

ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků – verze 2010**ORIDES – presumptive identification of coagulase-negative staphylococci – version 2010****Petr Petráš****Souhrn • Summary**

V příspěvku je prezentováno inovované dichotomické schéma NRL pro stafylokoky ORIDES, které slouží k jednoduchému vyhodnocení identifikace koaguláza negativních stafylokoků (KNS) z humánního klinického materiálu. Ve schématu byly provedeny úpravy, které vyhodnocení identifikace zpřesňují. Nová verze obsahuje 20 druhů, resp. poddruhů KNS, které jsou podle výsledků NRL/St nejčastěji zasílány z pracovišť klinické mikrobiologie v ČR k identifikaci.

This article features ORIDES, an updated dichotomous scheme of the National Reference Laboratory for Staphylococci, that is used for simple presumptive identification of coagulase-negative staphylococci (CNS) from human clinical specimens. The scheme was updated to provide more accurate results. The last version includes 20 CNS species or subspecies that are most commonly referred for identification to NRL by clinical microbiology laboratories in the Czech Republic.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2010; 19(12): 373–378.

Klíčová slova: rod *Staphylococcus*, koaguláza negativní stafylokoky, identifikace
Keywords: genus *Staphylococcus*, coagulase-negative staphylococci, identification

Koaguláza negativní stafylokoky (KNS) tvoří dominantní součást normální mikroflóry kůže a sliznic člověka, vyskytují se na sliznicích a kůži různých druhů zvířat, najdeme je ale i v potravinách a v různém prostředí. Skutečně jsou ubikviterní, podobně jako hlavní zástupce rodu *Staphylococcus aureus*. V současnosti (prosinec 2010) je validně popsáno 46 koaguláza negativních stafylokoků [1], z nich asi polovina se nachází v humánním klinickém materiálu. Od 70. let minulého století jsou považovány za podmíněné patogeny, které mohou u oslabeného pacienta (věkem, imunitou, dlouhodobým pobytem v nemocnici a u uživatelů drog) způsobit v podstatě jakoukoliv onemocnění, které vyvolávají kmeny *S. aureus*. Výjimku tvoří toxikózy, které jsou způsobeny toxinogenními kmeny *S. aureus*, jako syndrom toxického šoku, exfoliativní dermatitidy, pneumonie vyvolané kmeny s produkcí Pantonova – Valentinova leukocidinu a další.

Již od 50. let minulého století jsou známé infekce močových cest vyvolané kmeny *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*. Koaguláza negativní stafylokoky mohou být příčinou endokarditid, cystitid, osteomyelitid, meningitid, infekcí ran – zvláště operačních, kloubů, kloubních protéz a dalších onemocnění. Časté jsou zvláště infekce krevního řečiště u hospitalizovaných pacientů.

Je proto v opodstatněných případech zapotřebí kmeny KNS identifikovat a zjistit jejich citlivost k antibiotikům. Je zásadní určit, kdy se jedná o původce infekce a kdy jde o kontaminaci. Vzhledem k své ubikviternosti představují KNS nejčastější kontaminaci hemokultur i dalšího materiálu.

Odlíšení kmenů KNS od *S. aureus*

K odlíšení kmenů KNS od kmenů *S. aureus* se v laboratorních klinické mikrobiologie běžně používá latexový test na „Clumping (shlukovací) faktor“, nazývaný též vázaná koaguláza. Je vhodné používat testy 3. generace, tj. ty, které jsou schopné vedle clumping faktoru detekovat protein A a kapsulární polysacharidy kmenů MRSA. Obvykle jsou označeny slovem „plus“: Pastorex Staph plus (BioRad), Slidex Staph Plus (bioMérieux), Staphylect Plus (Oxoid). Pozitivní výsledek testu na clumping faktor mohou mít i kmeny dvou druhů KNS, *S. lugdunensis* a *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.

