

ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků – verze 2015**ORIDES – presumptive identification of coagulase-negative staphylococci – version 2015****Petr Petráš****Souhrn**

V příspěvku je prezentováno aktualizované dichotomické schéma NRL pro stafylokoky ORIDES, které slouží k jednoduchému vyhodnocení identifikace koaguláza negativních stafylokoků (KNS) z humánního klinického materiálu. Proti minulé verzi z roku 2010 bylo přidáno 5 recentně popsanych druhů, resp. poddruhů KNS. Celkem zahrnuje nová verze ORIDESu 25 taxonů KNS, které jsou podle výsledků NRL pro stafylokoky nejčastěji zasílány z pracovišť klinické mikrobiologie v České republice k identifikaci.

The article presents the new 2015 version of ORIDES, a dichotomic scheme designed by the National Reference Laboratory (NRL) for Staphylococci for presumptive identification of coagulase-negative staphylococci (CNS) from human clinical specimens. The update from the 2010 version consists in adding five recently described species or subspecies of CNS. The updated ORIDES includes 25 taxons of CNS that turned out to be the most commonly referred for identification to the NRL for Staphylococci by clinical microbiology laboratories in the Czech Republic.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2015; 24(10): 332–337.

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

Koaguláza negativní stafylokoky (KNS) tvoří dominantní součást normálního mikrobiálního osídlení kůže a sliznic člověka, vyskytují se na sliznicích různých druhů zvířat, najdeme je ale i v potravinách a v různém prostředí. Od 70. let minulého století jsou považovány za podmíněné patogeny, které mohou u oslabeného pacienta (věk, imunita, dlouhodobý pobyt v nemocnici a uživatelé drog) způsobit v podstatě jakékoliv onemocnění, které vyvolávají kmeny *Staphylococcus aureus*. Výjimku tvoří toxikózy, které jsou způsobeny toxinogenními kmeny *S. aureus*. V současnosti (říjen 2015) je popsáno 52 koaguláza negativních stafylokoků [1], z nich asi polovina může být izolována z humánního klinického materiálu.

Dlouho jsou známé infekce močových cest vyvolané kmeny *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*. KNS mohou být příčinou endokarditid, cystitid, osteomyelitid, meningitid, zhnisaných ran – zvláště operačních. V infekcích spojených se zdravotní péčí jsou KNS častým etiologickým agens onemocnění krevního řečiště.

V opodstatněných případech je zapotřebí kmeny KNS identifikovat a zjistit jejich citlivost k antibiotikům. Je samozřejmě důležité zvážit, kdy se jedná o původce infekce a kdy jde o kontaminaci. Vzhledem k své ubikviternosti představují KNS nejčastější kontaminaci hemokultur i dalšího vyšetřovaného materiálu.

Odlišení kmenů KNS od *S. aureus*

K odlišení kmenů KNS od kmenů *S. aureus* se v bakteriologických laboratořích 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 mají v označení slůvko „plus“. Pozitivní výsledek testu na clumping faktor mohou mít i kmeny *S. lugdunensis* a *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* a s některými latexovými kity i kmeny *S. petrasii* subsp. *petrasii*.

K průkazu kmenů *S. aureus* se v NRL pro stafylokoky (NRL/St) nejvíce osvědčilo zjišťování produkce enzymu hyaluronidáza [2]. Z dosud testovaných více jak 10 000 kmenů *S. aureus* vychází chyba (falešná negativita) této reakce asi 1 %. U sporných případů se řídíme výsledky genotypizace: metodou PCR zjišťujeme přítomnost *nuc* genu, který kóduje produkci termorezistentní nukleázy kmenů *S. aureus*.

Identifikace kmenů KNS obecně

Identifikace kmene KNS se v klinických laboratořích provádí fenotypovými testy. V naší republice jsou k dispozici dobré komerční sady STAPHYtest 24 firmy Erba-Lachema. Slovenská firma Diagnostics produkuje velice obdobné kity IDmikro GP24. Mají-li laboratoře možnost, 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.

