

***Staphylococcus saprophyticus* – jeho rezistence k vybraným antibiotikům a tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z moče**

Černohorská L., Votava M.

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

V období 2005–2009 bylo vyšetřeno celkem 87 kmenů *S. saprophyticus* pocházejících z močí pacientů s diagnózou zánět močového měchýře – cystitis. U všech těchto kmenů byla sledována rezistence k vankomycinu, nitrofurantoinu, doxycyklinu, oxacilinu, amoxicilinu/klavulanátu, cefoxitinu a sulfamethoxazol/trimethoprimu. Tvorba biofilmu byla detekována pomocí modifikované Christensenovy metody.

Nebyl nalezen žádný kmen rezistentní k vankomycinu, k nitrofurantoinu byly rezistentní 2 kmeny (2,3 %), k doxycyklinu 9 kmenů (10,3 %), k oxacilinu 20 kmenů (23,0 %), k amoxicilinu s klavulanátem a k cefoxitinu shodně 6 kmenů (6,9 %), ke sulfamethoxazol/trimethoprimu 1 kmen (1,1 %). Z 20 375 kultivačně pozitivních močí testovaných v letech 2005–2009 v naší laboratoři byl *S. saprophyticus* prokázán jako původce 0,4 % zánětů močového měchýře. Většina kmenů (67) pocházela od žen (77,0 %), zejména mladšího věku. Biofilm tvořilo 16 z 87 kmenů (18,4 %).

Klíčová slova: *S. saprophyticus* – močové infekce – biofilm – antibiotika.

Summary

Černohorská L., Votava M.: Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Staphylococcus saprophyticus* Strains Isolated from Urine

Eighty-seven *Staphylococcus saprophyticus* strains isolated from urine of 87 patients with cystitis were examined in 2005–2009. All strains were tested for resistance to vancomycin, nitrofurantoin, doxycycline, oxacillin, amoxicillin/clavulanate, cefoxitin and sulfamethoxazole/trimethoprim and for biofilm formation by a modified Christensen method.

None of the tested strains of *S. saprophyticus* showed resistance to vancomycin, while 2 strains (2.3 %) were resistant to nitrofurantoin, 9 (10.3%) to doxycycline, 20 (23.0 %) to oxacillin, 6 (6.9%) to amoxicillin/clavulanate, 6 (6.9%) to cefoxitin and 1 (1.1%) to sulfamethoxazole/trimethoprim.

S. saprophyticus was detected as the causative agent of cystitis in 0.4 % of 20,375 culture positive urine samples analyzed in our laboratory between 2005 and 2009. Most 67 (77.0%) *S. saprophyticus* strains were recovered from women, particularly from young women. Biofilm formation was detected in 16 (18.4 %) out of 87 *S. saprophyticus* strains.

Key words: *S. saprophyticus* – urinary tract infection – biofilm – antibiotics.

Jako původci močových infekcí se uplatňují rozmanité bakterie. Často bývají z močí pacientů s močovou infekcí izolovány bakterie *Escherichia coli* (až 80 %), dále *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus agalactiae* [16], méně často (1–10 %) [1] *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (dále jen *S. saprophyticus*), případně další stafylokoky. Role koagulázanegativních stafylokoků jako původců močových infekcí je sporná, zato kmeny *S. saprophyticus* bývají považovány za primární patogeny, jsou tedy schopné vyvolávat močovou infekci i u jedinců s normálním močovým traktem [1].

S. saprophyticus subs. *saprophyticus* je kataláza-pozitivní, plazmakoagulázanegativní, gram-pozitivní kok, rezistentní k novobiocinu. Byl objeven v roce 1951 [20], nachází se na kůži lidí i primátů a vyznačuje se afinitou k buňkám epitelu urogenitálního traktu [18]. Nejčastěji bývá izolován z močí mladých, sexuálně aktivních žen, ale bývá nalézán taktéž u mužů. Způsobuje nespecifické záněty močové trubice u mladých žen, cystitidy, pyelonefritidy, urosepsy, u mužů také zánět prostaty [9, 12, 15, 17, 18]. V uplatnění na sliznicích mu pomáhá ureáza, která poškozují tkáň močového měchýře a povrchově asociovaný fibrilární protein, který má roli mezibuněčného adhezínu [8].

V literatuře je popsána rezistence *S. saprophyticus* k různým antibiotikům, často souvisí s původem vyšetřovaného materiálu [10, 11]. Nejčastěji je popisována rezistence k oxacilinu. Tato rezistence může souviset jednak s hyperprodukcí beta-laktamáz (v tomto případě jsou kmeny citlivé k inhibitorům beta-laktamáz, jako je např. klavulanát aj.) jednak s přítomností genu *mecA* [10, 11]. Ten byl pravděpodobně získán přenosem od methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA) či methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Přítomnost *mecA* genu poměrně dobře koreluje s rezistencí bakterií k cefoxitinu, proto je doporučeno používat k detekci methicilin-rezistentních kmenů *S. saprophyticus* disk s cefoxitinem [10].