V poslední době se začíná i v terénních laboratorních prosazovat test průkazu specifického enzymu hyaluronidáza [2]. Tento dekapulační test, který jsme převzali od kolegů z Mikrobiologického ústavu FN u sv. Anny a původně jej popsal prof. Skalka z VFU v Brně, se nám v NRL pro stafylokoky perfektně osvědčil. Z dosud testovaných 7 561 kmenů stafylokoků bylo všech 1 167 kmenů KNS negativních a z 6 392 kmenů *S. aureus* bylo pozitivních 6 337 kmenů. Tj. chyba byla u 55 kmenů *S. aureus* (0,7 %). U sporných případů se řídíme výsledky genotypizace: metodou PCR zjišťujeme přítomnost *nuc* genu, který kóduje produkci termorezistentní nukleázy kmenů *S. aureus*. Kromě kmenů *S. aureus* mohou mít pozitivní test na hyaluronidázu pouze kmeny *S. hyicus*, ale ty se v humánním klinickém materiálu nevyskytují.

Identifikace kmenů KNS obecně

Identifikace kmene KNS se v NRL i běžných klinických laboratorních provádí fenotypovými testy. V naší republice jsou k dispozici velice dobré komerční sety STAPHY-test 24 firmy Erba-Lachema. V movitějších laboratorních se používají kity API Staph, případně ID 32 Staph testy

firmy Biomérieux, BBL Crystal Gram-positive ID Kit firmy Becton Dickinson a jiné. Vyhodnocování se obvykle provádí pomocí příslušných počítačových programů – pro STAPHYtesty 24 využíváme identifikační software TNW rovněž od firmy Erba-Lachema.

VÝSLEDKY

V tabulce 4 prezentujeme četnost nejčastějších KNS identifikovaných v NRL pro stafylokoky v letech 1998–2009. Kmeny, izolované z humánního materiálu, nám byly zaslány z laboratoří klinické mikrobiologie z celého území naší republiky. Na prvních čtyřech místech jsou *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a *S. hominis* se dvěma poddruhy subsp. *hominis* a subsp. *novobiosepticus*. Tyto čtyři KNS představují celé 3/4 všech identifikovaných kmenů. Na dalších místech jsou *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. simulans* a *S. capitis* subsp. *urealyticus*. Nejčastějších 10 KNS představuje z celku 3 752 kmenů podíl 88,2 %. Protože do NRL/St jsou častěji zasilány obtížněji identifikovatelné kmeny, je zřejmé, že v běžné laboratoři bude podíl 10 nejčastějších druhů, resp. poddruhů, ještě vyšší. Podrobná analýza těchto výsledků bude publikována v odborném tisku. V tabulce 4 jsou uvedeny i praktické zkratky KNS, které v NRL/ST používáme.

ORIDES

Přes naprosto nezbytné rozšíření počítačových programů se v některých bakteriologických laboratořích pro identifikaci KNS používá stále i dichotomické schéma naší laboratoře ORIDES.

V české literatuře bylo poprvé uvedeno dichotomické schéma pro KNS v roce 1983 prof. Hájkem a jeho kolegy [3]. Ve dvou tabulkách (NOV-R a NOV-C) bylo zařazeno 14 druhů KNS. Schéma bylo prof. Hájkem inovováno v roce 1985 [4]. Obsahovalo všech 17 tenkrát známých druhů KNS. Jiné schéma publikoval v r. 1988 prof. A. K. Akatov z Gamalejova Institutu v Moskvě [5].

Ještě v době před počítačovými identifikačními programy jsme v naší laboratoři vyvinuli schéma ORIDES (Orientační identifikace stafylokoků). Poprvé bylo publikováno v roce 1995 [6] a zahrnovalo 17 druhů KNS, které se nejčastěji vyskytovaly v humánním klinickém materiálu. V roce 1998, kdy byl v International Journal of Systematic Bacteriology publikován poměrně častý poddruh *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, byl ORIDES rozšířen na 19 druhů KNS [7].

V tomto příspěvku přinášíme další inovaci schématu ORIDES. Je v něm zařazeno 20 stafylokokových druhů (poddruhů), které se podle výsledků NRL/ST nejčastěji v humánním materiálu vyskytují. Oproti verzi z roku 1998 byl přidán pouze druh *S. caprae*, který ač původně „kozí“ stafylokok, popisovaný jako původce kozích mastitid, objevuje se častěji i v humánním klinickém materiálu. Byly např. popsány infekce krevního řečiště způsobené oxacilin rezistentními kmeny *S. caprae*. V našich dlouhodobých tabulkách sledování KNS v humánním

klinickém materiálu se umístil na 15. pozici (viz tabulka 4). Ve všech třech tabulkách byly provedeny úpravy, které vyhodnocení identifikace některých druhů KNS zpřesňují.