V poslední době stále více laboratoří používá hmotnostní spektrometrii, převážně pomocí přístroje Microflex (Bruker Daltonics). V případě stafylokoků identifikuje program Biotyper velice dobře. Rod *Staphylococcus* je z tohoto hlediska opravdu „ukázněným“ a fenotypová identifikace je v soulase s daty, získanými hmotnostní spektrometrií.

ORIDES

Přes naprosto nezbytné rozšíření počítačových programů se pro identifikaci KNS na některých bakteriologických pracovištích používá stále i dichotomické schéma naší laboratoře ORIDES (**O**rientační **i**dentifikace stafylokoků). Presentujeme jeho aktualizaci, s kterou může ORIDES sloužit do té doby, než bude hmotnostní spektrometrie a molekulární metody běžně dostupné.

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. Akatov z Gamalejova Institutu v Moskvě [5].

V naší laboratoři jsme vyvinuli schéma ORIDES, které bylo poprvé publikováno v roce 1995 [6]. Zahrnovalo 17 druhů KNS, které se nejčastěji vyskytovaly v humánním klinickém materiálu. V roce 1998, kdy byl v International Journal of Systematic Bacteriology popsán poměrně častý poddruh *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, byl ORIDES rozšířen na 19 taxonů KNS.

Další aktualizace ORIDESu byla publikována v roce 2010 [7]. Bylo v něm zařazeno 20 stafylokokových druhů (poddruhů), oproti verzi z roku 1998 byl přidán druh *S. caprae*, který ač původně „kozí“ stafylokok, popisovaný jako původce kozích mastitid, začal se častěji nacházet i v humánním klinickém materiálu.

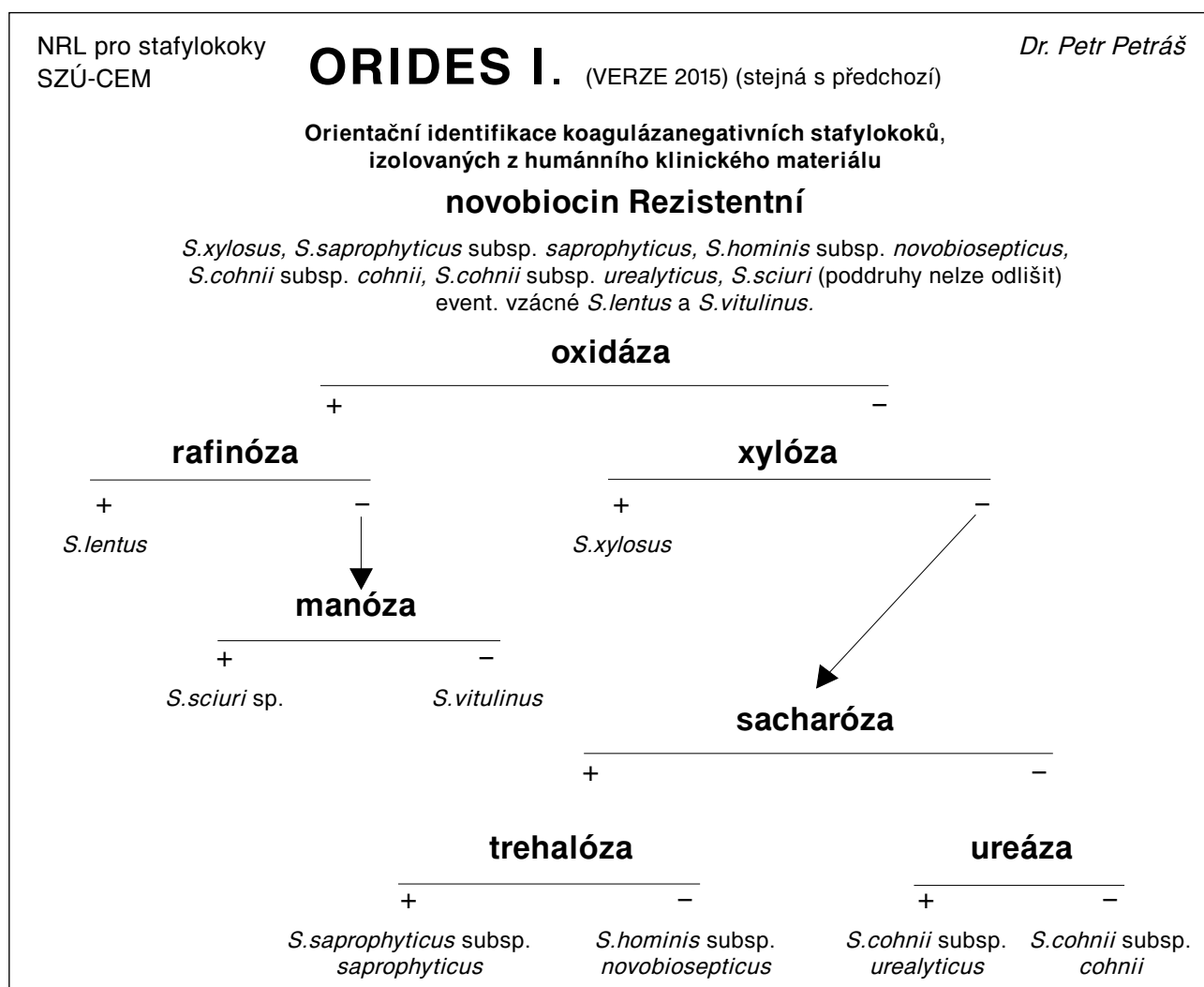
V aktuálně prezentované verzi přibýlo 5 nových stafylokokových taxonů: *S. pettenkoferi* a čtyři poddruhy českého druhu *S. petrasii*: subsp. *petrasii*, subsp. *croceilyticus*, subsp. *jettensis* a subsp. *pragensis*, které byly recentně uvedeny do taxonomie rodu [1]. K zpřesnění identifikace slouží i nově vytvoření čtvrtá tabulka schématu, ORIDES IV.