S. saprophyticus je stejně jako jiné stafylokoky schopen tvořit biofilm. Biofilm je obvykle tvořen bakteriemi usazenými na pevném povrchu, které produkují polysacharidovou hmotu zvanou matrix, v níž drží buňky pohromadě [22, 24]. V biofilmu jsou bakterie chráněny před účinkem antibiotik [4, 13, 22, 24] a jsou tak obtížně eradikovatelné [22].

Cílem práce bylo zjistit rezistenci močových kmenů *S. saprophyticus* z naší spádové oblasti k různým antibiotikům, schopnost získaných kmenů tvořit biofilm, závislost jejich výskytu na pohlaví.

Materiál a metody

V období 1/2005 do 12/2009 bylo v naší laboratoři otestováno celkem 86 kmenů *S. saprophyticus*. Tyto kmeny pocházely z močí pacientů s diagnózou zánět močového měchýře-cystitis a nacházely se v moči v signifikantním množství, tj. více než 10^5 CFU/ml. Moč byla získána spontánním vymočením a pocházela ze středního proudu pacientů, kteří prošli urologickou ambulancí Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a podle urologického vyšetření splnili klinická kritéria pro danou diagnózu. Celkem bylo v naší laboratoři v daném časovém období otestováno 20 375 kultivačně pozitivních močí pocházejících od ambulantních pacientů Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně s diagnózou zánět močového měchýře a se signifikantní bakteriurií (tj. více než 10^5 CFU/ml), 87 kmenů *S. saprophyticus* tedy tvořilo 0,4 % z těchto kultivačně pozitivních močí.

Byla sledována jejich rezistence k vankomycinu, nitrofurantoinu, doxycyklinu, oxacilinu, amoxicilinu s klavulanátem, cefoxitinu a sulfamethoxazol/trimethoprimu. Každý kmen byl vyšetřen jen jednou. Kmeny byly pěstovány na běžných kultivačních půdách, *S. saprophyticus* byl určen pomocí Staphytestu 24 (Lachema, Česká republika) a rezistence k novobiocinu (Oxoid).

Určení citlivosti kmenů k antibiotikům bylo provedeno pomocí diskového difuzního testu. Bylo připraveno inokulum vyšetřovaného kmene o koncentraci 0,5 podle McFarlanda. Pomocí sterilního vatového tampónu bylo inokulum naočkováno na celý povrch Mueller-Hintonové agar (MH). Na takto připravený agar byly kladeny antibiotické disky firmy Oxoid.

Plotny byly umístěny do termostatu a inkubovány při 37 °C přes noc [23].

Po inkubaci byl posuvným měřítkem změřen průměr inhibičních zón. Průměr zóny inhibice byl porovnán s referenčními (hraničními) hodnotami pro citlivé kmeny. Vytvořil-li vyšetřovaný kmen inhibiční zónu o stejném nebo větším průměru, než je hraniční hodnota, byl interpretován jako citlivý k danému antibiotiku. Vytvořil-li vyšetřovaný kmen zónu o menším průměru, byl interpretován jako rezistentní k danému antibiotiku [23].

Tvorba biofilmu byla u všech 87 kmenů zjišťována modifikovanou Christensenovou metodou v malých 3ml polystyrenových zkumavkách (Dispolab, Česká republika) tak jako v Černožorská a Votava (2004). Byla použita 24hodinová kultivace vzorků v 1,5 ml tryptózosojeového bujónu při 37 °C. Po trojím promytí vodou byly pomocí 0,71% krystalové violeti prokazovány buňky adheované ke stěně zkumavky. Jako biofilm pozitivní byly označeny ty kmeny, které po obarvení tvořily na stěnách zkumavky souvislou obarvenou vrstvu [2, 3].

Dále byla zjišťována závislost nálezů na pohlaví a věku pacientů.

Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno celkem 87 kmenů *S. saprophyticus*. Nebyl nalezen žádný kmen rezistentní k vankomycinu, k nitrofurantoinu byly rezistentní 2 kmeny (2,3 %), k doxycyklinu 9 kmenů (10,3 %), k oxacilinu 20 kmenů (23,0 %), k amoxicilinu s klavulanátem a k cefoxitinu shodně 6 kmenů (6,9 %), k sulfamethoxazol/trimethoprimu 1 kmen (1,1 %) (graf 1).