Identifikace podle schématu ORIDES

Základní rozdělení KNS se v ORIDES provádí podle výsledku diskového testu na zjištění rezistence k novobiocinu. (Disk: 5 µg novobiocinu; zóna ≤ 16 mm). Kmeny k novobiocinu rezistentní se určí podle tabulky I., kde se nejprve zjistí produkce oxidázy (proužkový OXItest).

U kmenů k novobiocinu citlivých se zjistí produkce ureázy. Kmeny s pozitivní ureázou se zařadí do tabulky II., kmeny s ureázou negativní do tabulky III. Dále se kmeny určují podle výsledků reakcí v komerčním kitu STAPHYtest 24. Další dvě reakce, produkce acetoinu (proužkový VPtest) a produkce pyrrolidonylarylamidázy (proužkový PYRAtest), jsou k řadě 24 reakcí ve STAPHYtestu 24 doporučeny. Výjimkou je pouze test zjišťování růstu KNS v anaerobních podmínkách, označený v tabulce ORIDES II. „thioglykolát“.

Diskuse

ORIDES slouží k orientační identifikaci nejčastějších 20 druhů, resp. poddruhů koaguláza negativních stafylokoků, které se podle výsledků NRL/ST vyskytují v humánním klinickém materiálu. Schéma je založeno na charakteristických fenotypových vlastnostech jednotlivých taxonů, které mají v databázi výsledků reakcí rozlišující hodnoty, pokud možno alespoň 15 verzus 85. Při identifikaci dichotomickým schématem samozřejmě hrozí, že u aberantních kmenů, které mají diskriminující charakteristiku atypickou, vyjde výsledek identifikace špatně. U ORIDES verze z roku 1995 jsme provedli srovnání na 986 kmenech a v průměru nám vyšla identifikace shodná s konvenčním postupem více jak v 90 %. U dvou nejčastějších KNS, *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* to bylo dokonce přes 95 % [6]. Správnost identifikace druhu *S. hominis* byla původně nízká (jen 75 %), ale výrazně se zlepšila rozdělením na poddruhy ve verzi z roku 1998.

Při diferenciaci kmenů *S. epidermidis* a ne zcela typických kmenů *S. hominis* subsp. *hominis* se nám osvědčilo zjištění schopnosti anaerobního růstu v thioglykolátu. Zatím všechny kmeny *S. epidermidis*, které jsme zkoumali, měli tuto reakci pozitivní, na rozdíl od kmenů *S. hominis* subsp. *hominis*. Tuto doplňkovou reakci je vhodné použít u sporných případů i při identifikaci pomocí programu TNW.

Ve spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů v Brně CCM jsme zjistili, že tři poddruhy *S. sciuri*, tj. subsp. *sciuri*, subsp. *rodentium* a subsp. *carnaticus* lze velice těžko fenotypově odlišit [8]. Proto byl do nové verze ORIDES zařazen pouze druh *S. sciuri*, s tím, že u kmenů z humánního materiálu se jedná zřejmě nejčastěji o poddruh *S. sciuri* subsp. *sciuri*. (Tabulka ORIDES I.)

Dosud jsme porovnali výsledky vyhodnocení programu TNW a ORIDES v.2010 u 249 kmenů KNS, které jsme dostali z laboratoří klinické mikrobiologie v letech

ORIDES I. (VERZE 2010)

Orientační identifikace koaguláza-negativních stafylokoků,
izolovaných z humánního klinického materiálu

novobiocin rezistentní

S.XYLOSUS, *S.saprophyticus* subsp. *SAPROPHYTICUS*, *S.hominis* subsp. *NOVOBIOSEPTICUS*,
S.cohnii subsp. *COHNII*, *S.cohnii* subsp. *UREALYTICUS*, *S.SCIURI* sp. (poddruhy nelze odlišit,
z humánního klinického materiálu prakticky jen *S.sciuri* subsp. *SCIURI*),
event. vzácně *S.LENTUS* a *S.VITULINUS*.

