctvom mobilných elementov DNA. Streptokoky skupiny A získavajú rezistenciu na tetracyklíny najčastejšie horizontálnym prenosom génov (Edelstein 2003).

1.7.2 Efluxový mechanizmus

Druhý najčastejší mechanizmus rezistencie u kmeňov *S. pyogenes* je sprostredkovaný aktívnym efluxom antibiotík z buniek. Eflux zabezpečujú pumpy, ktoré sú kódované génmi typu *mef*. Sú známe dva typy týchto génov – *mefA* a *mefE*, pričom sú tieto dva gény až v 90% homológne. Ich prenos prebieha prostredníctvom transpozónov. Tento mechanizmus sa uplatňuje u 14-členných (erytromycín, klaritromycín) a 15-členných (azitromycín) makrolidov, ale nie u 16-členných makrolidov (spiramycín; Edelstein 2003).

1.7.3 Metabolický bypass

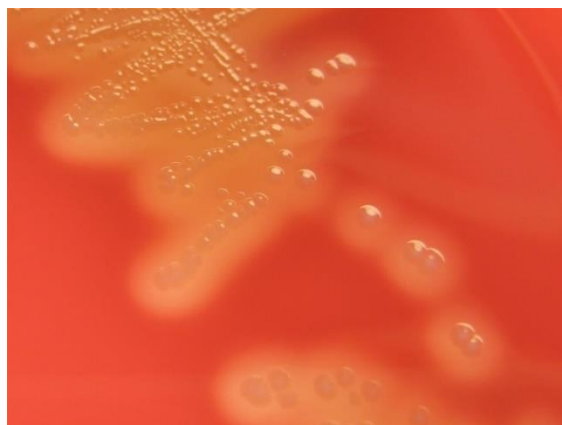
Pri tomto mechanizme rezistencie sa jedná o nahradenie (bypass) enzýmu primárne inhibovaného antibiotikom novým enzýmom, na ktorý antibiotikum neprejavuje účinok. Najčastejšie tento typ rezistencie vzniká pri užívaní sulfónamidov, kedy je enzým tetrahydropteroát syntetáza (podieľajúci sa na syntéze kyseliny dihydrolistovej) nahradený rovnakým typom enzýmu s nižšou afinitou voči tomuto typu antimikrobiálnej látky. V súčasnosti sú kmene *S. pyogenes* na sulfónamidy citlivé, avšak v štyridsiatych a päťdesiatych rokoch minulého storočia prevládal názor, že je u niektorých kmeňov *S. pyogenes* redukovaná citlivosť na tieto chemoterapeutiká. Tento mylný názor vznikol v dôsledku zisťovania citlivosti *S. pyogenes* (a iných mikroorganizmov) na pôdach s obsahom tymínu a tymidín fosforylázy (napr. krvný agar z konskej krvi). Tieto látky sú pre mikroorganizmy exogénne substráty antagonizujúce účinok sulfónamidov. S neskorším objasnením uvedených mechanizmov tento mylný názor zanikol (Bowen et al., 2012).

2 LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA *Streptococcus pyogenes*

V dnešnej dobe sa laboratórna diagnostika streptokokových infekcií skupiny A stále vo veľkej miere spolieha na kultiváciu baktérií z klinických vzoriek. Na detekciu streptokokov v klinických vzorkách (a najmä *S. pyogenes*) sa materiál najčastejšie kultivuje na krvných agarových platniach (Abraham and Sistla 2016). Následné potvrdenie podozrivých kolónií ako *S. pyogenes* môže byť dosiahnuté niekoľkými jednoduchými, rýchlo vykonanými laboratórnymi testami, ktoré sú stále rozšírené v klinickej mikrobiológii, napriek rastúcemu používaniu automatizovaných identifikačných systémov (Ray et al., 2016). Na rozdiel od diagnózy akútnych infekcií spôsobených *S. pyogenes*, diagnóza post-streptokokových ochorení, ako je glomerulonefritída, akútna reumatická horúčka, závisí od určenia špecifických protilátok proti streptolýzínu O (ASLO). Pre epidemiologické štúdie a vyšetrenia ohnisk boli vyvinuté rôzne metódy typizácie. Okrem klasických typizačných metód založených na sérologii sú k dispozícii dobre zavedené systémy molekulárnej typizácie, ktoré poskytujú veľké databázy už charakterizovaných kmeňov (You et al., 2015).

2.1 Mikroskopická a makroskopická morfológia *Streptococcus pyogenes*

Na identifikáciu *S. pyogenes* v klinických vzorkách sa využívajú krvné agarové platne (You et al., 2015). Typický vzhľad kolónií *S. pyogenes* po 24 hodinách inkubácie pri 35 - 37°C je kopulovitý s hladkým alebo vlhkým povrchom a čírymi okrajmi. Vykazujú bielo sivastú farbu, majú priemer $\geq 0,5\text{mm}$ a sú obklopené zónou β -hemolýzy, ktorá je často dvakrát až štyrikrát väčšia ako priemer kolónií. Mikroskopicky sa *S. pyogenes* v odbornej terminológii označovaný skratkou GAS, javí ako grampozitívne koky o priemere 0,6 – 1 μm . Streptokoky sa delia v jednej rovine a vytvárajú tak páry alebo reťazce rôznej dĺžky (obrázok 1), najmä v tekutom médiu v klinickej vzorke. Niektoré kmene *S. pyogenes* vytvárajú kapsulu počas prvých 2 – 4 hodín rastu (Parija 2009; You et al., 2015; Spellerberg, Brandt 2016).



Obrázok 1: *S. pyogenes* na agarových platniach s prímiesou ovčej krvi po 24 hod. inkubácii za aeróbnych podmienok (Spellerberg and Brandt 2016)

2.2 Kultivácia

S. pyogenes je aeróbnny až fakultatívne anaeróbnny mikroorganizmus. Rastie pri 37°C a pri pH 7,2 – 7,4 na obohatených médiách ako je krvný agar. Prítomnosť CO₂ zlepšuje rast a hemolýzu kolónií. Na krvnom agare produkujú okapsulované kmene mukózne kolónie. Virulentné kmene v čerstvej kultúre produkujú matné kolónie, kým nevirulentné kmene lesklé kolónie. Krvný agar s kryštálovou violetou je selektívne médium pre kultiváciu *S. pyogenes* (Ameri, Kolaibe 2015).

2.3 Biochemické testy

2.3.1 Bacitracínový test

S. pyogenes sa môže diferencovať od iných β-hemolytických streptokokov skupiny A ich zvýšenou citlivosťou na bacitracín (Bednář et al., 1999). Test bacitracínu spolu s testom Lancefieldovej antigénu A sa používa na väčšiu špecificitu pri identifikácii *S. pyogenes*, pretože iné β-hemolytické kmene streptokokov, ktoré môžu obsahovať antigén skupiny A, sú rezistentné voči bacitracínu. Test bacitracínu sa tiež používa na rozlíšenie *S. pyogenes* od iných β-hemolytických streptokokov, ktoré sú pozitívne na PYR, ako je *S. iniae* a *S. porcinus*. Na uskutočnenie testu citlivosti na bacitracín je dôležité, aby sa subkultúra kmeňa testovala na ovčej krvnej agarovej platni, pretože umiestnenie disku s obsahom bacitracínu B-H na primárnu platňu by mohlo poskytnúť variabilné výsledky (Bednář et al., 1996; Malhotra-Kumar et al., 2003; Spellerberg, Brandt 2016).

2.3.2 PYR test

PYR test je rýchla kolorimetrická metóda, ktorá sa často používa na rozlíšenie *S. pyogenes* od iných β -hemolytických streptokokov s podobnou morfológiou (ako je *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) a testuje prítomnosť enzýmu pyrrolidonylaminopeptidázy. Tento bakteriálny enzým hydrolyzuje L-pyrrolidonyl- β -naftylamid (PYR) na β -naftylamid, ktorý po pridaní cinnamaldehydového činidla vytvára červenú farbu. Test sa môže vykonať na papierových pásoch, ktoré obsahujú sušené chromogénne substráty pre pyrrolidonylaminopeptidázu, v priebehu niekoľkých minút. PYR spot testy sú dostupné u mnohých komerčných dodávateľov (Spellerberg, Brandt 2016; Compton et al., 2017).

2.4 Priamy dôkaz antigénu imunologickými metódami

2.4.1 Latexová aglutinácia

Latexová aglutinácia je diagnostický sérotypizačný test, ktorým je možné odlíšiť 5 druhov pyogénnych streptokokov (A, B, C, F, G) podľa Lancefieldovej. Pri použití „bielej“ latexovej aglutinácie sa výsledky zreteľne zobrazia na čiernom pozadí. Streptokokové antigény je možné izolovať pomocou jednoduchej inkubácie s využitím enzýmov. Antigény sú potom identifikované pomocou latexových častíc, ktoré majú na svojom povrchu naviazané protilátky proti stenovým skupinovo špecifickým streptokokovým antigénom. Latexové častice s naviazanou protilátkou v prítomnosti skupinovo špecifického antigénu aglutinujú za vzniku čírej suspenzie, zatiaľ čo v neprítomnosti antigénu zostávajú neaglutinované, v podobe mliečnej alebo homogénnej suspenzie (Abraham, Sistla 2016; Ferretti, Stevens, Fischetti 2016).

2.4.2 Rýchly imunochromatografický test

Tento test bol vyvinutý v posledných dvoch desaťročiach na dôkaz antigénu konkrétne polysacharidu C bunkovej steny. Používanie tohto testu sa rozšírilo najmä v diagnostike faryngitídy priamo v detských ambulanciách a pediatrických klinikách, čo značne znížilo počet antibiotických predpisov a viedlo k menšiemu počtu kultivácií zo vzoriek k výteru z hrdla v laboratóriách (Gazzano et al., 2016).

2.5 MALDI-TOF MS

V poslednej dekáde prešla klinická mikrobiológia revolučnými zmenami v metódach na identifikáciu mikroorganizmov. Uskutočnil sa prechod z tradičných a pomalých procesov identifikácie k rýchlym molekulárnym metódam a hmotnostnej spektrometrii. Hmotnostná spektrometria je analytická metóda, ktorá používa k analýze pomer hmotnosti a náboja rôznych látok. Najrozšírenejšou metódou na analýzu biomolekúl ku dnešnému dňu je matrix-assisted

laser desorption/ionization time of flights mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Iba s objavom MALDI-TOF MS v roku 1980 bola možná analýza relatívne veľkých molekúl vrátane veľkých ribozomálnych proteínov. Tie sú menej ovplyvnené kultivačnými podmienkami, čo umožňuje použitie MALDI-TOF MS na odlišenie bakteriálnych druhov. Je to zároveň veľmi senzitívna technika, pre ktorú je na analýzu potrebné len malé množstvo mikrobiálnej biomasy (pre baktérie $10^4 - 10^6$ CFU; Taek et al., 2015). MALDI-TOF MS je založená na ionizácii vzorky krátkymi laserovými pulzmi. Matrica, ktorá sa aplikovala na vzorku na doštičke, absorbuje svetelnú energiu a vyprodukuje dostatok tepla na vyparenie a zionizovanie vzorky. Elektromagnetické pole urýchľuje ióny pred ich vstupom do letovej trubice. Ako prechádza ión letovou trubicou, jeho rýchlosť je funkciou pomeru m/z (t.j. pomer relatívnej atómovej hmotnosti a počtu vytvorených kladne nabitých iónov). Z toho dôvodu sa pomer m/z pevných častíc meria na základe svojej doby doletu (**T**ime **O**f **F**light). Doba doletu sa zmeria, keď látka príde do detektoru, (čo je vysoko rýchlostné zaznamenávacie zariadenie a môže to byť špeciálny vysoko hmotnostný detektor alebo kryogénny detektor alebo ión na ión konverzujúce dyódové detektory, ktoré umožňujú zaznamenať aj veľmi vysoké m/z) na konci trubice. Detektor vytvorí graf alebo spektrum m/z verzus intenzita. Stupeň ionizácie ako aj hmotnosť proteínov určuje ich individuálny TOF. Informácie sú zaznamenané ako charakteristické spektrum, ktoré predstavuje jedinečný fingerprint vzorky, a ten je unikátny pre každý druh (Cai et al., 2013).

2.6 Metódy amplifikácie nukleovej kyseliny

2.6.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

PCR metóda podľa Abraham a Sistla (2016) preukázala 100% senzitivitu a špecifickosť za použitia génu *spyI258* u všetkých testovaných kmeňov *S. pyogenes*. Táto metóda sa ukázala lepšia ako všetky fenotypové testy a bola užitočná aj pri izolátoch, u ktorých boli tieto testy negatívne. Použitie PCR priamo na klinických vzorkách skracuje dobu potrebnú pre identifikáciu *S. pyogenes* a zlepšuje klinické výsledky, čo je potrebné hlavne v situáciách, kedy je včasná cielená terapia absolútne nevyhnutná, ako sú napr. prípady rýchlo progredujúcej nekrotizujúcej fascitídy. Ďalšie štúdie ukázali, že citlivosť PCR za použitia génu *spyI258* na detekciu *S. pyogenes* priamo z výteru z krku je nižšia v porovnaní s qPCR pri využití génu *speB* (Abraham, Sistla 2016).

2.6.2 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR)

qPCR je rýchla, vysoko senzitívna a špecifická metóda na detekciu *S. pyogenes* zo vzoriek výterov z hrdla, pričom cieľový gén je *speB* (Dunne et al., 2013). Táto metóda môže byť použitá ako náhrada kultivácie a detekcie antigénov pri diagnostike akútnej faryngitídy spôsobenej *S. pyogenes*. Výhodou qPCR je, že v prípade podania ATB pacientovi môže byť nárast v kultivácii obmedzený, zatiaľ čo výsledok qPCR zostáva neovplyvnený (Kolukirik et al., 2016).

2.7 Sérologické metódy

Uplatňujú sa pri diagnostike post-streptokokových ochorení ako reumatická horúčka alebo glomerulonefritída, kedy sa dokazuje prítomnosť určitej protilátky proti streptokokovi. Pri akútnej infekcii sú zriedka užitočné, keďže tvorba protilátok trvá asi od jedného do dvoch týždňov po nástupe akútnej infekcie, kedy sú už detekovateľné v sére pacienta. Štvornásobné zvýšenie titra protilátok sa považuje za signifikantný dôkaz predošlej streptokokovej infekcie. Hladinu protilátok ovplyvňuje niekoľko faktorov ako miesto infekcie, doba od nástupu príznakov, sezónne zmeny, no najmä vek pacienta. Najvyužívanejšími protilátkami pre diagnostiku post-streptokokových ochorení sú ASLO a anti-DNAáza-B (Gera, McIver 2013; Spellerberg, Brandt 2016).

2.7.1 Neutralizačný test

Klasický test na meranie titru ASLO, kedy je schopnosť hemolýzy streptolýzínu O inhibovaná ASLOm v sére pacienta. Na stanovenie patologickej hladiny ASLO je nutné vyšetriť akútne sérum (odobrané na začiatku ochorenia) a rekonvalescentné sérum (odobrané 4 týždne po prvom odbere). Tento test je tiež štandardný pre detekciu DNAázy-B, kedy sa pozoruje inhibícia nukleázovej aktivity prostredníctvom protilátok v sére pacienta. Titre protilátok anti-DNAázy-B sa začínajú objavovať od druhého týždňa po začiatku infekcie a dosahujú maximum počas 4 – 6 týždňov, pričom majú tendenciu zostať zvýšené dlhšie ako titre ASLO a sú spoľahlivejšie pre potvrdenie predchádzajúcej streptokokovej infekcie kože. DNAáza-B je navyše špecifická pre *S. pyogenes* a nie je prítomná u *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* na rozdiel od ASLO (Abraham, Sistla, 2016; Ferretti, Stevens, Fischetti 2016).

2.8 Vyšetrenie citlivosti na antibiotiká

Kvalitatívnymi a kvantitatívnymi metódami sa testuje citlivosť baktérií na antiinfekčné liečivá. Kvalitatívne testy pomáhajú zistiť či testované antibiotiká ovplyvňujú rast daného mikroorganizmu a ukazujú či je bakteriálny kmeň citlivý, rezistentný alebo intermediárne

citlivý. Kvantitatívnymi testami sa určuje minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) alebo minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) antimikrobiálnej látky. MIC je najnižšia koncentrácia liečiva, ktorá v štandardných podmienkach inhibuje rast baktérii. MBC je najnižšia koncentrácia antimikrobiálneho liečiva, ktorá v štandardných podmienkach za 16 - 24 hodín inkubácie usmrť minimálne 99,9% z populácie vyšetovaných baktérii. Presné určenie MIC závisí od správneho vyhodnotenia rastu vyšetovaného mikroorganizmu (Slobodníková et al., 2010; Bhardwaj et al., 2018).