Identifikace podle schématu ORIDES

Základní rozdělení KNS se v ORIDES provádí podle výsledku diskového testu na zjištění rezistence k novobiocinu. Kmeny k novobiocinu rezistentní se identifikují podle tabulky I., kde se nejprve prověří produkce oxidázy.

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. Kmeny ureáza a sacharóza pozitivní, manitol negativní se identifikují podle nové tabulky ORIDES IV.

Tabulka I.



Celkem je v ORIDESu použito 18 základních biochemických reakcí, běžně používaných v bakteriologických laboratořích, ať už konvenčně, nebo v různých kitech – viz tabulka V.

ORIDES slouží k orientační identifikaci nejčastějších 25 druhů, resp. poddruhů koaguláza negativních stafylokoků, které se podle výsledků NRL pro stafylokoky vyskytují v humánním klinickém materiálu (tabulka VI.). Schéma je založeno na charakteristických fenotypových vlastnostech jednotlivých taxonů, které mají v databázi výsledků reakcí rozlišující hodnoty, pokud možno alespoň 15 versus 85. U aberantních kmenů, které mají diskriminující charakteristiku atypickou, vyjde výsledek identifikace odlišně od skutečnosti. Podle dlouhodobých porovnaní naší laboratoře je těchto kmenů asi 10–15 %.

Poděkování

Autor děkuje svým současným spolupracovnícím Míle a Jance 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 Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně za genotypové identifikace problematických kmenů.

LITERATURA

- [1] Švec P, Pantůček R, Sedláček I, Petráš P. Aktuální změny v rodu *Staphylococcus* 2013–2015. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2015; 24(4): 140–143.
- [2] Andrysík T, Machová I, Petráš P, Votava M. Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*. *Zprávy CEM (SZÚ,*

Tabulka II.