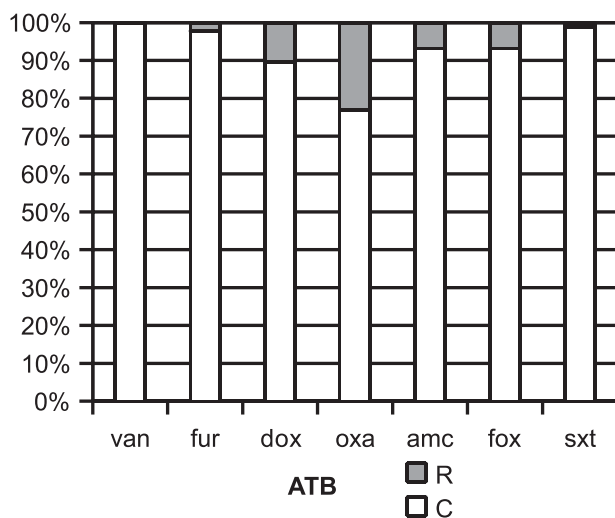
Z 87 kmenů *S. saprophyticus* pocházelo 20 kmenů od mužů a 67 od žen, nejčastěji se *S. saprophyticus* vyskytoval ve věkové skupině 21–25 let a 16–20 let (graf 2).

Biofilm tvořilo celkem 16 z 87 kmenů *S. saprophyticus* (18,4 %).

Diskuse

S. saprophyticus izolovaný od pacientů s diagnózou zánětu močového měchýře tvořil 0,4 % námi sledovaných kultivačně pozitivních močí, naproti tomu v literatuře [1, 19] je uváděn jako původce 5–20 % močových infekcí. Bohužel se v posledních letech neobjevila podrobná studie mapující stav v České republice. V zahraničí se současné studie týkající se *S. saprophyticus* zaměřují spíše na specifické kategorie, jako jsou mladé ženy [17], či pouze na muže [12], tato data tedy nelze dost dobře porovnat.

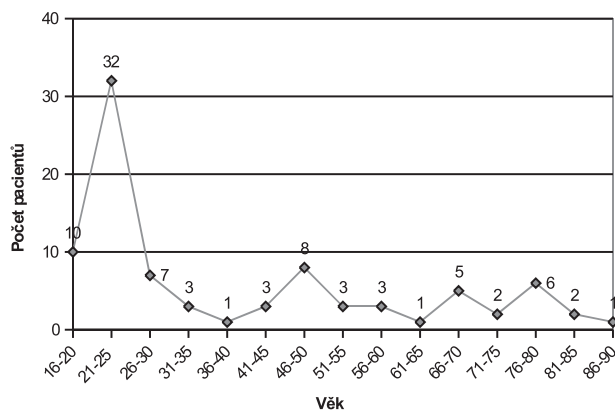
Rezistence *S. saprophyticus* k vybraným antibiotikům zůstává i nadále poměrně nízká, nejvýraznější je u oxacilinu (20 kmenů, 23,0 %), což může souviset s hyperprodukcí beta-laktamáz, či



Graf 1. Rezistence 87 kmenů *S. saprophyticus* k různým antibiotikům

Vysvětlivky: van – vankomycin, fur – nitrofurantoin, dox – doxycyklin, oxa – oxacilin, amc – amoxicilin/klavulanát, fox – cefoxitin, sxt – sulfamethoxazol/trimethoprim, R – rezistence, C – citlivost

Fig. 1. Resistance of 87 *S. saprophyticus* strains to antibiotics
Note: van – vancomycin, fur – nitrofurantoin, dox – doxycycline, oxa – oxacillin, amc – amoxicillin/ clavulanate, fox – cefoxitin, sxt – sulfamethoxazole/trimethoprim, R – resistance, C – susceptibility



Graf 2. Výskyt *S. saprophyticus* u různých věkových skupin

Fig. 2. Incidence of *S. saprophyticus* by age group

přítomností *mecA* genu [11]. Z těchto 20 kmenů bylo 6 kmenů zároveň rezistentních k cefoxitinu i k amoxicilinu s klavulanátem, dá se tedy usuzovat, že se jednalo o 6 methicilin-rezistentních kmenů a 14 kmenů s hyperprodukcí beta-laktamázy.

K terapii stafylokokových infekcí lze podle našeho sledování i nadále použít většinu doporučených antibiotik jako jsou sulfamethoxazol/trimethoprim, cefalosporiny I. generace, tetracyklin; v případě citlivosti daného kmene je možná i terapie oxacilinem či amoxicilinem s klavulanátem, v indikovaných případech pak vankomycinem [14, 19].