2.8.1 Disková difúzna metóda

Je kvalitatívna metóda. Pri vyšetovaní izolovaného bakteriálneho kmeňa sa pripraví štandardná suspenzia baktérií vo fyziologickom roztoku s výslednou koncentráciou baktérií $1-3 \times 10^8/\text{ml}$, čo zodpovedá hodnote 0,5 na McFarlandovej zákalovej stupnici. Bakteriálna suspenzia sa tampónom rovnomerne rozočkuje na povrch Mueller–Hintonovej pôdy. Pôda nesmie obsahovať látky antagonisticky pôsobiace proti antimikrobiálnej látke. Kolónie baktérií nesmú navzájom splývať, iba sa dotýkajú svojimi okrajmi. Zdrojom antimikrobiálnej látky sú disky z filtračného papiera s priemerom 6 mm, ktoré obsahujú štandardné množstvo testovanej látky. Po 18 - 24 hodinách inkubácie pri 35°C sa hodnotí rast mikroorganizmov na platni. Veľkosť zóny zábrany rastu baktérií v okolí diskov hovorí o citlivosti mikroorganizmu na antimikrobiálnu látku. Zistením veľkosti inhibičnej zóny v mm a porovnaním s príslušnou hraničnou inhibičnou zónou zistíme či je kmeň na dané liečivo citlivý, rezistentný alebo intermediárne citlivý (Slobodníková a kol., 2010; EUCAST 2019).

2.8.2 Bujónový mikrodilučný test

Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) sa už dlho považuje za vhodnú metódu testovania rezistencie. Hodnota MIC sa udáva v $\mu\text{g}/\text{ml}$ alebo v mg/l . Pomocou tohto postupu testovania je možné kvantitatívne meranie a tým aj rozdelenie pôvodcov na senzitivné (S), intermediárne (I) alebo rezistentné (R). Kvalitatívny výsledok poskytuje bežný difúzny test na agare. Ten sa horšie štandardizuje a niekedy preceňuje senzibilitu pôvodcov. Antibiotikum sa nanesie v stúpajúcich koncentráciách (vždy zdvojnásobených) do jamôk mikrotitračnej platničky, kde sa nachádza dehydratované bujónové médium. Platnička sa potom naplní suspenziou jedného testovaného druhu a následne sa inkubuje. Rast sa vyhodnocuje fotometricky. Ak sledovaný kmeň rastie v prítomnosti určitej koncentrácie antimikrobiálnej látky tak po kultivácii sa sleduje prítomnosť zákalu. Ak bujón ostáva číry, tak je to v prípade, že je kmeň inhibovaný určitou koncentráciou antibiotika. Pod MIC rozumieme najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, pri ktorej je ešte bujón číry. Všetky kroky podliehajú

presne stanoveným podmienkam, čo sa týka média, množstva inokula, teploty a času inkubácie a pod.

Samotné hodnoty MIC ešte nie sú dostačujúce na rozdelenie pôvodcov na S, I a R. Preto je potrebné MIC pôvodcu (rovnako ako u DDM) porovnať s hraničnými hodnotami (breakpoints), ktoré sú špecifické pre každé antibiotikum, izolovanú baktériu, druh zvierat'a a pod (LABOKLIN 2016; EUCAST 2019).

2.8.3 Agarový dilučný test

Je štandardnou referenčnou metódou určovania MIC. Na pevné agarové pôdy s odstupňovanými koncentráciami antimikrobiálnych látok sa naočkujú vyšetřované mikroorganizmy. Po 18-24 hodinovej inkubácii pri 35°C sa zisťuje prítomnosť rastu baktérií. Ako MIC sa označí najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá inhibovala rast, to znamená, že spôsobila zábranu viditeľného rastu baktérii na agarovej pôde (Slobodníková et al., 2010; EUCAST 2019).

2.8.4 E-test

Test sa robí pomocou prúžku, na ktorom sú nanesené v určitých vzdialenostiach klesajúce koncentrácie antimikrobiálnej látky. Prúžok sa priloží na povrch platne s pôdou a inokulovanými kultúrami baktérií. Počas 18 - 24 hodinovej inkubácie pri teplote 37°C antimikrobiálna látka difunduje do pôdy a vytvára elipsoidnú zónu inhibície. Výsledok sa odčítava z prúžku v mieste, kde prúžok pretína okraj inhibičnej zóny (Slobodníková et al., 2010).

3 CIELE

Hlavný cieľ práce:

Základným cieľom tejto práce je retrospektívna analýza klinických a epidemiologických údajov o pacientoch, od ktorých bola izolovaná baktéria *S. pyogenes*, identifikácia týchto izolátov a stanovenie rezistencie *S. pyogenes* na antibiotiká zo skupiny MLS_B. Klinické a epidemiologické údaje boli získané od pacientov vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové (FN HK) a experimentálne práce s izolátmi baktérií boli prevádzané na pracovisku Ústavu klinickej mikrobiológie vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové (ÚKM FN HK).

Parciálne ciele práce:

- Vyhodnotiť výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných v priebehu rokov 2013 - 2017 vo FN HK
- Vyhodnotiť výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 podľa jednotlivých mesiacov
- Vyhodnotiť výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 podľa vekových kategórií pacientov
- Vyhodnotiť výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 v závislosti od pohlavia
- Vyhodnotiť výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 od miesta odberu z pacienta
- Vyhodnotiť citlivosti baktérie *Streptococcus pyogenes* na erytromycín na ÚKM FN HK
- Vyhodnotiť citlivosti baktérie *Streptococcus pyogenes* na klindamycín na ÚKM FN HK
- Vyhodnotiť fenotypový typ rezistencie v priebehu rokov 2013 - 2017 na ÚKM FN HK

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Klinický materiál

Analýzu výsledkov sme vykonali na podklade biologických vzoriek a izolovaných kmeňov *S. pyogenes*. Dáta sme získali z Laboratórneho informačného systému OpenLims z bakteriologického laboratória na Ústave klinickej mikrobiológie Fakultnej nemocnice Hradec Králové. Dáta pochádzali z obdobia rokov 2013 – 2017. Vzorky pochádzali z FN HK. Počas sledovaného obdobia bolo pozitívne prijatých 1609 izolovaných kmeňov *S. pyogenes* od 1291 pacientov.

4.2 Kultivácia

Prijaté vzorky výterov a sterov boli spracované mikroskopicky rovnako aj kultivačne a ostatné materiály mikroskopicky. Ku kultivácii bol použitý Columbia krvný agar s 10% defibrinovanej baranej krvi (kvasnicový extrakt, hovädzí extrakt, pankreatický trávený kazeín, živočíšne tkanivo, kukuričný škrob, NaCl a agar).

Prevedenie kultivácie:

1. Zo skúmavky s transportným médiom Amies sme vytiahli odberový tampón, ktorý sme očkovali na ½ KA (krvný agar).
2. Tampón sme v niektorých prípadoch materiálu (všetky okrem výterov z krku) zanorili do tekutej pomnožovacej pôdy (bujónu), takže sme výterový tampón nedali späť do transportného média. Tekuté materiály sme bakteriologickou kľučkou vyočkovali a časť sme dali do bujónu a zvyšok materiálu sa skladovali v chladničke. V prípade výterov z krku sme ihneď po inokulácii vrátili späť do transportného média a následne uchovali 24 hodín pri teplote $\pm 4^{\circ}\text{C}$.
3. Pomocou krížového rozteru sme bakteriologickou kľučkou rozočkovali inokulum.
4. Takto pripravený KA sme inkubovali 18-24 hodín pri teplote 37°C . Primokultiváciu sme prezerali ešte za 48hod. Za 24hod sme bujón vyočkovali opäť na KA a prezerali za 18 - 24 hodín.

Vlastnosti u narastených kolónií sme si všimali po skončení inkubácie. Zmes rôznych kolónií, ktoré obsahovali patogénnu ale aj fyziologickú mikroflóru, nám narástla v primokultivácii. Preto ich bolo potrebné odlíšiť a až potom sme ich mohli identifikovať. *S. pyogenes* vyžaduje na kultiváciu pôdy, ktoré sú obohatené krvou alebo sérom (Tille et al., 2014; Spellerberg, Brandt 2016).

4.3 Bacitracínový test

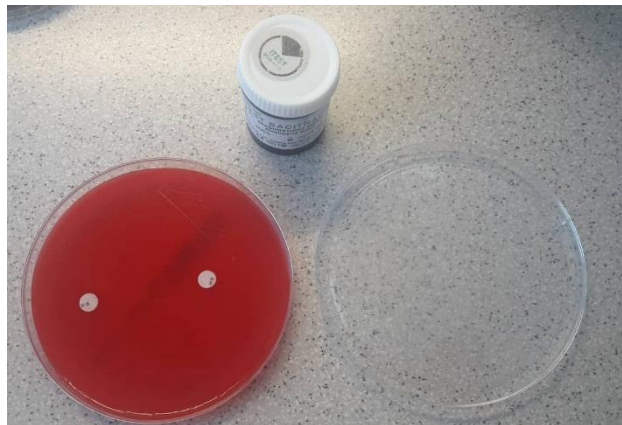
Na identifikáciu baktérie *S. pyogenes* pomocou bacitracínového testu bol použitý komerčne dodávaný set ITEST BACITRACIN S (0,04 IU).

Princíp testu:

Test využíva vysoké citlivosti β -hemolytických streptokokov skupiny A k nízkej koncentrácii bacitracínu (0,04), ktorá sa prejavuje vytvorením inhibičnej zóny okolo disku ITEST BACITRACIN S. Ostatné β -hemolytické streptokoky sú k tejto koncentrácii bacitracínu rezistentné.

Prevedenie testu:

Testovaný kmeň sme naočkovali bakteriologickou kľučkou na predsušený agar a sterilne sme priložili bacitracínový disk (obrázok 2). Následne došlo k inkubácii 17 - 24 hodín pri teplote 37°C.



Obrázok 2: Aplikácia diskov – bacitracínový test

Hodnotenie:

Po inkubácii sme zmerali presný priemer inhibičnej zóny okolo disku ITEST BACITRACIN S (tabuľka 1, obrázok 3; ITEST 2016).

Tabuľka 1: Hodnotenie testu ITEST BACITRACIN S

Priemer zóny (mm)	Výsledok
≥ 10	β -hemolytický <i>Streptococcus</i> skupina A (<i>S. pyogenes</i>)
< 10	β -hemolytický <i>Streptococcus</i> inej sérologickej skupiny



Obrázok 3: Pozitívny bacitracínový test pre identifikáciu baktérie *S. pyogenes*

4.4 PYR test

Na identifikáciu baktérie *S. pyogenes* pomocou PYR testu bol použitý komerčne dodávaný set ITEST PYR TEST.

Princíp testu:

Princípom testu je detekcia pyrrolidonylpeptidázovej (PYRáza) aktivity, ktorá je charakteristická pre všetky druhy enterokokov, na rozdiel od streptokokov sk. D, u ktorých táto aktivita nebola zistená. Z ostatných streptokokov PYRázu produkuje len *S. pyogenes* (GAS).

Pomôcky a reagenty:

- bakteriologická kľučka
- destilovaná voda
- disk ITEST PYR TEST

- farebná vývojka

Prevedenie testu:

Disk ITEST PYR TEST sme navlhčili 10 μ l sterilnej destilovanej vody. Bakteriologickou kľučkou sme preniesli na povrch disku 5 - 10 kolónií testovaného kmeňa z 24 hodinovej kultúry a ľahko ju rozotreli. Disk sme inkubovali 1 - 2 minúty pri laboratórnej teplote. Potom sme na disk kvapli 1 kvapku farebnej vývojky (musí mať laboratórnu teplotu!) a sledovali sme farebnú zmenu.

Hodnotenie:

Pri pozitívnej reakcii (PYRáza+) sa inokulovaná časť disku behom 1 minúty po aplikácii vývojky zfarbila ružovo, červeno alebo fialovočerveno. Pri negatívnej reakcii (PYRáza) zostala inokulovaná časť disku po aplikácii vývojky nezafarbená, poprípade sa behom 1 minúty sfarbí krémovo alebo žltlo (obrázok 4; Itest 2016).



Obrázok 4: ITEST PYR TEST – vľavo pozitívny výsledok, vpravo negatívny výsledok

4.5 Latexová aglutinácia

Na identifikáciu baktérie *S. pyogenes* pomocou testu latexovej aglutinácie sme použili komerčne dodávanú Latexovú súpravu Prolex™ Streptococcal Grouping (obrázok 5).

Princíp testu:

Prolex™ metóda identifikácie streptokokových skupín zahrňuje extrakciu skupinovo špecifických sacharidových antigénov s použitím špeciálne vyvinutých reagensí pre extrakciu kyselinou dusitou. Extrakčné reagensie 1 a 2 dodávané v súprave obsahujú chemické látky schopné extrahovať antigény špecifické pre streptokokové skupiny pri izbovej teplote. Extrakčná reagensia 3 obsahuje neutralizačný roztok. Neutralizované extrakty možno jednoducho identifikovať s použitím modrých latexových častíc senzibilizovaných čistenými skupinovo špecifickými králičími imunoglobulínmi. Tieto modré latexové častice silne aglutinujú v prítomnosti homológneho antigénu a neaglutinujú v prípade, že tento antigén nie je prítomný.

Reagensie a pomôcky:

- **Latexové reagensie:** Šesť fľaštičiek s kvapkadlom obsahujúcim 3ml modrých latexových častíc potiahnutých purifikovanými králičími protilátkami proti streptokokom skupiny A, B, C, D, F alebo G. Modré latexové častice sú suspendované v pufrí pH 7,4 obsahujúci 0,098% azid sodný ako konzervans.
- **Polyvalentná pozitívna kontrola:** Jedna fľaštička s kvapkadlom obsahujúca 2ml polyvalentných protilátok hotových k použitiu extrahovaných antigénov z inaktivovaných streptokokov skupín A, B, C, D, F a G podľa Lancefieldovej.
- **Extrakčná reagensia 1:** Jedna fľaštička s kvapkadlom obsahujúca 3,2ml reagensie s 0,098% azidom sodným ako konzervans.
- **Extrakčná reagensia 2:** Jedna fľaštička s kvapkadlom obsahujúca 3,2ml extrakčnej reagensie 2.
- **Extrakčná reagensia 3:** Dve fľaštičky s kvapkadlom, každá obsahujúca 8ml reagensie s 0,098% azidom sodným ako konzervans.
- Skúmavky
- Pasteurove pipety
- Stopky

Prevedenie testu:

Všetky súčasti súpravy musia byť pred použitím vytemperované na izbovú teplotu.

1. Latexové reagensie testu sme resuspendovali niekoľkokrát jemným prevrátením fľaštičky s kvapkadlom. Následne sme skontrolovali či sú latexové častice správne suspendované.
2. Pre každú vzorku sme označili jednu testovaciu skúmavku, do ktorej sme pridali 1 kvapku Extrakčnej reagensie 1.
3. Vybrali sme 1 - 4 β -hemolytické kolónie s použitím jednorazovej kľučky a suspendovali sme ich v Extrakčnej reagensii 1. Pokiaľ boli kolónie drobné použili sme väčšie množstvo až kým nedošlo k zakaleniu Extrakčnej reagensie 1.
4. Pridali sme 1 kvapku Extrakčnej reagensie 2 do každej skúmavky. Následne sme zamiešali reakciu poklepkávaním na skúmavku pomocou prstov po dobu 5-10 sekúnd.
5. Pridali sme 5 kvapiek Extrakčnej reagensie 3 do každej skúmavky a opäť sme ju zamiešali ako je uvedené v bode 4.
6. U každého testovaného izolátu sme naniesli jednu kvapku z každej modrej latexovej suspenzie na oddelené kruhy na testovacej kartičke.
7. S použitím Pasteurovej pipety sme naniesli jednu kvapku extraktu vedľa každej kvapky latexovej suspenzie. Premiešali sme latex a extrakt dodanou tyčinkou po celej oblasti testovacieho kruhu.
8. Jemne sme kartičku nakláňali tak, aby sa zmes pomaly prelievala cez celú testovaciu oblasť. Za jednu minútu pod normálnym osvetlením môžeme sledovať aglutináciu (obrázok 6).

Hodnotenie:

Pozitívne výsledky: Významne rýchla silná aglutinácia modrých latexových častíc do jednej minúty s jedným z latexových činidiel signalizuje špecifickú identifikáciu izolovaného streptokoka. Slabá reakcia s jednou latexovou reagensiou by sa mala opakovať s hustejším inokulom.

Negatívne výsledky: Žiadna aglutinácia latexových častíc. Pokiaľ sú náznaky granulácie viditeľné v testovacom kruhu, test by mal byť taktiež považovaný za negatívny.

Nepreukázateľné výsledky: Pokiaľ je v testovacom kruhu prítomné slabé zhlukovanie alebo nešpecifická reakcia (vláknitosť) po jednej minúte, musí byť test opakovaný za použitia čerstvej subkultúry. Pokiaľ pri opätovnom testovaní bude pozorovaný rovnaký výsledok, musí byť prevedené biochemické testovanie pre identifikáciu izolátu.