NRL pro stafylokoky SZÚ-CEM	ORIDES II. (VERZE 2015)		Dr. Petr Petráš
Orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků, izolovaných z humánního klinického materiálu			
novobiocin Citlivé, ureáza +			
<i>S. caprae</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i> a <i>croceilyticus</i> , <i>S. pettenkoferi</i>			
sacharóza			
	+	–	
	u kmenů <i>S. pettenkoferii</i> je okyselení sacharózy opožděné 2. až 3. den	<i>S. caprae</i>	
manitol			
	+	–	
	↓	↓	
	trehalóza	viz ORIDES IV.	
	+	–	
		<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	
N-acetylglukosamin			
	+	–	
	<i>S. simulans</i>		
PYR test			
	+	–	
β-glukuronidáza			
	+	–	
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>croceilyticus</i>		<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>	
sorbitol			
	+	–	
	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. warneri</i>	

Praha) 2004; 13(5): 210–212.

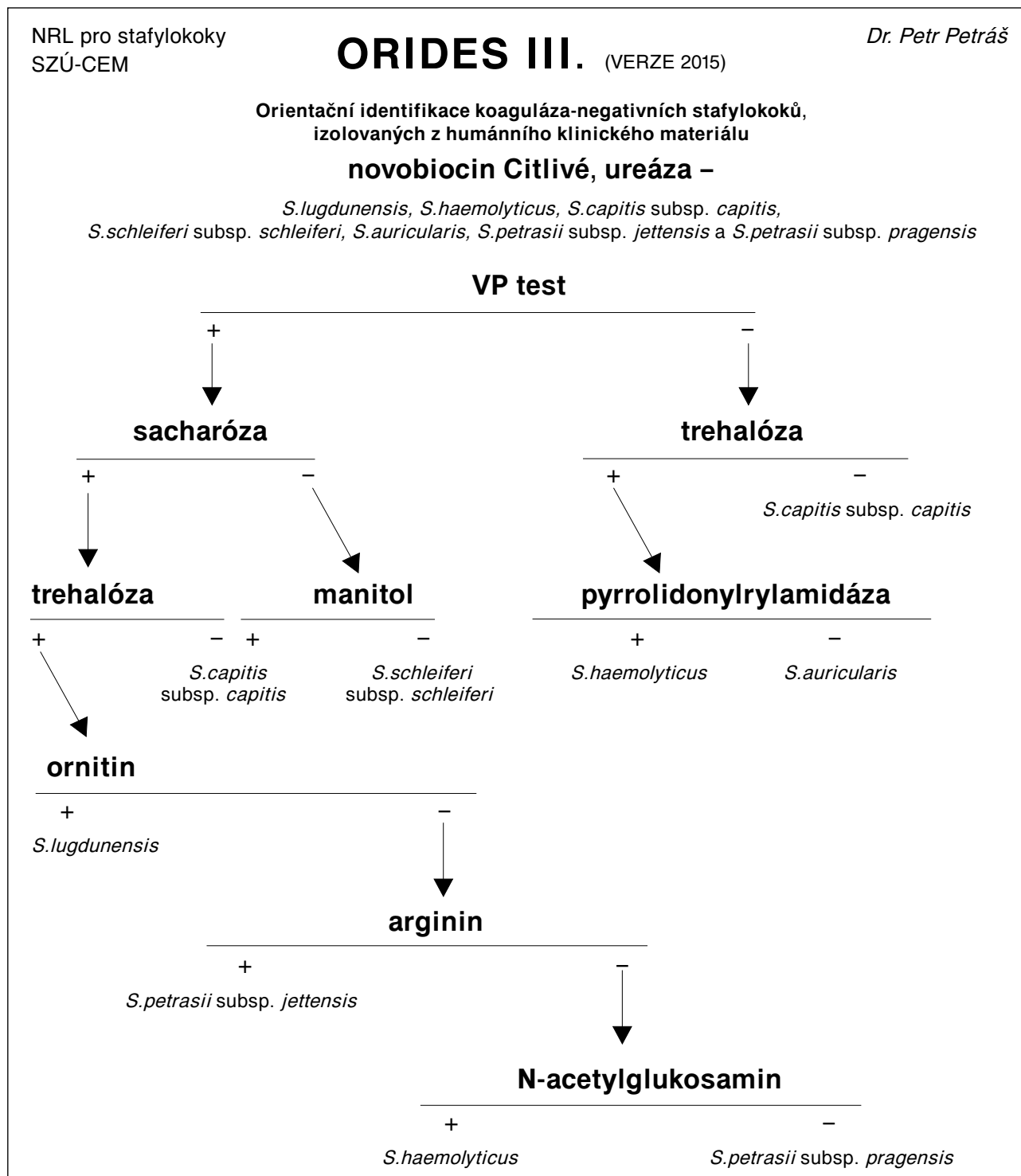
- [3] Hájek V, Maršálek E, Horák V. Diagnostika stafylokoků a stafylokokových infekcí. *AHEM (IHE, Praha)* 1983; příloha 5: 16–26.
- [4] Hájek V. Nové poznatky o klasifikaci stafylokoků. *ČEMI* 1985; 34(4): 193–198.
- [5] Akatov AK. Doplnění k současné klasifikaci stafylokoků. *Žurnal mikrobiologii (Moskva)* 1988; 12(1): 3–8.