oxidáza

+	-
<i>S.LENTUS</i> , <i>S. SCIURI</i> sp. <i>S.VITULINUS</i>	<i>S.XYLOSUS</i> , <i>S.saprophyticus</i> subsp. <i>SAPROPHYTICUS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>NOVOBIOSEPTICUS</i> <i>S.cohnii</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i> <i>S.cohnii</i> subsp. <i>COHNII</i>

rafinóza

+	-
<i>S.LENTUS</i>	<i>S.SCIURI</i> sp. <i>S.VITULINUS</i>

xylóza

+	-
<i>S.XYLOSUS</i>	<i>S.saprophyticus</i> subsp. <i>SAPROPHYTICUS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>NOVOBIOSEPTICUS</i> <i>S.cohnii</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i> <i>S.cohnii</i> subsp. <i>COHNII</i>

manóza

+	-
<i>S.SCIURI</i> sp.	<i>S.VITULINUS</i>

sacharóza

+	-
<i>S.saprophyticus</i> subsp. <i>SAPROPHYTICUS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>NOVOBIOSEPTICUS</i>	<i>S.cohnii</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i> <i>S.cohnii</i> subsp. <i>COHNII</i>

trehalóza

+	-
<i>S.saprophyticus</i> subsp. <i>SAPROPHYTICUS</i>	<i>S.hominis</i> subsp. <i>NOVOBIOSEPTICUS</i>

ureáza

+	-
<i>S.cohnii</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i>	<i>S.cohnii</i> subsp. <i>COHNII</i>

2009 – 2010. Shodná identifikace nám vychází v 92,0 %.
Podrobná analýza srovnání na větším počtu kmenů bude
publikována v našem odborném tisku.

Závěr

ORIDES může sloužit k jednoduchému a levnému vy-
hodnocení identifikací KNS v terénních laboratořích,
zvláště těch, pro které je cena na zakoupení identifikač-
ního software vysoká. Podle prvních zkušeností laborato-

ORIDES II. (VERZE 2010)

**Orientační identifikace koaguláza-negativních stafylokoků,
izolovaných z humánního klinického materiálu**

novobiocin citlivé

ureáza +

S.SIMULANS, *S.WARNERI*, *S.PASTEURI*, *S.capitis* subsp. *UREALYTICUS*, *S.LUGDUNENSIS*,
S.hominis subsp. *HOMINIS*, *S.EPIDERMIDIS*, *S.CAPRAE*

sacharóza

+	-
	<i>S.CAPRAE</i>

manitol

+	-
<i>S.SIMULANS</i> , <i>S.WARNERI</i> , <i>S.PASTEURI</i> , <i>S.CAPITIS</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i>	<i>S.WARNERI</i> , <i>S.LUGDUNENSIS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i> , <i>S.EPIDERMIDIS</i>

trehalóza

+	-
<i>S.SIMULANS</i> <i>S.WARNERI</i> <i>S.PASTEURI</i>	<i>S.capitis</i> subsp. <i>UREALYTICUS</i>

trehalóza

+	-
<i>S.WARNERI</i> <i>S.LUGDUNENSIS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>	<i>S.EPIDERMIDIS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>

onpg

+	-
<i>S.SIMULANS</i>	<i>S.WARNERI</i> <i>S.PASTEURI</i>

arginin

+	-
<i>S.WARNERI</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>	<i>S.LUGDUNENSIS</i> <i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>

thioglykolát

+	-
<i>S.EPIDERMIDIS</i>	<i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>

sorbitol

+	-
<i>S.PASTEURI</i>	<i>S.WARNERI</i>

glukozidáza

+	-
<i>S.WARNERI</i>	<i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>

ornitin

+	-
<i>S.LUGDUNENSIS</i>	<i>S.hominis</i> subsp. <i>HOMINIS</i>

ORIDES III. (VERZE 2010)

Orientační identifikace koaguláza-negativních stafylokoků,
izolovaných z humánního klinického materiálu

novobiocin citlivé**ureáza –**

S.LUGDUNENSIS, *S.HAEMOLYTICUS*, *S.capitis* subsp. *CAPITIS*,
S.schleiferi subsp. *SCHLEIFERI*, *S.AURICULARIS*