Nešpecifické výsledky: Vo vzácných prípadoch môžeme pozorovať aglutináciu s viac než jednou skupinou. Pokiaľ toto nastane, skontrolujeme čistú kultúru, ktorú sme použili na testovanie. Pokiaľ sa zdá byť čistá, znovu opakujeme test a potvrdíme identifikáciu izolátu pomocou biochemického testu (Prolex 2016)



Obrázok 5: Latexová súprava Prolex™ Streptococcal Grouping



Obrázok 6: Testovacia kartička latexovej aglutinácie

4.6 Identifikácia *Streptococcus pyogenes* analyzátorom MALDI Biotyper

Bruker Daltonik MALDI Biotyper je analyzátor (obrázok 7) poskytujúci identifikáciu bakteriálneho a mykotického infekčného materiálu. Pomocou tohto analyzátoru vieme identifikovať grampozitívne aj gramnegatívne baktérie, kvasinky a mnohobunkové huby. Nie je potrebná žiadna predchádzajúca identifikácia pomocou iných testov. Priamo z kultivačnej misky vieme získať výsledky a to v priebehu niekoľkých minút.



Obrázok 7: Analyzátor Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Princíp testu:

Identifikácia bakteriálneho alebo mykotického infekčného agens z čistej kultúry je cieľom tejto metódy. Ostreľovanie mikrobiálnej suspenzie laserovým lúčom, kde dochádza k uvoľneniu jednoduchých bielkovinových molekúl, ktoré letia v elektrickom poli v hlbokom vákuu je princípom vyšetrovacej metódy MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Čas, za ktorý molekula preletí letovou trubicou až k detektoru (Time of Flight = doba letu), závisí od pomeru hmotnosti a stupňa ionizácie molekúl. Počítač, ktorý vyhodnocuje časy doletu jednotlivých molekúl, vytvorí tzv. spektrum, ktoré prístroj porovnáva s knižnicou (databázou) spektier. Knižnica obsahuje výsledky, ktoré boli získané vyšetrením veľkého množstva tzv. typových kmeňov alebo kmeňov izolovaných z rôznych ochorení. Porovnaním s knižnicou mikroorganizmov dôjde k veľmi presnému určeniu izolovaného kmeňa. Knižnica je komerčne dostupná a je možné ju obohatiť o vlastné hmotnostné spektrá kmeňov, ktoré boli identifikované napr. najmä molekulárne genetickými metódami.

Prevedenie testu:

1. Na MALDI oceľovú doštičku do terčika sme inokulovali tenkú vrstvu kolónie pomocou špičky v našom prípade pomocou špáradla (obrázok 8).
2. 1 μ l roztoku MALDI matrice sme prekryli každý inokulovaný terčik.
3. Nechali sme všetko zaschnúť a vzorka tak bola pripravená k identifikácii.
4. Do prístroja MALDI Biotyper sme vložili doštičku a po vytvorení vákua (doba vytvorenia je cca 30 - 60s) sme spustili test.



Obrázok 8: Príprava MALDI doštičky

Príprava roztoku MALDI Matrice:

- 250 μ l organického rozpúšťadla HCCA sme pridali do tubičky s HCCA (alfa-cyano-4-hydroxycinnamicacid) a vortexovali až do úplného rozpustenia kryštálikov
- roztok sme uchovávali v tme pri izbovej teplote a po nariadení ho bolo potrebné čo najskôr spotrebovať

Príprava organického rozpúšťadla:

- 500 μ l 100% acetonitrilu
- 475 μ l destilovanej vody
- 25 μ l 100% triflóroctovej kyseliny (TFA)
- roztok sme si pripravili do Eppendorf tubičky a dôkladne sme ho premiešali

Hodnotenie testu:

Prvým krokom spracovania dát je prevedenie hmotnostných spektier na píky (obrázok 9). V druhom kroku sú tieto píky porovnávané so súborom vzoriek v databáze. Porovnávací algoritmus vypočíta tri samostatné hodnoty (skóre) pre tri základné charakteristiky vzorky

a referenčné spektrum. Hodnota skóre môže byť maximálne 3. Čím je vyššia hodnota skóre, tým je väčšia pravdepodobnosť správnej identifikácie druhu. Farebný display hodnoty skóre umožňuje rýchle vyhodnotenie výsledkov. Spôsob interpretácie výsledkov podľa farby aj s hodnotou skóre zobrazuje tabuľka 2. Hodnota skóre 2 môže byť považovaná za hodnotu, na základe ktorej je možné spraviť identifikáciu.

Tabuľka 2: Význam hodnôt skóre

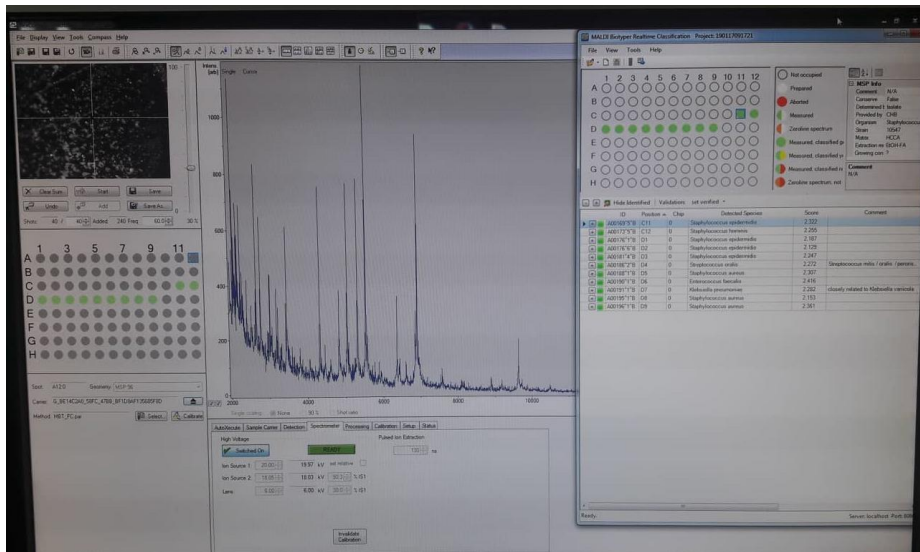
ROZSAH	POPIS	SYMBOLY	FARBA
2,300 – 3,000	druh bol s vysokou pravdepodobnosťou identifikovaný	(+++)	zelená
2,000 – 2,299	rod identifikovaný s istotou, druh pravdepodobne	(++)	zelená
1,700 – 1,999	pravdepodobná identifikácia rodu	(+)	žltá
0,000 – 1,699	nespoľahlivá identifikácia	(-)	červená

Na výsledkovom liste sa uvádzajú aj tzv. kategórie zhody (A, B alebo C), ktoré uvádzajú špecifickosť zhody druhu alebo rodu (A = druhová zhoda, B = rodová zhoda a C = žiadna zhoda; tabuľka 3).

Tabuľka 3: Význam konzistenčných kategórií (A-C)

KATEGÓRIE	POPIS
A	DRUHOVÁ KONZISTENCIA: Najlepšia zhoda bola klasifikovaná ako „zelená“. Ďalšie „zelené“ zhody patria ku rovnakému druhu ako prvé. Ďalšie „žlté“ zhody majú prinajmenšom zhodný rod s prvou zhodou.
B	RODOVÁ KONZISTENCIA: Najlepšia zhoda bola klasifikovaná ako „zelená“, alebo „žltá“. Ďalšie „zelené“, alebo „žlté“ zhody majú prinajmenšom zhodný rod s prvou zhodou. Podmienky druhovej konzistencie neboli naplnené.
C	ŽIADNA KONZISTENCIA: Nebola zistená žiadna konzistencia, druhová ani rodová (potreba kontroly, či nie je problém v synonymách skutočných názvov alebo či sa nejedná o mikrobiálnu zmes).

Pokiaľ sme postupovali správne, tak výsledný signál na obrazovke by mal vyzeráť nasledovne (obrázok 9). V tabuľke 4 sú uvedené záverečné výsledky identifikácie pomocou analyzátoru Bruker Daltonik MALDI Biotyper.



Obrázok 9: Výsledný signál na obrazovke

Tabuľka 4: Výsledky identifikácie pomocou analyzátoru Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Názov analytu	Kód analytu	Organizmus (najlepšia zhoda)	Skóre	Organizmus (druhá najlepšia zhoda)	Skóre
(+++) (A)	A00169^5^Biotyper	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,322	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,182
(++) (A)	A00173^5^Biotyper	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,255	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,001
(++) (B)	A00186^2^Biotyper	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,272	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,263

4.7 Disková difúzna metóda

Princíp testu:

Disková difúzna metóda je kvalitatívna metóda, ktorá sa používa na stanovenie citlivosti alebo rezistencie baktérií k antibiotikám. Bakteriálny izolát s určitou koncentráciou buniek, ktorý vyšetrujeme, je nanosený na kultivačné médium (agar), na ktorom sa vytvorí resp. nevytvorí zóna inhibície rastu okolo disku. Tento disk má presne stanovenú koncentráciu ATB, ktorý sa spolu s bakteriálnym izolátom inkubuje predpísanú dobu. ATB disky si vyberáme od druhu baktérie alebo druhu vzorky klinického materiálu. Veľmi významným je aj účel, pre ktorý bude výsledok citlivosti slúžiť. Používané sú aj disky so stabilnou zostavou, ktorá sa priebežne aktualizuje.

Prevedenie testu:

Pracovný postup obsahuje 4 základné kroky:

1. Príprava inokula
2. Inokulácia rozterom
3. Aplikácia diskov pomocou dispenzorov
4. Inkubácia

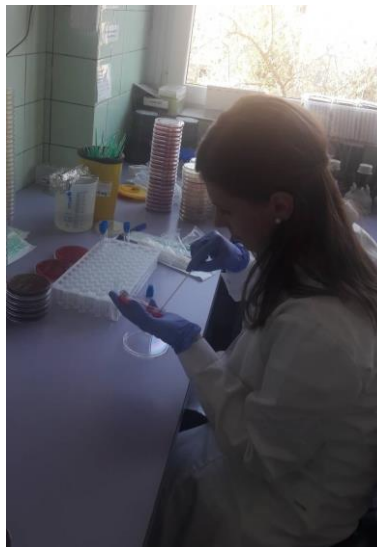
V termostate boli kultivačné média (Mueller-Hintonovej pôda s prímiesou 5% defibrinovaných ovčích erytrocytov) vyhriate na teplotu 37°C. Je to veľmi dôležité, aby baktérie neprešli teplotným šokom. Taktiež aj ATB disky boli vyhriate na izbovú teplotu. Z čistej kultúry testovaného kmeňa, ktorá nesmie byť staršia ako 24 hodín sme pripravili inokulum. To sme rozsuspendovali v sterilnej skúmavke obsahujúcej fyziologický roztok a vytvorili sme bakteriálnu suspenziu o objeme 2ml. Aby sme dosiahli homogénnu suspenziu bolo potrebné skúmavku zvertexovať. Pomocou prístroja denzitometer sme zmerali mieru zákalu inokula. Získaná hodnota sa pohybuje v určitom rozmedzí stupnice McFarlandovej.

V našom prípade sme potrebovali hodnotu 0,5 McFarlandovej zákalovej stupnice. Aby sme dosiahli túto hodnotu tak zákal sme mohli upraviť a to buď pridaním kultúry resp. riedením suspenzie fyziologickým roztokom (obrázok 10).



Obrázok 10: Príprava inokula

Inokulácia rozterom prebiehala tak, že sme kmene priamo naočkovali pomocou sterilnej bakteriologickej kľučky. Kmeň bol rozočkovaný najprv vertikálne a potom horizontálne na Mueller-Hintonovej pôdu s prídavkom 5% defibrinovaných ovčích erytrocytov (obrázok 11).



Obrázok 11: Inokulácia rozterom

Bakteriálnu suspenziu sme inokulovali do 15 minút od jej prípravy. Do 15 minút po naočkovaní sa kládli ATB disky, ktoré sme kultivovali v termostate do 15 minút od aplikácie diskov. Ide o pravidlo 15-15-15 minút, aplikácia diskov bola realizovaná pomocou dispenserov na kultivačné médium. Na každú Petriho misku s priemerom 90 mm bolo použitých 6 diskov, ktoré boli stabilnej zostavy, keďže išlo o grampozitívne baktérie (obrázok 12).

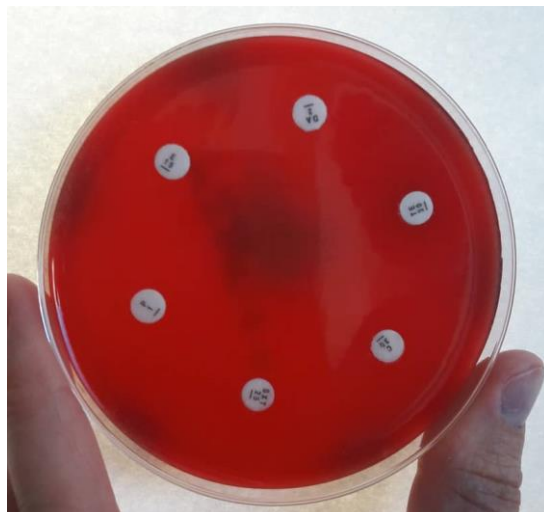


Obrázok 12: Aplikácia diskov pomocou dispenzorov

Petriho misky sme vložili do termostatu (do 15 minút po aplikácii diskov) viečkom dole, kde prebieha inkubácia pri teplote 36°C v CO₂ atmosfére (zlepšený rast) na 16 - 24 hodín.

Hodnotenie:

Po 16-24 hodinách inkubácie pri 36°C v CO₂ atmosfére sa hodnotia veľkosti inhibičných zón (obrázok 13). Pri interpretácii výsledkov sa vychádza z kritérií EUCAST, ktoré sú platné po celej Európe. Breakpointy (hraničné hodnoty) pri diskovej difúznej metóde sú vyjadrené priemerom inhibičných zón v mm. Porovnaním nami zmeranej inhibičnej zóny s breakpointom pre príslušné ATB zistíme či je kmeň na dané liečivo citlivý, rezistentný alebo intermediárne citlivý.



Obrázok 13: Hodnotenie veľkosti inhibičných zón

4.8 Fenotypový dôkaz rezistencie k makrolidovým antibiotikám

Dvojitou diskovou difúznou metódou sa testovala citlivosť *S. pyogenes* voči antibiotikám zo skupiny MLS_B (rezistencia voči makrolidom, linkozamidom a streptogramínom B). V nasledujúcej tabuľke 5 sú uvedené jednotlivé podmienky na detekciu MLS_B fenotypu.

Tabuľka 5: Podmienky na detekciu MLS_B fenotypu pomocou difúznej diskovej metódy

Pôda	Mueller-Hintonovej agar s 5% defibrinovanou ovčou krvou
Objem inokula	2-5 ml vo fyziologickom roztoku
Príprava inokula	priama metóda rozotrením kolónií z 18-24 hod. kultúry na krvnom agare
Koncentrácia inokula	0,5 podľa McFarlandovho zákalového stupňa (1×10^8 CFU/ml)
Disky	erytromycín, klindamycín, spiramycín
Inkubácia	36°C so zvýšenou tenziou CO ₂

Za účelom testovania citlivosti na antibiotiká zo skupiny MLS_B sa na platňu umiestnil disk s erytromycínom. Vo vzdialenosti 2cm od stredu erytromycínového disku sa umiestnil s klindamycínom a na opačnej strane erytromycínového disku vo vzdialenosti 2 cm disk so spiramycínom. Inkubácia prebiehala pri teplote 36°C v atmosfére so zvýšenou tenziou CO₂.

Výsledky diskového difúzneho testu sa získali odmeraním priemeru inhibičnej zóny (IZ) od okraja so zreteľnou inhibíciou rastu pomocou pravítka.

Na základe veľkosti inhibičných zón sa hodnotia výsledky difúzneho diskového testu (tabuľka 6). Kmene *S. pyogenes*, ktorých priemer dosiahol hodnotu inhibičnej zóny ≥ 21 mm v okolí disku s erytromycínom, sú citlivé; kmene *S. pyogenes* s priemerom inhibičnej zóny < 18 mm sú rezistentné a intermediárne citlivé sú tie kmene *S. pyogenes*, ktorých veľkosť inhibičnej zóny dosiahla 18 – 20mm. Veľkosť inhibičnej zóny ≥ 19 mm okolo disku

s klindamycínom je charakteristická pre citlivé kmene *S. pyogenes*. Priemer inhibičnej zóny s veľkosťou <19 mm je typický pre rezistentné kmene už spomínanej baktérie. Taktiež sa používa aj disk so spiramycínom, ktorý nám pomáha pri určení indukcie, ale hodnotenie samotného spiramycínu sa neuvádza. Občas je vhodné použiť aj disk s klindamycínom ako aj so spiramycínom, nakoľko niektoré kmene s génmi *ermA* vytvárajú inhibičné zóny iba v okolí klindamycínu a iné zasa len v okolí spiramycínu (Urbášková et al., 2007).