[6] Petráš P. ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků z klinického materiálu. *Epidemiol mikrobiol imunol* 1995; 44(1): 15–19.

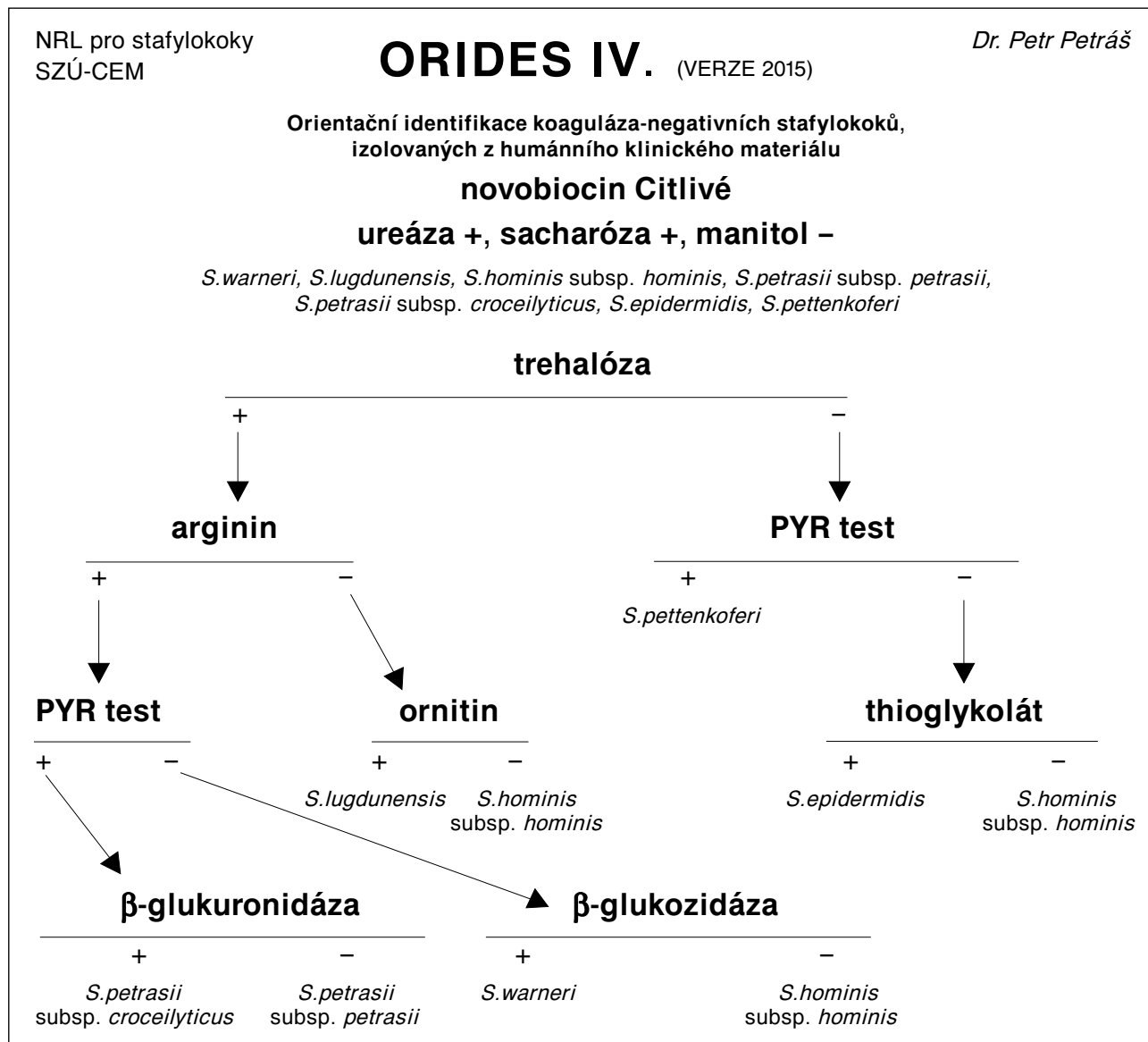
[7] Petráš P. ORIDES – orientační identifikace koaguláza negativních stafylokoků – verze 2010. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*; 19(12): 373–378.