VP test

+

S. LUGDUNENSIS, *S. HAEMOLYTICUS*
S.capitis subsp. *CAPITIS*
S.schleiferi subsp. *SCHLEIFERI*

–

S.capitis subsp. *CAPITIS*
S.HAEMOLYTICUS, *S.AURICULARIS*

sacharóza

+

S. LUGDUNENSIS
S. HAEMOLYTICUS
S.capitis subsp. *CAPITIS*

–

S.schleiferi subsp.
SCHLEIFERI
S.capitis subsp. *CAPITIS*

trehalóza

+

S.HAEMOLYTICUS
S.AURICULARIS

–

S.CAPITIS
subsp. *CAPITIS*

trehalóza

+

S. LUGDUNENSIS
S.HAEMOLYTICUS

–

S.capitis
subsp. *CAPITIS*

manitol

+

S.schleiferi
subsp. *SCHLEIFERI*

–

PYR (NAG)

+

S.HAEMOLYTICUS

–

S.AURICULARIS

ornitin

+

S. LUGDUNENSIS

–

S.HAEMOLYTICUS

ří, kterým jsme nové schéma poskytli, a které si porovnávaly výsledek s vyhodnocením podle programu TNW, se osvědčil.

Poděkování

Autor děkuje svým současným spolupracovnicím Ivaně a Míle i všem bývalým kolegyním v NRL pro stafylokoky za perfektní spolupráci. Dík patří i doc. Sedláčkovi a dr. Švecovi z České sbírky mikroorganismů v Brně a doc. Pantůčkovi z Ústavu experimentální biologie PŘF Masarykovy Univerzity v Brně.

Práce byla podpořena projektem GAČR 310/09/0459.

Tabulka 4: NEJČASTĚJI IDENTIFIKOVANÉ KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY IZOLOVANÉ Z HUMÁNNÍHO KLINICKÉHO MATERIÁLU A ZASLANÉ DO NRL/ST V LETECH 1998–2009

Pořadí	druh/poddrůh KNS	zkratka *)	počet kmenů	%	% celkem
1	<i>S. epidermidis</i>	SEP	1160	30,9	
2	<i>S. haemolyticus</i>	SHA	829	22,1	
3	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	SHO	441	11,8	
4	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	SHN	385	10,3	75,1
5	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	SSA	142	3,8	
6	<i>S. warneri</i>	SWA	120	3,2	
7	<i>S. lugdunensis</i>	SLU	118	3,1	
8	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	SSC	106	2,8	
9	<i>S. simulans</i>	SSI	67	1,8	
10	<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	SUR	62	1,6	88,2
11	<i>S. xylosus</i>	SXY	54		
12	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	SCA	46		
13	<i>S. pasteurii</i>	SPA	35		
14	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	SCU	34		
15	<i>S. caprae</i>	SCP	31		
16	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	SCC	29		
17	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rhodentium</i>	SRD	24		
18	<i>S. lentus</i>	SLE	18		
19	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	SSF	12		
20	<i>S. auricularis</i>	SAC	11		
21	<i>S. vitulinus</i>	SVI	7		99,4
	ostatní		21		0,6
CELKEM			3752		

*) zkratka taxonu používaná v NRL pro stafylokoky

LITERATURA

- [1] Petráš P. Čtyři nové druhy v rodu *Staphylococcus* popsané v r. 2010. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)* 2010; 19(11): 334–337.
- [2] Andrysík T, Machová I, Petráš P, Votava M. Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2004; 13(5): 210–212.
- [3] Hájek V, Maršálek E, Horák V. Diagnostika stafylokoků a stafylokokových infekcí. *AHEM (IHE, Praha)* 1983; příloha 5: 16–26.
- [4] Hájek V. Nové poznatky o klasifikaci stafylokoků. *ČEMI* 1985; 34(4): 193–198.
- [5] Akatov AK. Doplnění k současnější klasifikaci stafylokoků. *Žurnal mikrobiologii (Moskva)* 1988; No12: 3–8.
- [6] Petráš P. ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků z klinického materiálu. *Epidemiol mikrobiol imunol* 1995; 44(1): 15–19.
- [7] Petráš P. Výskyt kmenů *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 1998; 7(11): 443–445.
- [8] Sedláček I, Štětina V, Pantůček R, Švec P, Petráš P. Ribotyping and Biotyping of *S. sciuri* species group from human. Abstract #ME-27, 11.ISSSI, Charleston, USA 2004; p.153.

RNDr. Petr Petráš, CSc.
vedoucí NRL pro stafylokoky
SZÚ, Praha