Disk s obsahom 100µg spiramycínu napomáha k odhaleniu indukcie a preto interpretácia výsledkov pre spiramycín sa neuvádza. Pri hodnotení výsledkov sa hodnotí deformácia IZ u klindamycínu a spiramycínu a v prípade prítomnosti svedčí o indukovanej rezistencii. Fenotyp indukovanej rezistencie môže vytvárať IZ buď len pre klindamycín, alebo len pre spiramycín a preto je vhodné okrem erytromycínu používať oba tieto disky (Urbášková et al., 2007).

Tabuľka 6: Hraničné priemery inhibičných zón (IZ) pre citlivé a rezistentné kmene *S. pyogenes*

Antibiotikum	Obsah disku (µg)	Hraničné priemery IZ pre citlivé kmene <i>S. pyogenes</i> (mm)	Hraničné priemery IZ pre rezistentné kmene <i>S. pyogenes</i> (mm)
Erytromycín	15	≥ 21	< 18
Klindamycín	2	≥ 17	< 17
Spiramycín	100	neudáva sa	neudáva sa

Dvojitou diskovou difúznou metódou s použitím erytromycínového a klindamycínového disku sa zisťuje tiež fenotyp rezistencie *S. pyogenes* k antibiotikám zo skupiny MLS_B a síce rezistencie vyvolanej metyláciou ribozómu. Ak je MLS_B typ rezistencie inducibilný, v dvojitom diskovom difúznom teste sa prejaví neprítomnosťou IZ v okolí erytromycínového disku a deformovanou IZ v okolí klindamycínu (D-zóna). V prípade konštitutívnej produkcie metylázy, vo výsledku dvojitého diskového difúzneho testu sa zaznamenáva neprítomnosť IZ v okolí oboch použitých antibiotických diskov. Fenotyp_M, charakterizovaný efluxom, je u streptokokov zapríčinený prítomnosťou génov *mef*. V dôsledku ich expresie dochádza k efluxu 14 a 15-členných makrolidov a azalidov z bunky, nie však linkozamidov a streptogramínu B. IZ v okolí disku s erytromycínom bude u kmeňov

s fenotypom M spadať do oblasti rezistencie, ale IZ v okolí diskov s klindamycínom a spiramycínom budú mať charakter citlivých kmeňov (tabuľka 7; Urbášková et al., 2007).

Tabuľka 7: Fenotypy rezistencie *S. pyogenes* na antibiotiká zo skupiny MLS_B na základe výsledkov diskovej difúznej metódy.





Fenotyp	Popis IZ	Obrázok
Citlivý	IZ v okolí diskov s ERY, CLI, SPI je väčšia alebo rovnaká ako limit pre citlivé kmene	
cMLS _B (konštitutívna rezistencia)	V okolí diskov s ERY, CLI, SPI nie je vytvorená žiadna IZ, alebo je menšia ako limit pre citlivé kmene	
iMLS _B (inducibilná / indukovaná rezistencia)	V okolí disku s ERY zvyčajne nie je IZ alebo je menšia ako limit pre citlivé kmene okolo CLI a SPI je deformovaná (Dzóna)	
M(eflux) M-makrolidová rezistencia	V okolí disku s ERY je IZ menšia ako limit pre citlivé kmene a v okolí CLI a SPI nie je IZ deformovaná a má priemer rovnaký alebo väčší ako je limit pre citlivé kmene	

Foto: autorka

cMLS_B – konštitutívny fenotyp rezistencie na makrolidy, linkozamidy a streptogramín B,

iMLS_B – inducibilný fenotyp rezistencie na makrolidy, linkozamidy a streptogramín B,

IZ – inhibičná zóna,

C – kmeň citlivý na antibiotikum,

D – deformovaná inhibičná zóna,

ERY – erytromycín,

CLI – klindamycín,

SPI- spiramycín

Pomocou dvojitej difúznej metódy je možné taktiež zistiť a vyhodnotiť fenotyp. Účinnosť antibiotík zo skupiny MLS_B „in vivo“ je možné predpokladať na podklade fenotypu rezistencie.

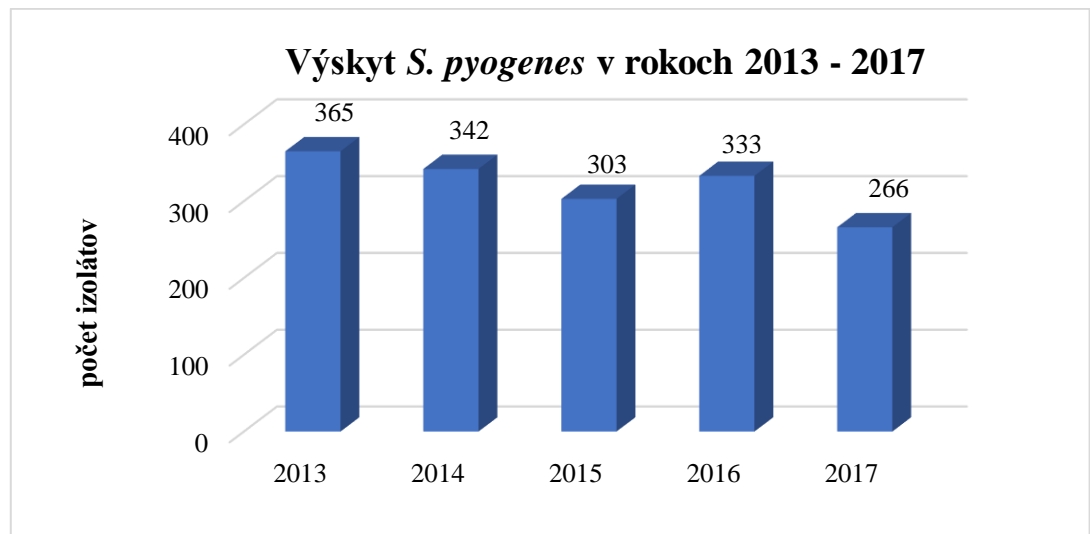
Kmene *S. pyogenes*, ktoré majú citlivý fenotyp, by mali byť „in vivo“ citlivé voči antibiotikám zo skupiny MLS_B. Kmene s inducibilným (iMLS) a konštitutívnym (cMLS) fenotypom sú naopak „in vivo“ voči antibiotikám zo skupiny MLS_B rezistentné. Pri M fenotype môžeme „in vivo“ pravdepodobne predpokladať rezistenciu na erytromycín, klaritromycín i azitromycín a citlivosť k spiramycínu, ako aj ku klindamycínu (Urbášková et. al., 2007).

5 VÝSLEDKY

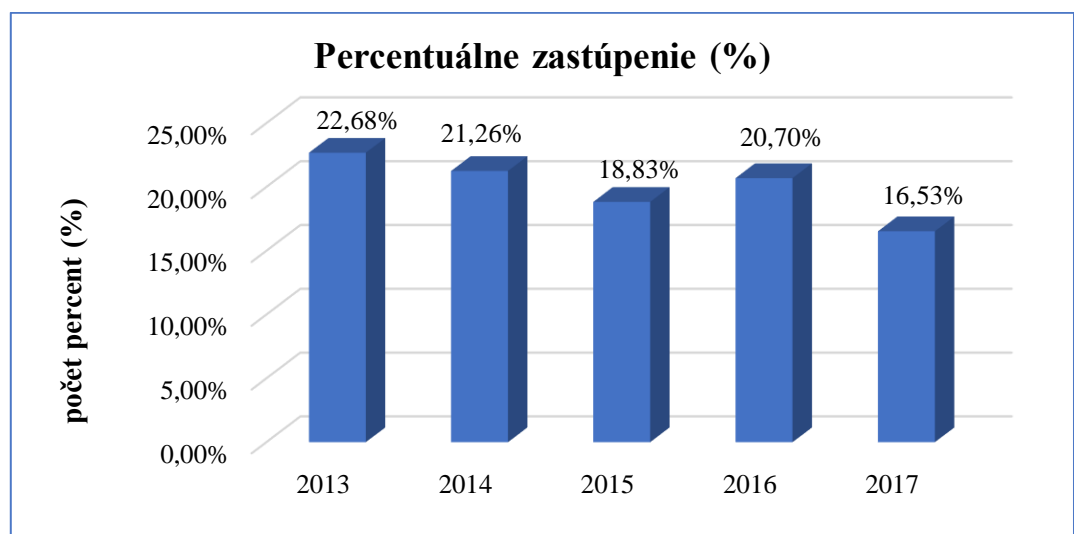
5.1 Výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* v priebehu rokov 2013 – 2017 vo FN HK

V rokoch 2013 – 2017 bolo na ÚKM FN HK izolovaných celkom 1609 kmeňov *S. pyogenes* (viď graf č. 1 a 2). Graf č. 2 približuje situáciu výskytu v percentách (%).

Graf 1: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v jednotlivých rokoch 2013 - 2017

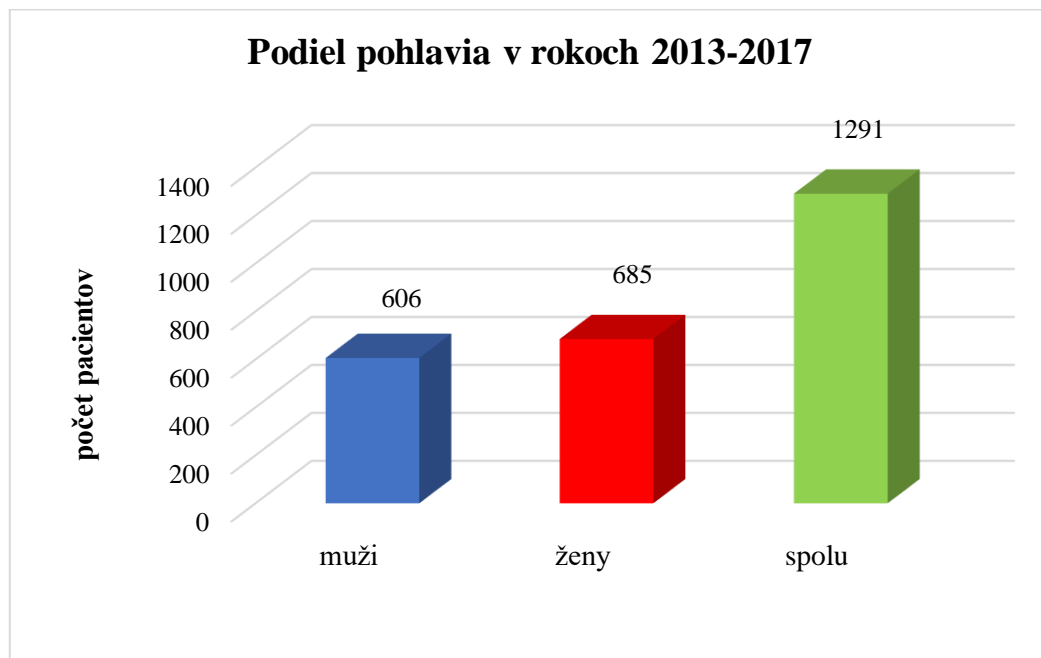


Graf 2: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* v rokoch 2013 – 2017 rozdelené v jednotlivých rokoch v percentách



Graf č. 3 znázorňuje výskyt izolovaných kmeňov *S. pyogenes* na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 s ohľadom na pohlavie a celkom u všetkých pacientov, ktorých bolo 1291.

Graf 3: Počet pacientov v rokoch 2013 - 2017 s identifikovaným kmeňom *S. pyogenes*



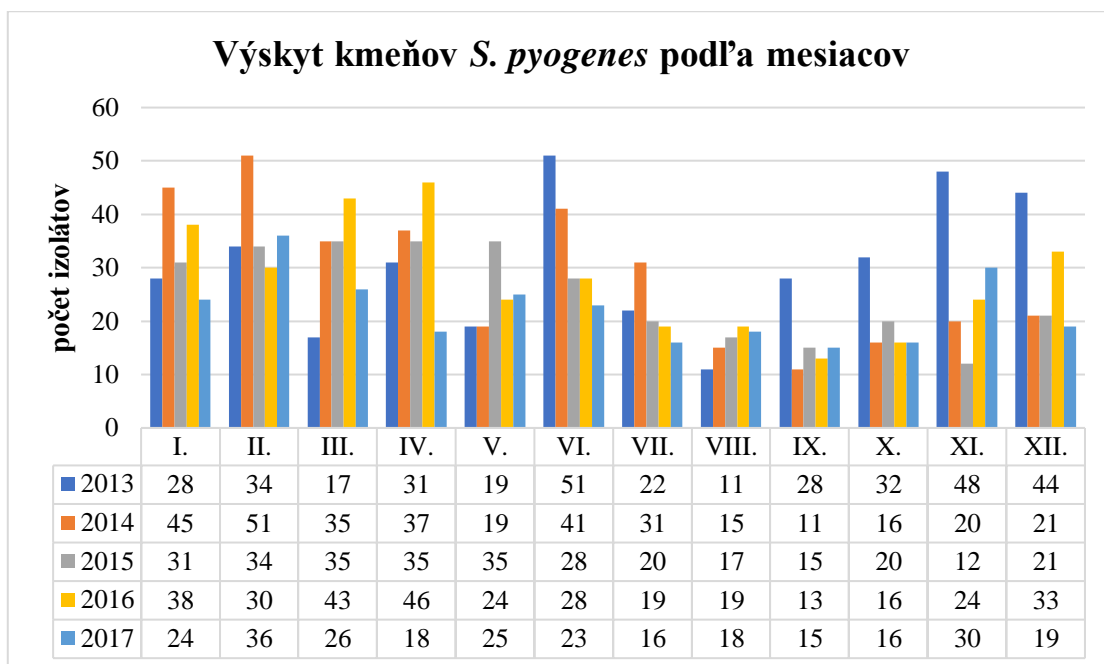
5.2 Výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 podľa jednotlivých mesiacov

Tabuľka č. 8 a graf č. 4 znázorňuje počty izolovaných kmeňov *S. pyogenes* v jednotlivých mesiacoch (ročných obdobiach) v rokoch 2013 – 2017.

Tabuľka 8: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 za jednotlivé mesiace

	MESIACE												SPOLU
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	
2013	28	34	17	31	19	51	22	11	28	32	48	44	365
2014	45	51	35	37	19	41	31	15	11	16	20	21	342
2015	31	34	35	35	35	28	20	17	15	20	12	21	303
2016	38	30	43	46	24	28	19	19	13	16	24	33	333
2017	24	36	26	18	25	23	16	18	15	16	30	19	266
SPOLU	166	185	156	167	122	171	108	80	82	100	134	138	1609

Graf 4: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017
za jednotlivé mesiace



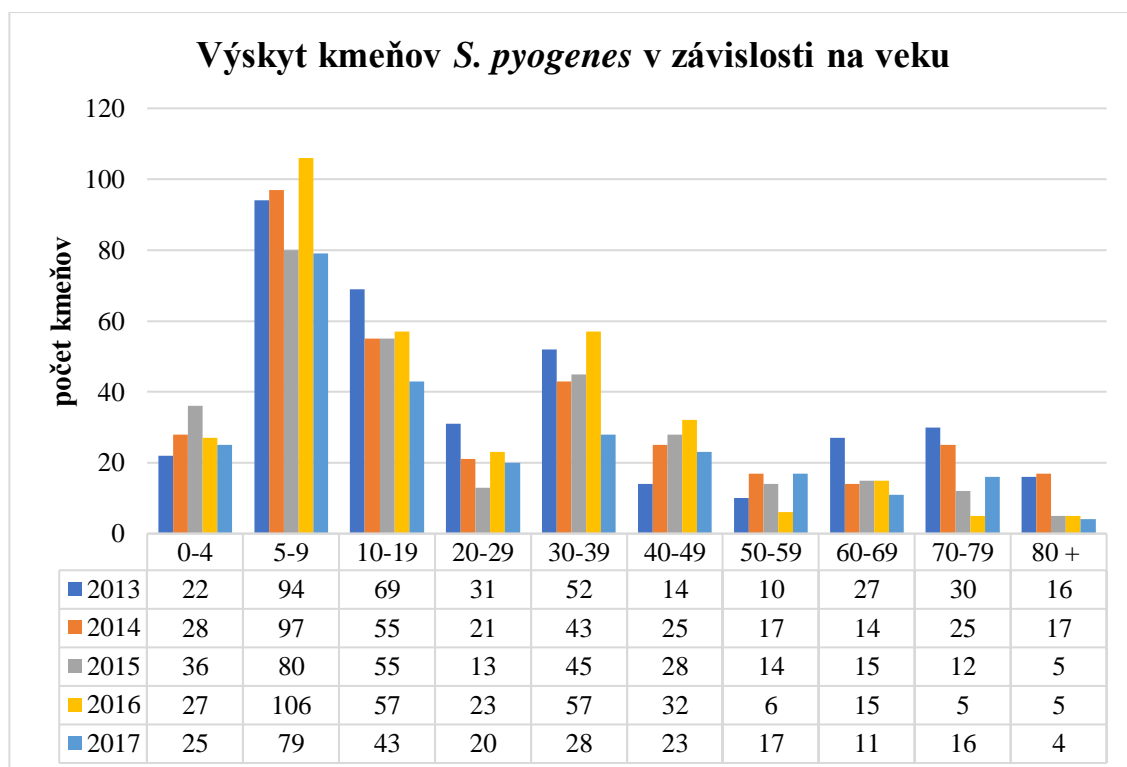
5.3 Výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 vo FN HK podľa vekových kategórií

V tabuľke č. 9 a v grafe č. 5 je znázornený výskyt kmeňov *S. pyogenes* v rokoch 2013 – 2017 izolovaných na ÚKM FN HK v závislosti na veku. Pacienti boli rozdelený do 10 vekových skupín: 0 až 4 rokov, 5 až 9 rokov, 10 až 19 rokov, 20 až 29 rokov, 30 až 39 rokov, 40 až 49 rokov, 50 až 59 rokov, 60 až 69 rokov, 70 až 79 rokov a nad 80 rokov.