RNDr. Petr Petráš, CSc.
NRL pro stafylokoky
CEM-SZÚ, Praha

Tabulka III.



Tabulka IV.



Tabulka V. Biochemické reakce použité ve schématu ORIDES

Č.	zkratka	reakce
1	NOV	rezistence k novobiocinu
2	OXI	oxidáza
3	RAF	rafinóza
4	MNS	manóza
5	XYL	xylóza
6	SUC	sacharóza
7	TRE	trehalóza
8	URE	ureáza
9	MAN	manitol
10	NAG	N-acetylglukosamin
11	PYR	pyrrolidonylarylamidáza
12	GLR	beta-glukuronidáza
13	SOR	sorbitol
14	VPT	acetoin
15	ORN	ornitin dekarboxyláza
16	ARG	arginin dihydroláza
17	THI	anaerobní růst (thioglykolát)
18	GLS	beta-glukosidáza

Tabulka VI. Koaguláza negativní stafylokoky zahrnuté ve schématu ORIDES (verze 2015)

Č.	zkratka *)	druh/poddruh rodu <i>Staphylococcus</i>
1	SAC	<i>S. auricularis</i>
2	SCA	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>
3	SUR	<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>
4	SCP	<i>S. caprae</i>
5	SCO	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>
6	SCU	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>
7	SEP	<i>S. epidermidis</i>
8	SHA	<i>S. haemolyticus</i>
9	SHO	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>
10	SHN	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>
11	SLE	<i>S. lentus</i>
12	SLU	<i>S. lugdunensis</i>
13	SPA	<i>S. pasteurii</i>
14	SPC	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>croceilyticus</i>
15	SPJ	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>
16	SPP	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
17	SPR	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>pragensis</i>
18	SPE	<i>S. pettenkoferi</i>
19	SSA	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>
20	Ssc	<i>S. sciuri</i> (podruhy nelze odlišit)
21	SSF	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>
22	SSI	<i>S. simulans</i>
23	SVI	<i>S. vitulinus</i>
24	SWA	<i>S. warneri</i>
25	SXY	<i>S. xylosus</i>

*)zkratka používaná v NRL pro stafylokoky