S. saprophyticus tvořil biofilm v 18,4 %. Ve srovnání s jinou studií [5], zaměřenou na koagulázanegativní stafylokoky u hospitalizovaných pacientů (30 % pozitivních izolátů), byla tvorba biofilmu nižší. Protože v obou studiích byla použita stejná detekční metoda, lze předpokládat, že kmeny pocházející od ambulantních pacientů tvoří biofilm méně často než kmeny od hospitalizovaných pacientů, což již bylo zjištěno u pseudomonád [6].

Ze získaných výsledků vyplývá, že *S. saprophyticus* je mnohonásobně častěji přítomen u mladých žen ve věku 16–25 let, což zmiňují rozmanité literární údaje [9, 15, 17]. Příčina tohoto jevu není doposud spolehlivě vysvětlena [9] – souvisí snad s užíváním spermicidních prostředků [7], s kolonizací střeva či pochvy a promiskuitou [21].

Závěr

S. saprophyticus je sice méně častým původcem močových infekcí, není ani výrazným producentem biofilmu, a dokonce ani rezistence k antibiotikům u něj není výrazná, jako je tomu například u pseudomonád, zato je patogenem primárním, který postihuje zejména mladší osoby, a neměl by proto být podceňován.

Literatura

1. **Bébrová, E.** *Etiologie infekcí močových cest*. In Teplan, V., Horáčková, M., Bébrová, E., Janda, J. a kol. *Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětském věku*. Praha: Grada Publishing, 2004. 38-41. ISBN 80-247-0566-4.
2. **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno et al.** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*, 1982, 37, 318-326.
3. **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J. et al.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 1985, 22, 996-1006.
4. **Costerton, J.W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P.** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318-1322.
5. **Černohorská, L., Votava, M.** Determination of Minimal Regrowth Concentration (MRC) in clinical isolates of various biofilm-forming bacteria. *Folia microbiol*, 2004, 49, 75-78.
6. **Černohorská L., Sláviková P.** *Pseudomonas aeruginosa*, její rezistence k vybraným antibiotikům a tvorba biofilmu u kmenů izolovaných od pacientů s infekcí močových cest. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2009, 4, 154-157.
7. **Fihn, S. D., Boyko, E. J., Chen, C. L. et al.** Use of spermicide-coated condoms and other risk factors for urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *Arch Intern Med*, 1998, 158 (3), 281-287.

8. **Gatermann, S., Kreft, B., Marre, R. et al.** Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect Immun*, 1992, 60 (3), 1055–1060.
9. **Gillespie, W. A., Sellin, M. A., Gill, P. et al.** Urinary tract infection in young women, with special reference to *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Pathol*, 1978, 31 (4), 348–350.
10. **Higashide, M., Kurda, M., Ohkawa, S. et al.** Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27 (6), 500–504.
11. **Higashide, M., Kurda, M., Omura, C. T. N. et al.** T. Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52 (6), 2061–2068.
12. **Hovellius, B., Colleen, S., Mardh, P. A.** Urinary tract infections in men caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *Arch Physiol Biochem*, 1984, 16 (1), 37–41.
13. **Hoyle, B. D., Costerton, J. W.** Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progr Drug Res*, 1991, 37, 91–105.
14. **Jedličková, A.** Antimikrobiální terapie v každodenní praxi. 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2004, 331 s. ISBN 80-85912-63-65.
15. **Jordan, P. A., Irvani, A., Richard, G. A. et al.** Urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. , 1980, 142 (4), 510–515.
16. **Kolář, M.** Antibiotická léčba komunitních infekcí močového traktu. *Urol. prax*, 2008, 1, 16–18.
17. **Latham, R. H., Running, K., Stamm, W. E.** Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA*, 1983, 250 (22), 3063–3066.
18. **Martineau, F., Picard, F. J., Ménard, Ch. et al.** Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (9), 3280–3284.
19. **Monhart, V., Brejtník, P., Herber, O.** Infekce urogenitálního traktu: Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné a praktické lékaře: 2007. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, 10 s. ISBN 80-86998-16-9.
20. **Petráš, P.** Jubilejní padesátý stafylokok, *Staphylococcus pettenkoferi*. Zprávy CEM (SZÚ Praha) 2007, 16 (7), 314–317.
21. **Rupp, M. E., Soper, D. E., Archer, G. L.** Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 (11), 2975–9.
22. **Stewart, P. S., Costerton, J. W.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 2001, 358, 135–138.
23. **Urbášková, P.** Vybrané metody. Praha: IPVZ, 1996, 32 s.
24. **Watnick, P., Kolter, R.** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*, 2000, 182, 2675–2679.

Do redakce došlo 14. 10. 2009

MUDr. Lenka Černohorská, Ph.D.
Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: lenka.cernohorska@fnusa.cz