Tabuľka 9: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 podľa vekových kategórií

	0-4	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80 +	SPOLU
2013	22	94	69	31	52	14	10	27	30	16	365
2014	28	97	55	21	43	25	17	14	25	17	342
2015	36	80	55	13	45	28	14	15	12	5	303
2016	27	106	57	23	57	32	6	15	5	5	333
2017	25	79	43	20	28	23	17	11	16	4	266
SPOLU	138	456	279	108	225	122	64	82	88	47	1609

Graf 5: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 v závislosti na veku



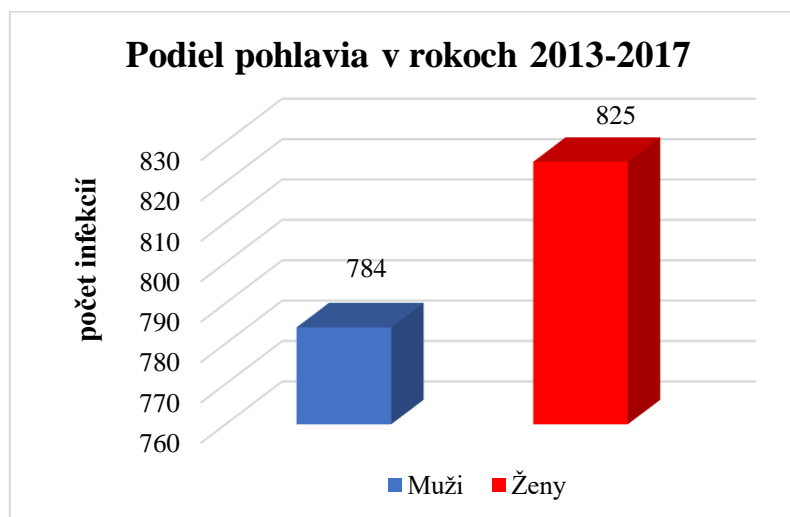
5.4 Výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 v závislosti od pohlavia

Tabuľka č. 10 a graf č. 6 približujú situáciu, kde počas piatich rokov bol kmeň *S. pyogenes* identifikovaný vo väčšej miere u žien ako u mužov.

Tabuľka 10: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017

rok	MUŽI	ŽENY	SPOLU
2013	181	184	365
2014	181	161	342
2015	145	158	303
2016	154	179	333
2017	123	143	266
SPOLU	784	825	1609

Graf 6: Počet mužov a žien v rokoch 2013-2017



5.5 Výskyt kmeňov *Streptococcus pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v priebehu rokov 2013 - 2017 v závislosti od miesta odberu

Tabuľka č. 11 znázorňuje miesto izolácie kmeňov *S. pyogenes* na ÚKM FN HK v priebehu rokov 2013 – 2017. Počas sledovaného obdobia bolo identifikovaných 1583 materiálov.

Tabuľka 11: Výskyt kmeňov *S. pyogenes* izolovaných na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017 v závislosti od miesta odberu

MIESTO ODBERU	MUŽI	ŽENY	SPOLU
KULTIVÁCIA			
- bronchoalveolárnej laváže	2	1	3
- hnisu	8	3	11
- kĺbneho punktátu	1	1	2
- pleurálneho výpotku	0	1	1
- punktátu (rameno, lakeť, pľuzgier)	6	2	8
- spúta	7	4	11
- tracheálneho aspirátu	5	2	7
- tekutých materiálov, tkanív a cudzoroďého materiálu	21	28	49
KULTIVÁCIA STERU			
- rán a z rôznych kožných defektov	107	78	185
- nešpecifikované	103	61	164
KULTIVÁCIA VÝTERU			
- z krku	469	551	1020
- z laryngu	23	26	49
- z oka	2	3	5
- zo zvukovodu	1	6	7
- z nasofaryngu	8	7	15
- z rekta	3	2	5
- z uretry	1	0	1
- z vagíny	0	32	32
- z abscesu	6	2	8
SPOLU	773	810	1583

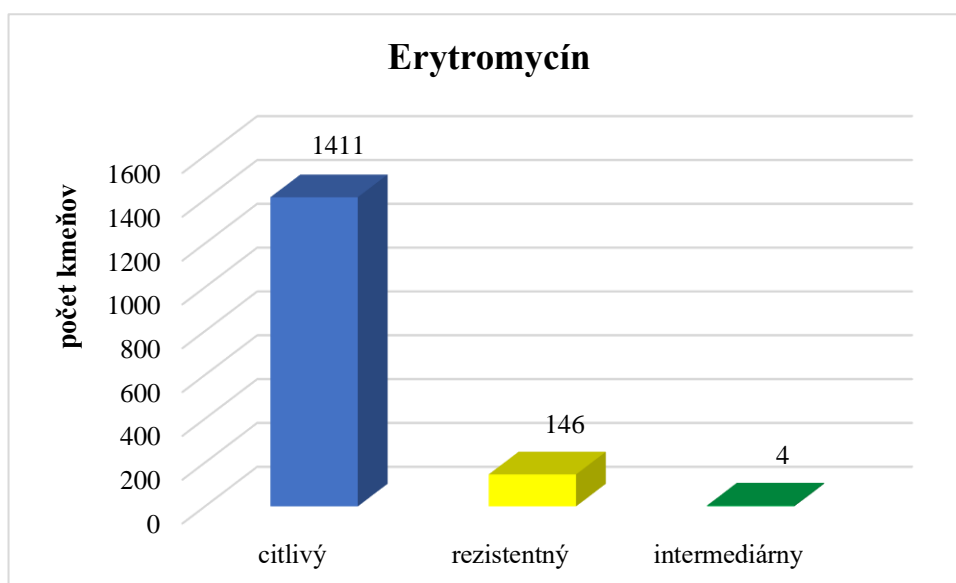
5.6 Vyhodnotenie citlivosti baktérie *Streptococcus pyogenes* na erytromycín na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017

Tabuľka č. 12 približuje citlivosť baktérie *S. pyogenes* na erytromycín, ktorý patrí medzi makrolidové antibiotiká, v priebehu rokov 2013 – 2017. Z údajov uvedených v tabuľke č. 12 bol zostrojený graf č. 7, kde sú uvedené hodnoty k jednotlivým typom citlivosti na erytromycín a graf č. 8 s percentuálnym vyhodnotením citlivosti na erytromycín.

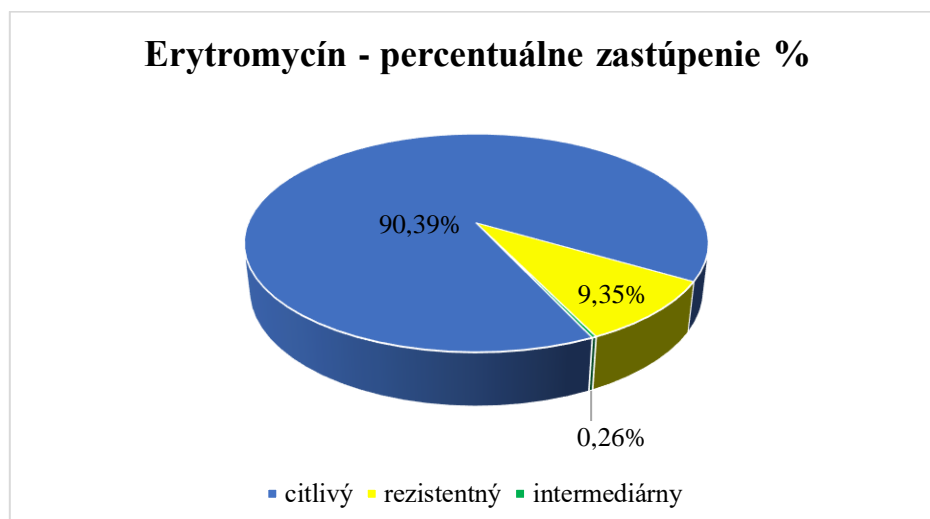
Tabuľka 12: Citlivosť baktérie *S. pyogenes* na erytromycín

ERYTROMY CÍN	celkový počet testov	počet citlivých kmeňov	počet rezistentných kmeňov	počet intermediárnych kmeňov
sledované obdobie	1561 (100,00%)	1411 (90,39%)	146 (9,35%)	4 (0,26%)
2013	339 (100,00%)	312 (92,04%)	27 (7,96%)	0 (0,00%)
2014	364 (100,00%)	328 (90,11%)	34 (9,34%)	2 (0,55%)
2015	293 (100,00%)	268 (91,47%)	24 (8,19%)	1 (0,34%)
2016	317 (100,00%)	289 (91,17%)	28 (8,83%)	0 (0,00%)
2017	248 (100,00%)	214 (86,29%)	33 (13,31%)	1 (0,40%)

Graf 7: Citlivosť baktérie *S. pyogenes* na erytromycín

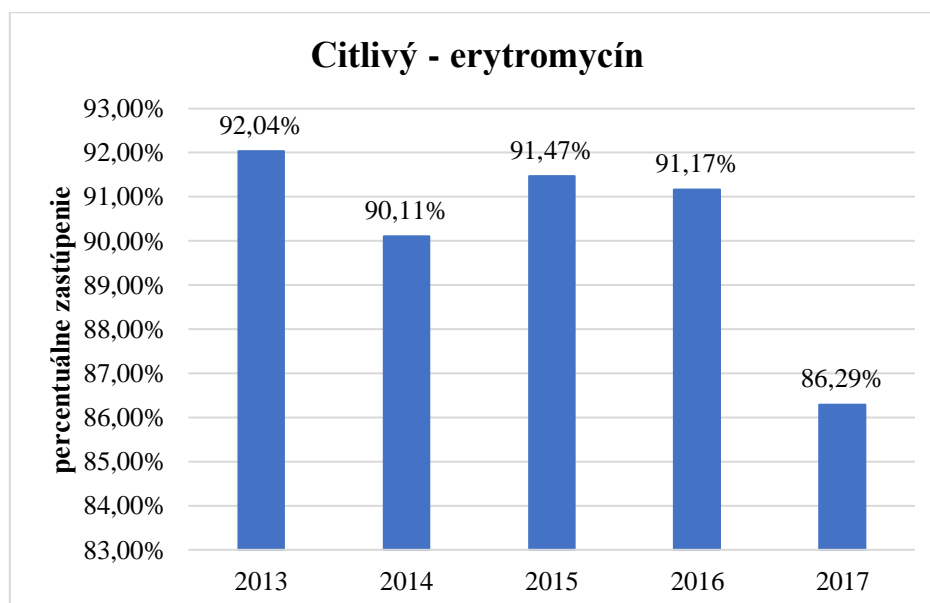


Graf 8: Percentuálne zastúpenie citlivosti baktérie *S. pyogenes* na erytromycín

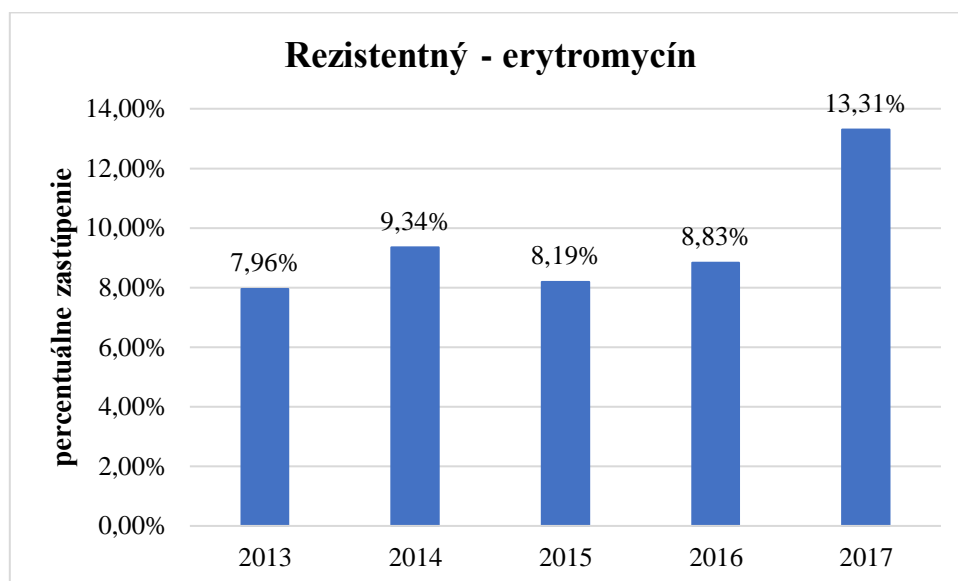


Graf č. 9 a graf č. 10 približujú percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* citlivých alebo rezistentných na erytromycín v rokoch 2013 – 2017 na ÚKM FN HK. Graf č. 11 vyjadruje trend vývoja citlivosti a rezistencie na erytromycín v jednotlivých rokoch 2013-2017. Skupina intermediárne citlivý na erytromycín sa z dôvodu malého zastúpenia (4 prípady) nebude v ďalších porovnaniach brať do úvahy.

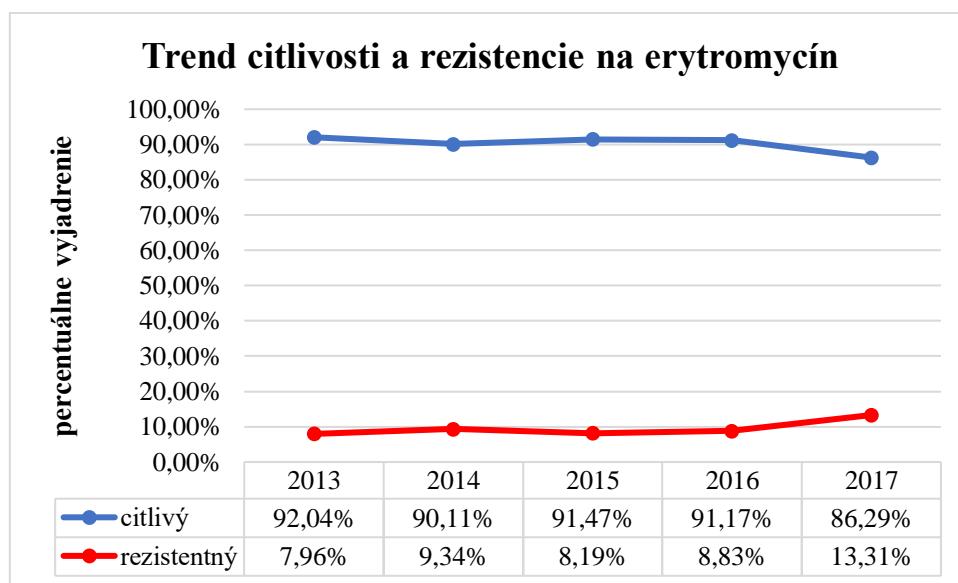
Graf 9: Percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* citlivých na erytromycín v rokoch 2013 – 2017



Graf 10: Percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* rezistentných na erytromycín v rokoch 2013 - 2017



Graf 11: Vývoj trendu citlivosti a rezistencie na erytromycín v rokoch 2013 – 2017



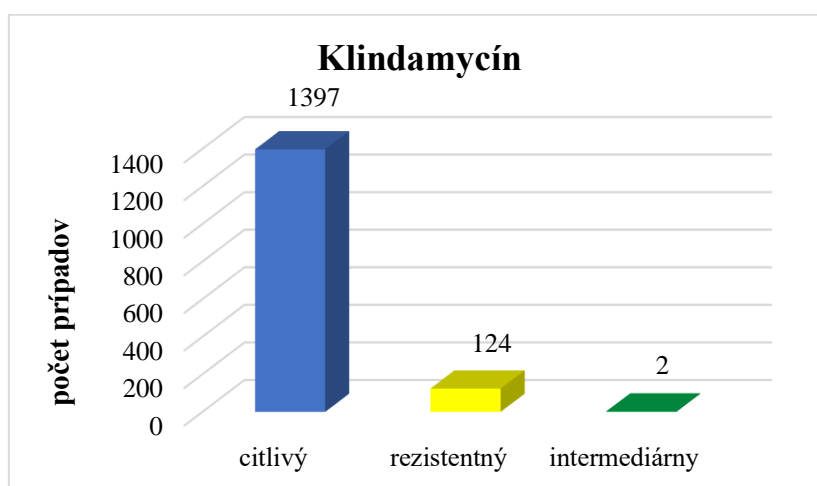
5.7 Vyhodnotenie citlivosti baktérie *Streptococcus pyogenes* na klindamycín na ÚKM FN HK v rokoch 2013-2017

Tabuľka č. 13 približuje citlivosť baktérie *S. pyogenes* na klindamycín, ktorý patrí medzi makrolidové antibiotiká, v priebehu rokov 2013 – 2017. Z údajov uvedených v tabuľke č. 13 bol zostrojený graf č. 12, kde sú uvedené hodnoty k jednotlivým typom citlivosti na klindamycín a graf č. 13 s percentuálnym vyhodnotením citlivosti na klindamycín.

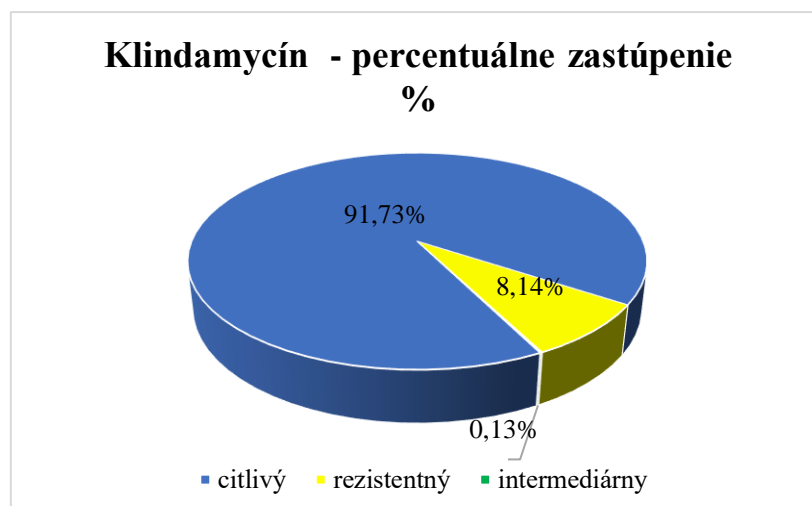
Tabuľka 13: Citlivosť baktérie *S. pyogenes* na klindamycín

KLINDAMYCÍN	celkový počet testov	počet senzitivných kmeňov	počet rezistentných kmeňov	počet intermediárnych kmeňov
sledované obdobie	1523 (100,00%)	1397 (91,73%)	124 (8,14%)	2 (0,13%)
2013	340 (100,00%)	317 (93,24%)	22 (6,47%)	1 (0,29%)
2014	325 (100,00%)	294 (90,46%)	30 (9,23%)	1 (0,31%)
2015	293 (100,00%)	273 (93,17%)	20 (6,83%)	0 (0,00%)
2016	317 (100,00%)	291 (91,80%)	26 (8,20%)	0 (0,00%)
2017	248 (100,00%)	222 (89,52%)	26 (10,48%)	0 (0,00%)

Graf 12: Citlivosť baktérie *S. pyogenes* na klindamycín

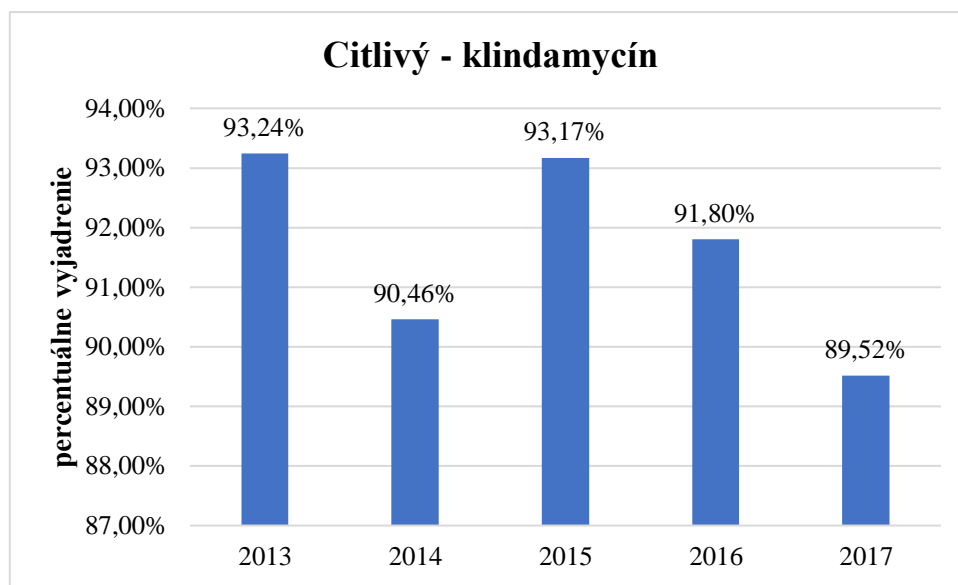


Graf 13: Percentuálne zastúpenie citlivosti baktérie *S. pyogenes* na klindamycín

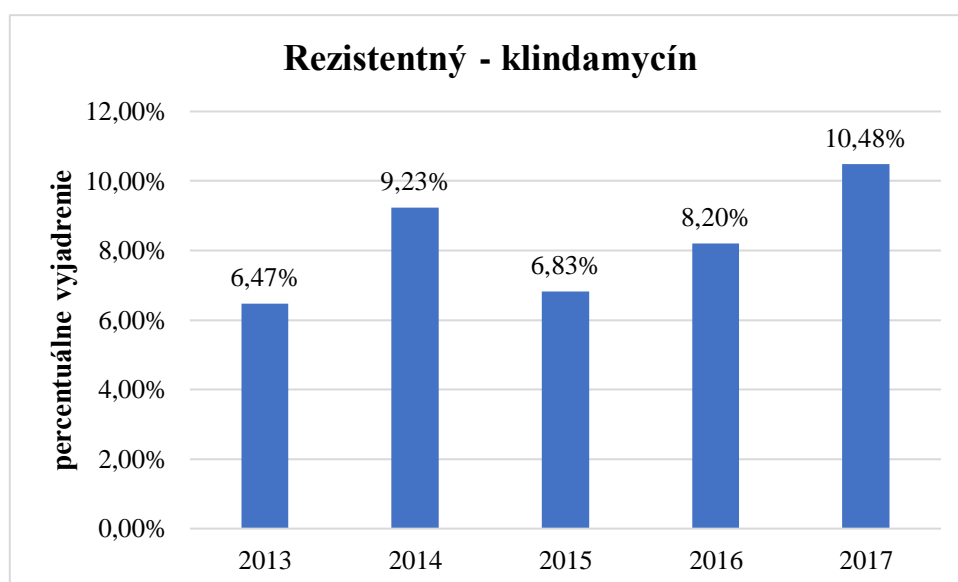


Graf č. 14 a graf č. 15 približujú percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* citlivých alebo rezistentných na klindamycín v rokoch 2013 – 2017 na ÚKM FN HK. Graf č. 16 vyjadruje trend vývoja citlivosti a rezistencie na klindamycín v jednotlivých rokoch 2013-2017. Skupina intermediárne citlivý na klindamycín sa z dôvodu malého zastúpenia (2 prípady) nebude v ďalších porovnaniach brať do úvahy.

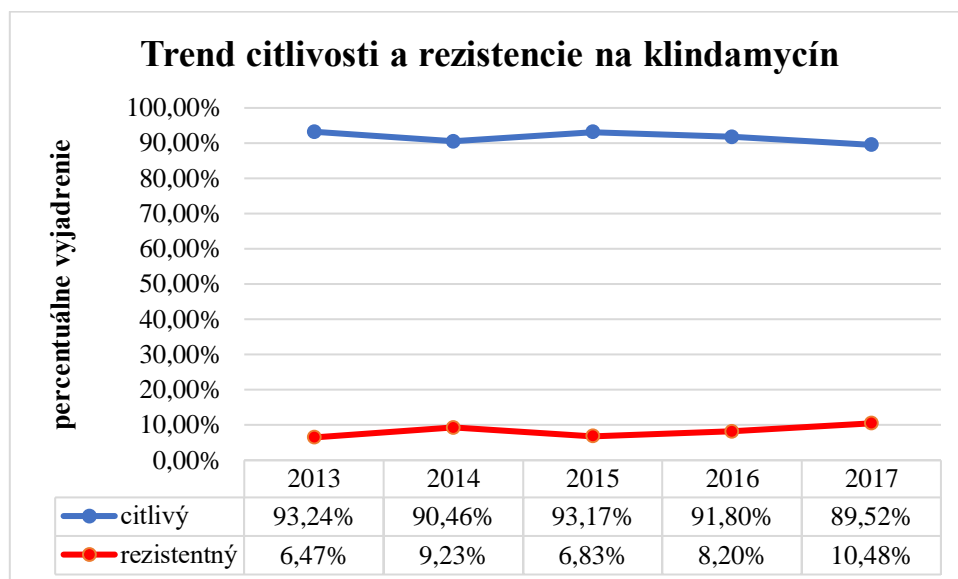
Graf 14: Percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* citlivých na klindamycín



Graf 15: Percentuálne zastúpenie kmeňov *S. pyogenes* rezistentných na klindamycín v rokoch 2013 - 2017



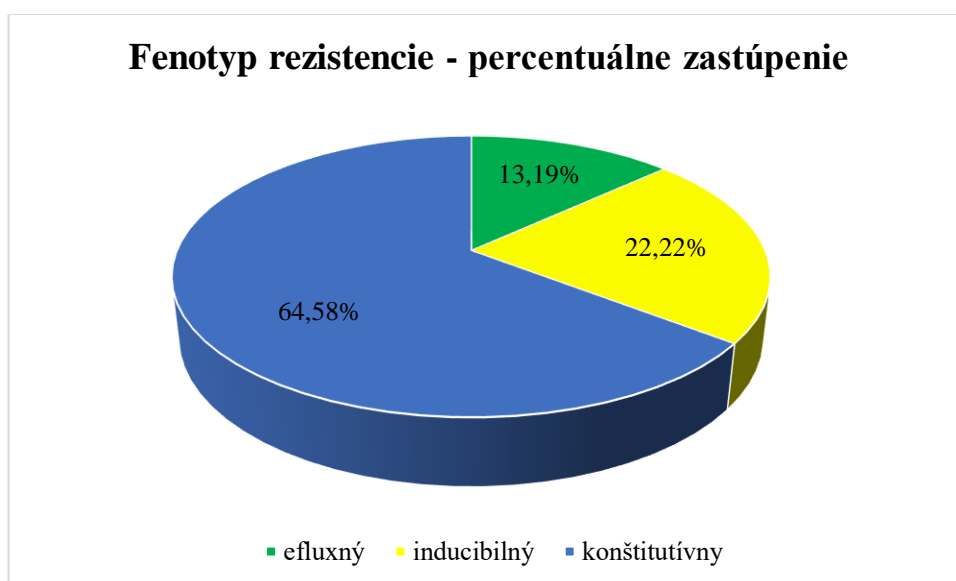
Graf 16: Vývoj trendu citlivosti a rezistencie na klindamycín v rokoch 2013 - 2017



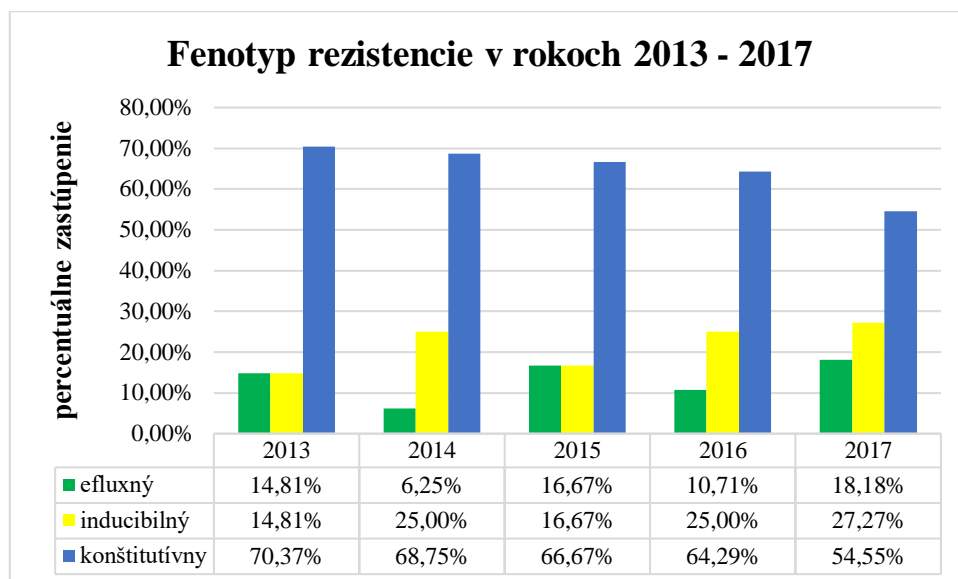
5.8 Fenotypový typ rezistencie v priebehu rokov 2013-2017 na ÚKM FN HK

Graf č. 17 zobrazuje percentuálne vyjadrenie u koľkých kmeňov *S. pyogenes* sa uplatňuje efluxný, indukibilný a konštitutívny typ rezistencie. Graf č. 18 približuje percentuálne fenotypovú rezistenciu v jednotlivých rokoch 2013 – 2017. Zo získaných údajov je možné pozorovať ako trend u všetkých troch fenotypov sa v jednotlivých rokoch 2013 – 2017 mení (viď graf č. 19).

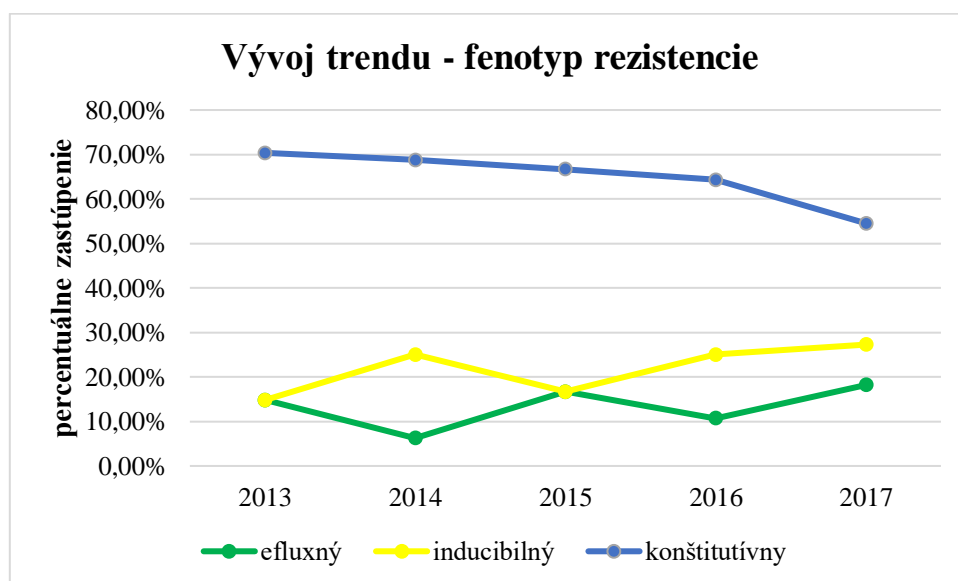
Graf 17: Percentuálne zastúpenie fenotypov rezistencie u izolovaných kmeňov *S. pyogenes* na ÚKM FN HK v rokoch 2013 - 2017



Graf 18: Percentuálne vyjadrenie fenotypovej rezistencie v jednotlivých rokoch
2013 – 2017



Graf 19: Vývoj trendu fenotypovej rezistencie u kmeňov *S. pyogenes*



6 DISKUSIA

Beta-hemolytické streptokoky skupiny A (GAS) sú jednou z hlavných príčin akútnych infekcií dýchacích ciest (Camara et al., 2013). Prevalencia invazívnych a neinvazívnych streptokokových infekcií sa v priebehu posledných desaťročí postupne zvýšila (Bhardwaj et al., 2018). Rezistencia na erytromycín bola prvýkrát zaznamenaná v roku 1955 a od tej doby sa celosvetovo zvyšuje. Podiel rezistencie na makrolidy a prevládajúci fenotyp sa v jednotlivých krajinách líši (Abraham, Sistla 2017).

Už v rokoch 1998 – 1999 Národné referenčné centrum pre sledovanie rezistencie spolu s 8 mikrobiologickými laboratórnymi pracoviskami v Slovenskej republike sledovali stav rezistencie kmeňov *S. pyogenes*. Výsledky sledovania ukázali závažnosť problematiky týkajúcej sa rezistencie na makrolidy u kmeňov *S. pyogenes* v Slovenskej republike. Rezistencia na makrolidy dosiahla hodnotu 6% (Langšádl et al., 2000). V sledovanom období od roku 2013 do roku 2017 bola rezistencia na makrolidy nasledovná (erytromycín 9,35% a klindamycín 8,14%).

V roku 2002 popísal Langšádl trend rezistencie kmeňov *S. pyogenes* u pacientov s akútnou tonzilitídou, ktorí boli liečení v komunite. Rezistencia vzrástla zo 4% v roku 1998 niekoľkonásobne na 26% len o 4 roky neskôr (Langšádl et al., 2000). V rokoch 2013 – 2017 na ÚKM FN HK (Česká republika) vzrástla rezistencia na erytromycín z 7,96% v roku 2013 na 13,31% v roku 2017. Rezistencia na klindamycín vzrástla zo 6,47% v roku 2013 na 10,48% v roku 2017.

V českej retrospektívnej štúdii, v ktorej boli hodnotené údaje zozbierané od roku 1994 do roku 1998, boli vyhodnotené výsledky mikrobiologických vyšetrení pacientov zaslané praktickými lekármi z Prahy. Bol stanovený celkový výskyt rezistencie kmeňov *S. pyogenes* k erytromycínu. Rovnako bol určený fenotyp *S. pyogenes* a pravdepodobný mechanizmus rezistencie (Jindrák et al., 1999).

V hore uvedenom období bolo vykonané bakteriologické vyšetrenie u 123 913 pacientov. Zo všetkých vzoriek biologického materiálu bolo zachytených 8108 kmeňov *S. pyogenes*. V našej práci bolo izolovaných 1583 kmeňov *S. pyogenes* od 1291 pacientov. V českej štúdii boli 4% kmeňov rezistentných k erytromycínu čo je v porovnaní s našou prácou (9,35%) rezistencia na erytromycín len o pár percent nižšia. Vo výteroch z krku a tonzíl bolo v českej retrospektívnej štúdii izolovaných 95% kmeňov. Zvyšné kmene boli izolované

z výterov z nosa, ucha a ostatného klinického materiálu. V našom súbore bolo najviac izolovaných kmeňov *S. pyogenes* kultiváciou výteru z krku a to až 64,43%, nasledovala kultivácia z rán a z rôznych kožných defektov (11,69%) a nešpecifikovaná kultivácia steru (10,36%). Zvyšné kmene boli izolované z ostatného klinického materiálu, ktorý dosahoval menej ako 10%. V českej štúdii bol popísaný postupný stúpajúci trend rezistencie v roku 1994 – 1%, v roku 1995 – 2%, v roku 1996 – 3%, v roku 1997 – 6% a nakoniec v roku 1998 – 9%. Na ÚKM FN HK bol trend rezistencie na erytromycín mierne kolísavý. V roku 2013 bolo izolovaných 7,96%, v roku 2014 – 9,34%, v roku 2015 – 8,19%, v roku 2016 – 8,83% a v poslednom sledovanom roku 13,31% rezistentných kmeňov. Najčastejším mechanizmom rezistencie v českej štúdii bol eflux s charakteristickým M fenotypom a rovnako to bolo aj v našom prípade, kde M fenotyp bol zastúpený v 64,58%. Väčšina pacientov patrila do vekovej kategórie 5 – 15 rokov v oboch štúdiách (Jindrák et al., 1999).

V diplomovej práci sme v súvislosti s tým zistili, že najviac vzoriek prišlo v rámci vekovej skupiny 5 – 9 rokov. Táto skupina tvorila až 28,34% zo všetkých sledovaných analýz. Hneď za ňou bola skupina detí od 10 – 19 rokov, ktorá predstavovala 17,34%. Ďalšie skupiny tvorili podstatne menší podiel zo všetkých sledovaných analýz: skupina 0 – 4 roky (8,58%), 20 – 29 rokov (6,71%), 30 – 39 rokov (13,98%), 40 – 49 rokov (7,58%), 50 – 59 rokov (3,98%), 60 – 69 rokov (5,10%), 70 – 79 rokov (5,47%) a posledná bola skupina nad 80 rokov (2,92%).

Zaujímavé sú taktiež výsledky štúdie SPICE (Susceptibility Pattern of the Isolates in Central, Eastern and Baltic European Countries). Táto štúdia prebiehala v období od novembra 2005 do decembra 2006 a zapojilo sa do nej osem európskych krajín vrátane Slovenska, Českej republiky, Maďarska, Poľska, Rumunska, Estónska, Lotyšska a Litvy. Hlavným cieľom tejto štúdie bolo získať informácie o výskyte rezistencie kmeňov *S. pyogenes* voči vybraným antimikrobiálnym látkam (penicilínu, cefotaxímu, ampicilínu, erytromycínu, levofloxacínu a klaritromycínu) vo vybraných krajinách (Gracia et al., 2009).

V tejto európskej porovnávacej štúdii bolo celkovo izolovaných 763 kmeňov *S. pyogenes*, zatiaľ čo v pozorovanom súbore na ÚKM FN HK v rokoch 2013 – 2017 bolo izolovaných 1609 kmeňov *S. pyogenes*. Izoláty v SPICE prieskume pochádzali v 60% od detí a v 40% od dospelých. Izoláty z ÚKM FN HK pochádzali vo väčšej miere od detí a to 52,27% a zvyšok tvorili dospelý, teda 47,73%. Vzorky získané od žien v tomto medzinárodnom prieskume tvorili 50%, od mužov 49% a v 1% nebolo pohlavie špecifikované.

Výskyt izolovaných kmeňov *S. pyogenes* v rokoch 2013 – 2017 na ÚKM FN HK sa v závislosti od pohlavia nemenil, keďže aj počet prijatých vzoriek bol približne u oboch pohlaví rovnaký. Počet vzoriek od žien bol 51,27% a od mužov 48,73%. S malým rozdielom prevažovali vzorky od žien. Najvyšší počet žien bol zaznamenaný v roku 2013 s počtom izolovaných kmeňov 22,30% a naopak najnižší počet žien bol v roku 2017 s počtom 17,33%. V rokoch 2013 a 2014 bol nahlásený rovnaký a zároveň najvyšší počet mužov 23,09% a v roku 2017 zase najnižší počet mužov 15,69%.

Citlivosť kmeňov bola testovaná voči vybraným β -laktámovým antimikrobiálnym látkam (penicilín, cefotaxim, amoxicilín) vo všetkých 8 krajinách. Citlivosť bola 100% pri všetkých izolovaných kmeňoch *S. pyogenes*. Avšak v priemere až 16% kmeňov bolo rezistentných voči makrolidovým antibiotikám (erytromycín, klaritromycín) s výraznými odlišnosťami medzi jednotlivými krajinami. V našich dátach bola celková rezistencia na erytromycín v sledovanom období 2013 – 2017 nižšia (9,35%) a na klindamycín taktiež nižšia, len 8,14%. Najnižšia rezistencia k makrolidovému radu antibiotík 4% bola zaznamenaná v Pobaltských krajinách (Estónsko, Lotyšsko, Litva), nasledovalo Rumunsko (8%), Poľsko (17%), Česká republika (20%) a Maďarsko (27%). Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná v tejto štúdii na Slovensku (34%). Priemerné hodnoty rezistencie na makrolidy v rokoch 2013 – 2017 získané v diplomovej práci sú najbližšie úrovni rezistencie v Rumunsku (8%) v rokoch 2005 – 2006 (Gracia et al., 2009).

Gracia a kol. v roku 2009 naznačujú, že dominantným fenotypom makrolidovej rezistencie bol cMLS_B typ zistený skoro v 60%, nasledovaný M fenotypom (25%) a s najnižšou prevalenciou bol iMLS_B fenotyp vyskytujúci sa v 16% prípadov. So 64,58% bol v našej práci najviac zastúpený M fenotyp, ďalej nasledoval iMLS_B s prevalenciou 22,22% a najmenej sa vyskytujúci bol cMLS_B typ (13,19%).

Štúdia Abrahama a Sistlu z roku 2018 obsahovala 206 izolátov GAS z rôznych klinických vzoriek odobratých počas 4 rokov. V našom prípade sme pracovali s 1583 izolátmi, ktoré boli odobraté počas 5 rokov (2013 – 2017). V spomínanej štúdii bola celková makrolidová rezistencia 53%, ktorá je veľmi vysoká v porovnaní s inými štúdiami. Izoláty rezistentné na klindamycín tvorili 33% a všetky vykazovali indukovateľnú rezistenciu. Miera rezistencie voči erytromycínu sa líši od nízkych po vysoké v rôznych geografických oblastiach. V štvorročnej monitorovacej štúdii uskutočnenej vo Veľkej Británii a Írsku v roku 2006 bola rezistencia na erytromycín zaznamenaná ako 10,8%, ktorá sa časom zvýšila (Brown et al., 2008). Na rozdiel

od toho v osemročnej štúdií zo severnej Indie sa uvádza, že rezistencia na erytromycín je iba 2,6% (Dhanda et al. 2013). Prevalencia makrolidovej rezistencie u GAS je nízka a obmedzená na určité geografické oblasti (Brown et al., 2008). Rezistencia na erytromycín v našej štúdií dosiahla 9,35% a rezistencia na klindamycín bola 8,14%.

V Európe najsevernejšie krajiny (s výnimkou Fínska) uviedli nízku úroveň makrolidovej rezistencie <4%, zatiaľ čo silná rezistencia bola zaznamenaná v stredomorských krajinách, ako je Taliansko (22,6%), Francúzsko (22,4%), Grécko (24,0%), Španielsko (21,3%) a Portugalsko (26,6%). Tieto hodnoty sú v protiklade s hodnotami Izraela (1,8%) a Iránu (0,2%; Rubio-López et al., 2012).

Štúdiá Brahmadatahana a kol., zahrňujúca 1313 izolátov GAS zozbieraných v rokoch 1986 - 2002, informovala o stálom zvyšovaní rezistencie na erytromycín. V rokoch 1986 – 1993 bola odolnosť voči erytromycínu 2,7%, v roku 1999 vzrástla na 5,8% a v roku 2002 dosiahla 13,8% (Brahmadathan, Anitha, Gladstone 2005). Naše výsledky potvrdzujú rovnaký stav, kedy sa rezistencia na erytromycín počas sledovaných rokov zvyšovala. V roku 2013 bola rezistencia 7,96%, v roku 2015 vzrástla na 8,19% a v roku 2017 dosiahla 13,31%. Podľa prieskumu rezistencie na antibiotiká v rokoch 2012 – 2014 zo 78 izolátov GAS bola rezistencia na erytromycín 76,3% (Torumkuney et al., 2016). Na rozdiel od uvedených zistení Ray a kol. oznámili, že rezistencia na erytromycín u GAS bola veľmi nízka a to 2,85% (Ray et al., 2016).

V štúdií Abrahama a Sistlu z roku 2018 prevládal fenotyp iMLS_B, ktorý tvorí 63% izolátov (Abraham and Sistla 2018). Prevalencia fenotypu iMLS_B bola hlásená aj z Nórska a Bulharska (Littauer et al., 2006). M fenotyp bol druhý najčastejšie sa vyskytujúci, čo predstavuje 37% izolátov (Abraham, Sistla 2018). Streptokoky M fenotypu boli hlásené z európskych krajín, Argentíny, USA a Kanady, kde prevalencia makrolidovej rezistencie je veľmi nízka (Rubio-López et al., 2012). Úplná neprítomnosť fenotypu cMLS_B opísaného v štúdií Abrahama a Sistlu z roku 2018 bola v protiklade s nálezmi z európskych krajín, kde je fenotyp cMLS_B bežný (Buter et al., 2010). V našej štúdií prevládal M fenotyp (64,58%). iMLS_B bol druhý najčastejšie sa vyskytujúci, ktorý predstavoval 22,22% a posledný bol cMLS_B s 13,19%.

V diplomovej práci bol najvyšší výskyt izolátov *S. pyogenes* v roku 2013 a to 22,68%. O 23 infekcií menej bolo v roku 2015, kde teda bolo zaznamenaných 21,26% z celkového počtu izolátov. V priebehu roka 2015 bolo nahlásených 18,83% a v roku 2016 20,70%. Najnižší počet prípadov (16,53%) bol v roku 2017. Zo získaných údajov je možné pozorovať ako trend

výskytu *S. pyogenes* v sledovanom období od roku 2013 do roku 2015 klesá, v roku 2016 sa mierne zvýši a v roku 2017 opäť klesá.

Zo získaných údajov je možné pozorovať, že počet infekcií závisel od ročného obdobia a s ním aj konkrétnych mesiacov. Najviac vzoriek bolo prijatých počas všetkých rokov v mesiaci február, kde išlo o 11,50%. Vysoké početné zastúpenie bolo aj v mesiacoch január, apríl a jún (vo všetkých troch prípadoch viac ako 10% z celkového počtu *S. pyogenes* v rokoch 2013 - 2017). Naopak najnižší bol v mesiacoch august (4,97%) a september (5,10%).

Výskyt baktérie *S. pyogenes* bol tiež ovplyvnený ročným obdobím. Pre jednotlivé mesiace roku 2013 bol výskyt nasledovný: najvyšší výskyt v tomto roku bol v mesiaci jún (13,97%), naopak najnižší bol v mesiaci august (3,01%). V roku 2014 bol najvyšší počet prípadov zaznamenaný v mesiaci február (14,91%). September bol mesiac, kedy bol najnižší výskyt *S. pyogenes* a to 3,22%. V roku 2015 bolo najviac infekcií zastúpených v troch mesiacoch marec, apríl a máj, kedy bola hodnota 11,55%, najmenej zastúpený bol v novembri, kedy tento počet tvoril iba 3,96%. Najväčší výskyt v roku 2016 bol v mesiaci apríl v počte 13,81%, najmenej prípadov baktérie bolo nahlásených v mesiaci september a to 3,90%. 13,53% izolátov v mesiaci február bolo nahlásených ako najväčší výskyt v roku 2017. Najnižší počet izolátov bol v mesiaci september (5,64%).

V diplomovej práci sme analyzovali aj fenotypový typ rezistencie v jednotlivých rokoch 2013 – 2017. M fenotyp prevládal hlavne v roku 2017 s prevalenciou 18,18% a naopak najnižšia prevalencia 6,25% bola v roku 2014. Počas sledovaného obdobia bol výskyt M fenotypu kolísavý. Najvyšší výskyt inducibilného fenotypu 27,27% bol opäť v roku 2017 a najmenší výskyt 14,81% v roku 2013. Inducibilný fenotyp v priebehu rokov postupne vzrastal. Prevládajúci konštitutívny fenotyp bol najvyšší v roku 2013 70,37% a najnižší v roku 2017 a to 54,55%. Konštitutívny fenotyp v rokoch 2013 – 2017 klesal.

7 ZÁVER

V posledných desaťročiach zvýšenie výskytu klinických izolátov *S. pyogenes* rezistentných na antibiotiká podčiarkuje potrebu nepretržitého sledovania antimikrobiálnej rezistencie.

Z výsledkov získaných z Ústavu klinickej mikrobiológie Fakultnej nemocnice Hradec Králové v priebehu rokov 2013 – 2017 vyplýva:

- Najvyšší výskyt izolovaných kmeňov *S. pyogenes* spomedzi sledovaných rokov bol v roku 2013 a to s počtom 365, čo predstavuje 22,68% z celkového sledovaného počtu 1609 izolátov. Najnižší výskyt s počtom 266, čo predstavuje 16,53% bol v poslednom roku sledovania 2017.
- Najvyšší výskyt izolovaných kmeňov *S. pyogenes* počas všetkých sledovaných rokov bol v mesiaci február (11,50%), najmenej izolátov bolo v auguste (4,97%).
- Najviac izolátov *S. pyogenes* bolo zaznamenaných vo vekovej skupine 5 – 9 rokov, kedy počet dosiahol hodnotu 456, čo predstavuje 28,34% z celkového počtu 1609 pozitívne identifikovaných kmeňov.
- Viac zastúpeným pohlavím v rámci sledovaných kmeňov boli ženy a to v 51,27%.
- Najviac sledovaných izolátov bolo získaných v 64,43% kultiváciou výteru z krku, kultivácia rán a z rôznych kožných defektov bola na druhom mieste s 11,69%. Ďalej nasledovala kultiváciu steru, ktorá dosiahla 10,36%, zvyšné percentá tvorili iné biologické materiály.
- V rámci testovania citlivosti a rezistencie izolovaného kmeňa *S. pyogenes* na erytromycín a klindamycín bola situácia nasledovná: Z 1561 izolátov bolo 90,39% citlivých na erytromycín, rezistentných v hodnote 9,35% a intermediárne citlivých len v 0,26% prípadov. Podobne to bolo aj u ďalšieho sledovaného antibiotika klindamycínu. Z 1523 izolátov bolo 91,73% citlivých, 8,14% rezistentných a intermediárne citlivých bolo 0,13%.
- Najčastejším prevládajúcim fenotypom rezistencie bol fenotyp M s prevalenciou 64,58%. Druhým najčastejším bol indukibilný fenotyp rezistencie s hodnotou 22,22%. Najmenej zastúpený 13,19% bol konštitutívny fenotyp.

Rezistencia na erytromycín a klindamycín pretrváva na vysokých úrovniach a môže sa pripísať nadmernému predpisovaniu a používaniu týchto antibiotík. Túto otázku je potrebné riešiť prioritnými a prísnyimi opatreniami, ktoré treba prijať na zastavenie ľahkej dostupnosti antibiotík nielen v zdravotníctve, ale aj pre iné odvetvia, ako sú veterinárne lekárstvo, potravinárstvo a poľnohospodárstvo.

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ABRAHAM, T.; SISTLA, S. Identification of Streptococcus Pyogenes - Phenotypic Tests vs Molecular Assay (Spy1258PCR): A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016. 10.7: DC01-3.
2. ABRAHAM, T.; SISTLA, S. Molecular Epidemiology of Macrolide Resistant Group A Streptococci from Puducherry, India. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2017. 11.9: 679 – 83.
3. ABRAHAM, T.; SISTLA, S. Trends in Antimicrobial Resistance Patterns of Group A Streptococci, Molecular Basis and Implications. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2018. 36.2: 186 – 91.
4. AMERI, G.A.A. - KOLAIBE, A.M.A. Identification and genotypic analysis of Streptococcus pyogenes isolated from pharyngitis and tonsillitis infected children in IMM city in Yemen. *In Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2015. 7.3: 158 - 162.
5. BÁLINT, O.; DOBIÁŠOVÁ, Z.; HOLEČKOVÁ, K. et al. *Infektológia a antiinfekčná terapia*. 2. preprac. a dopl. vyd. Martin: Osveta, 2007. 587 s. ISBN 80-8063-222-7.
6. BEDNÁŘ, M., aj. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Marvil, 1999. 164s. ISBN 80-238029-7-6.
7. BERWAL, A.; CHAWLA, S.; SHETTY, S. et al. Trend of Antibiotic Susceptibility of Streptococcus Pyogenes Isolated from Respiratory Tract Infections in Tertiary Care Hospital in South Karnataka. 2019. 11.1: 13 – 18.
8. BHARDWAJ, N.; MATHUR, P.; BEHERA, B. et al. Antimicrobial Resistance in Beta-Haemolytic Streptococci in India: A Four-Year Study. *The Indian Journal of Medical Research*, 2018. 147.1: 81 – 87.
9. BioVendor: Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit. *BioVendor: BioVendor* [online]. [cit. 17.03.2019].
Dostupné z WWW:
< <https://www.biovendor.cz/prolex-tm-streptococcal-grouping-latex-kit-modry-kompletni/p91.PL.030/#tab=downloads> >
10. BOWEN, A.; LILIEBRIDGE, R.; TONG, S. et al. Streptococcus Pyogenes Resistant or Susceptible to Trimethoprim - Sulfamethoxazole?. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012. 50.12: 4067 – 72.

11. BRAHMADATHAN, K. N., ANITHA, P.; GLADSTONE, P. Increasing Erythromycin Resistance among Group A Streptococci Causing Tonsillitis in a Tertiary Care Hospital in Southern India. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005. 11.4: 335 – 37.
12. BREIMAN, R.F.; BUTLER, J.C.; TENOVER, F.C. et al. Emergence of Drug-Resistant Pneumococcal Infections in the United States. *JAMA*, 1994. 271.23: 1831 – 1835.
13. BROWN, D. F. J.; HOPE, R.; LIVERMORE, D. et al. Non-Susceptibility Trends among Enterococci and Non-Pneumococcal Streptococci from Bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. 62.Supplement 2: ii75-ii85.
14. BUTER, CC.; MOUTON, JW.; KLAASSEN, CH. et al. Prevalence and molecular mechanism of macrolide resistance in beta-haemolytic streptococci in the Netherlands. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. 35: 590-2.
15. CAI, Z. et al. Applications of MALDI-TOF Spectroscopy. 1 st ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. 215 p. ISBN 978-3-642-35664-3.
16. CAMARA, M.; DIENG, A.; BOYE, C. Antibiotic Susceptibility of Streptococcus Pyogenes Isolated from Respiratory Tract Infections in Dakar, Senegal. *Microbiology Insights*, 2013. 6:MBI.S12996.
17. CAVAGNARO S. M., F.; AIRD G., A.; HARWARDT R., I. et al. Benign Acute Childhood Myositis: Clinical Series and Literature Review. *Revista Chilena de Pediatría*, 2017. 88.2: 268 – 74.
18. COMPTON, S.; KANIA, S.; ROBERTSON, A. et al. Evaluation of Pyrrolidonyl Arylamidase Activity in Staphylococcus Delphini. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017. 55.3: 859 – 64.
19. ČEŠKA, R. et al. Interna. 1. vyd. Praha: Triton, 2010. 855 s. ISBN 978-80-7387-423-0.
20. DHANDA, V.; CHAUDHARY, P.; TOOR, D. et al. Antimicrobial Susceptibility Pattern of Betahaemolytic Group A, C and G Streptococci Isolated from North India. *Journal of Medical Microbiology*, 2013. 62.PART3: 386 – 93.
21. EDELSTEIN, P.H. Streptococcal Macrolide Resistance of Streptococci. Importance of Macrolide Resistance of Streptococci. 2003
Dostupné z WWW:
<http://www.ups.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/macrolideres.html>

22. EUCAST: Disk diffusion methodology. *EUCAST: EUCAST* [online]. [cit.27.03.2019].
Dostupné z WWW:
<http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/>
23. FERRETTI, J.J.; STENENS, D.L.; FISCHETTI, V.A. Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations, Oklahoma: University of Oklahoma, 2016. 738 p.
Dostupné z WWW:
< <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-17cldq8tg0448.hanproxy.cvtisr.sk/books/NBK374206/>>. ISSN 1663-9812.
24. FERRETTI, J.; KÖHLER, W. 2016. *History of Streptococcal Research*. University of Oklahoma Health Sciences Center. Retrieved March 7, 2019
Dostupné z WWW:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866232>>
25. FERZLI, G.; SUKATO, D.; MOURAD, M. et al. Aggressive Necrotizing Fasciitis of the Head and Neck Resulting in Massive Defects. *Ear, Nose & Throat Journal*, 2019. 014556131983978.
26. GERA, K.; McIver, K. Laboratory Growth and Maintenance of Streptococcus Pyogenes (the Group A Streptococcus, GAS). *Current Protocols in Microbiology*, 2013. 30: Unit 9D.2.
27. GAZZANO, V.; BERGER, A.; BENITO, Y. et al. Reassessment of the Role of Rapid Antigen Detection Tests in Diagnosis of Invasive Group A Streptococcal Infections. *In Journal of Clinical Microbiology*, 2016. 54.4: 994 – 99.
28. GRACIA, M.; DIAZ, C.; CORONEL, P. et al. Antimicrobial susceptibility of STREPTOCOCCUS PYOGENES on Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the ceftidoren surveillance program. Granada, Madrid, Spain. *Elsevier*, 2009. 64.1: 52 - 56.
29. GREENWOOD, D.; PEUTHERER, J. F. Medical Microbiology. 16. vyd. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002. 728 s. ISBN 0-443-07078-4.
30. GUTMANN, L.; TOMASZ, A. Penicillin-Resistant and Penicillin-Tolerant Mutants of Group A Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1982. 22.1: 128 – 36.
31. HARTMAN-ADAMS, H.; BANVARD, C.; JUCKETT, G. Impetigo: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 2014. 90.4: 229 – 35.
32. HORN, D.; ZABRISKIE, R.; AUSTRIAN, R. et al. Why Have Group A Streptococci Remained Susceptible to Penicillin? Report on a Symposium. *Clinical Infectious Diseases*, 1998. 26.6: 1341 – 45.

33. ITEST: BACITRACIN S (0,04 j.). *ITEST: ITEST* [online]. [cit. 08.03.2019].
Dostupné z WWW:
< <https://www.itest-plus.cz/itest-bacitracin-s.html> >
34. ITEST: PYR TEST. *ITEST: ITEST* [online]. [cit. 08.03.2019].
Dostupné z WWW:
<<https://www.itest-plus.cz/itest-pyr-test.html>>
35. JINDRÁK, V.; HENYŠOVÁ, J.; VANIŠ, J. et al. Rezistencia *Streptococcus pyogenes* k erytromycinu jako regionální problém. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 1999. 7. 237 - 242.
36. KOLUKIRIK, M.; YILMAZ, M.; INCE, O. et al. Development of a Fast and Low-Cost QPCR Assay for Diagnosis of Acute Gas Pharyngitis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2016. 15.1: 1 – 6.
37. KOZŁOWSKA, D.; MYŚLIWIEC, H.; KILUK, P. et al. Clinical and Epidemiological Assessment of Patients Hospitalized for Primary and Recurrent Erysipelas. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2016. 70.4: 575 – 84.
38. KUMAR, P.; CLARK, M. L. Kumar and Clark's Clinical Medicine. 8. vyd Elsevier Ltd., 2012. 1304 s. eISBN: 9780702044991.
Dostupné z WWW:
<www.elsevier-etextbooks.com/boojshelf>.
39. LABOKLIN: Mikrobiologia. *LABOKLIN: LABOKLIN* [online]. [cit. 17.11.2018].
Dostupné z WWW:
<https://sk.laboklin.info/wp-content/uploads/LA_Mikrobiologia.pdf>
40. LANGŠÁDL, L.; KRČMÉRY, V.; BENČATOVÁ, A. et al. Rezistencia kmeňov *Streptococcus pyogenes* na makrolidové antibiotiká v Slovenskej republike v rokoch 1998-1999. *Lekársky Obzor*, 2000. 49. 189 - 194.
41. LEYRO, J. History of *Streptococcus pyogenes*. 2008. 1 - 5.
Dostupné z WWW:
<http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2008/cluster7/leyro_jasmine.pdf>
42. LEUNG, T., HON, K.; LEUNG, A. Group a *Streptococcus* Disease in Hong Kong Children: An Overview. *Hong Kong Medical Journal*, 2018. 24.6: 593 – 601.
43. LITTAUER, P.; CAUGANT, D.; SANGVIK, M. et al. Macrolide-Resistant *Streptococcus Pyogenes* in Norway: Population Structure and Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. 50.5: 1896 – 99.

44. MALHOTRA-KUMAR, S.; WANG, S.; LAMMENS, C. et al. Bacitracin-Resistant Clone of Streptococcus Pyogenes Isolated from Pharyngitis Patients in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. 41.11: 5282 – 84.
45. MARTINS, L.; ANJOS, M.; MACRONDES, M. et al. Review Case Report Article Streptococcal Acute Pharyngitis. *Sirf Copy Paste*, 2014. 47.May: 409 – 13.
46. MARCIS, M.; HARTMANN, N.; MURRAY, B, et al. *Pediatr Infect Dis J*. Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. 1998.
47. MURRAY, P. R.; PFALLER, M. A. - ROSENTHAL, K. S. *Medical Microbiology*. 7. vyd. Philadelphia: Elseviers/Saunders, 2013. 874 s. ISBN 978-03-230-8692-9.
48. MURRAY, P.; BARON, E.; JORGENSEN, J. et al. Streptococcus Laboratory General Methods. *Manual of Clinical Microbiology*, 2014. 1–69.
49. PARIJA, S.CH. *Textbook of Microbiology & Immunology*. 1st ed. Haryana: Rajkamal Electric Press, 2009. 700 p. ISBN 978-81-312-2163-1.
50. PEREIRA, L. Impetigo - Review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2014. 89.2: 293 – 99.
51. RAY, D.; SAHA, S.; SINHA, S. et al. Molecular Characterization and Evaluation of the Emerging Antibiotic-Resistant Streptococcus Pyogenes from Eastern India. *BMC Infectious Diseases*, 2016. 16.1: 753.
52. RUBIO-LÁPEZ, V.; VALDEZATE, S.; ÁLVAREZ, D. et al. Molecular Epidemiology, Antimicrobial Susceptibilities and Resistance Mechanisms of Streptococcus Pyogenes Isolates Resistant to Erythromycin and Tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiology*, 2012. 12.
53. RUSSELL, W.; HERWALD, H. Horizontal and Vertical Gene Transfer: The Life History of Pathogens. 2005 (12). Karger. 255-271.
54. SHANG, S.; ZHANG, R.; HOU, Z. Necrotizing Fasciitis—A Catastrophic Complication Following Routine Tibia Fracture Surgery A Case Report and Literature Review. 2017. 23.November 2016:.
55. SHELYAKIN, P.; BOCHKAREVA, O.; KARAN, A. et al. Micro-Evolution of Three Streptococcus Species: Selection, Antigenic Variation, and Horizontal Gene Inflow. *BMC Evolutionary Biology*, 2019. 19.1: 83.
56. SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. *Príručka na praktické cvičenia z mikrobiológie*. 2. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2010. 164 s. ISBN 978-80-223-2808-1.

57. SIVANESAN, K.; SINGH, M.; BURCH, D. Puerperal Group A Streptococcus Infection. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2010. 281.1: 135 – 36.
58. SMITH, J.; HORRALL, S.; JUERGENS, A. et al. Total Body Necrotizing Fasciitis. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 2018. 32.1: 61 – 62.
59. SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. 2016 *Laboratory Diagnosis of Streptococcus Pyogenes (Group A)*. University of Oklahoma Health Sciences Center. 2016 Retrieved April 15, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866238>).
60. STEVENS, D.L.; KAPLAN, E.L. Streptococcal Infections. Streptococcal infections, clinical aspects, microbiology a molekular pathogenesis. New York, New York, USA: Oxford University Press. 2010. 19 - 152.
61. STEVENS, D.; BRYANT, A. Impetigo, Erysipelas and Cellulitis. *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, 2016. 1 – 18.
62. SZÚ: Bujónová mikrodiluce návod k odečítaní EUCAST. SZÚ: SZÚ [online]. [cit. 15.02.2019].
Dostupné z WWW:
<http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/MIC/Navod_k_odecitani_BMD_v_1.0_2019.pdf>
63. TAEK, S.K.; KYUNGHOO LEE, M.D.; YUN JI HONG, M.D. et al. MALDI-TOF MS: Its Application in the Clinical Laboratory and a Paradigm Shift in Clinical Microbiology. *In Laboratory Medicine Online*, 2015. 5.4: 176 - 87.
64. TANG, S.; COWEN, U.; FADER, R. et al. Diagnosis and Antibiotic Treatment of Group a Streptococcal Pharyngitis in Children in a Primary Care Setting: Impact of Point-of-Care Polymerase Chain Reaction. *BMC Pediatrics*, 2019. 1 – 8.
65. TERAON, Y. The Virulence Factors and Pathogenic Mechanisms of Streptococcus Pyogenes. *Journal of Oral Biosciences*, 2012. 54.2: 96 – 100.
66. TILLE, P.M et al. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th ed. St. Louis : Mosby, 2014. 1056 p. ISBN 978-0-323-08330-0.
67. TORUMKUNEY, D.; CHAIWARITH, W.; REECHAIPICHI, W. et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2012-14 in Thailand, India, South Korea and Singapore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016. 71. i3–i19

68. URBÁŠKOVÁ, P.; JAKUBU, V.; METLER, O. Streptokoky - prukaz fenotypu rezistence k antibiotikum ze skupiny makrolidu, linkosamidu a streptograminu B.[online]. Praha: Státní zdravotní ústav. 2007[cit. 15.02.2019]. Dostupné z WWW:
<<http://www.szu.cz/streptokoky-prukaz-fenotypu-rezistence-k-antibiotikum-ze?highlightWords=prukaz+fenotypu+rezistence+antibiotikum+skupiny+makrolidu>>.
69. VORALDO, P. E.; MONTANARI, M. P.; GIOVANETTI, E. Genetic Elements Responsible for Erythromycin Resistance in Streptococci, Ancona, Taliansko. [online]. [cit. 08.01.2019].
Dostupné z WWW:
<<http://aac.asm.org/content/53/2/343>. 2008>
70. VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 2. preprac. vyd. Praha: Neptun, 2005. 111 - 128 s. ISBN: 10 80-86850-00-5.
71. WANG, S., TOROSOFF, M.; SMITH, R. et al. Streptococcus Pyogenes Meningitis and Endocarditis in a Patient with Prosthetic Mitral Valve. *Journal of Cardiology Cases*, 2017. 16.3: 82 –84.
72. WANG, Y.; XU, C.; WANG, Z. et al. Seasonality and Trend Prediction of Scarlet Fever Incidence in Mainland China from 2004 to 2018 Using a Hybrid SARIMA-NARX Model. *PeerJ*, 2019. 7. e6165.
73. WOODBURY, R.; KLAMMER, Y.; XIONG, Y. et al. Plasmid-Borne Erm(T) from Invasive, Macrolide-Resistant Streptococcus Pyogenes Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008. 52.3: 1140 – 43.
74. YOU, Y.; WANG, H.; BI, Z. et al. Molecular Typing of Chinese Streptococcus Pyogenes Isolates. *Molecular and Cellular Probes*, 2015. 29.3: 172 – 76.
75. ZHANG, Q.; LIU, W.; MA, W. et al. Spatiotemporal Epidemiology of Scarlet Fever in Jiangsu Province, China, 2005-2015. *BMC Infectious Diseases*, 2017. 17.1: 4 – 9.