

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 15 - 25

Molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego u pacjentów południowej Polski

Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical site infections of patients in southern Poland

Monika Pomorska-Wesołowska¹, Katarzyna Małyшек², Dorota Romaniszyn³,
Monika Pobiega³, Anna Szczypta⁴, Mirosława Dzikowska⁵, Agnieszka Chmielarczyk³,
Anna Różańska³, Joanna Maciąg⁶, Jadwiga Wójkowska-Mach³

¹Korlab s.c. NZOZ. Rudzkie Laboratorium Analityczno-Bakteriologiczne, Ruda Śląska

²Arcana Institute Ltd, Kraków

³Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

⁴Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Akademia Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Kraków

⁵Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

⁶Instytut Stomatologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Celem pracy była analiza lekooporności oraz molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego pacjentów 12 szpitali południowej Polski. Częstość występowania szczepów MRSA wynosiła ogółem 17,9% i była najniższa na oddziałach ortopedii – 8,7%, a najwyższa na oddziałach chirurgii naczyń – 42,9%. Najwyższą, około 25% lekooporność badanych szczepów stwierdzono w odniesieniu do erytromycyny, klindamycyny i ciprofloksacyny. Typowanie *spa* wykazało 10 typów, z dominacją t003 oraz t138.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, zakażenia miejsca operowanego, Polska, MRSA

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was a molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical site infections (SSIs) from patients in southern Poland, undergoing different surgical procedures, together with evaluation of the prevalence of antimicrobial resistance and the presence of virulence factors.

Materials and Methods: In this laboratory-based, multicentre study, non-repetitive 162 samples from SSI were collected from hospitalised patients (12 hospitals, n=139) or outpatients (n=23) in southern Poland between January 1 and December 31, 2013. In all *S. aureus* isolates, we investigated antimicrobial susceptibility, the presence of selected virulence genes (*lukE*, *pvl*, *tsst-1* and *eta*), and also conducted *spa* typing.

Results: Patients with SSI had a median age of 61 years; 54.9% were male. Prevalence of MRSA (29 strains, 17.9%) SSI per surgery type was 8.7% in orthopaedic, 17.7% in general and 42.9% in vascular surgery. Over 20% of strains were resistant for erythromycin (27.2%), clindamycin (23.5%) and ciprofloxacin (23.5%). No resistance was found for linezolid, glycopeptides or tigecycline. Gene of leukocidin (*lukE*) was the most frequently found gene. *Spa* typing identified 10 *spa* types; the two dominant types were t003 (41.4%) and t138 (17.2%).

Conclusions: The results show that after vascular surgery, there was an unexpectedly high prevalence of MRSA in SSIs in southern Poland. Conversely, the prevalence of MRSA was unexpectedly low following orthopaedics procedures. The surprisingly observation was the low virulence of the *S. aureus* strains among older patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, surgical site infections, Poland, MRSA

WSTĘP

Staphylococcus aureus pozostaje jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników zakażeń miejsca operowanego (ZMO). Przykładowo, w USA jest trzecim w kolejności najczęściej izolowanym drobnoustrojem (10). Wedle danych European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) dotyczących nadzoru nad ZMO u pacjentów operowanych w Europie *S. aureus* był odpowiedzialny za 17,4% przypadków ZMO, a jego udział wynosił od 4,5% na oddziałach chirurgii jelita cienkiego, do 40% na oddziałach ortopedycznych (7). Jednym z elementów warunkujących tak duży udział *S. aureus* w wywoływaniu ZMO jest wytwarzanie przez ten drobnoustrój wielu różnych czynników zjadliwości (4, 19, 6, 28).

Celem obecnego badania było określenie częstości występowania szczepów MRSA u pacjentów południowej Polski poddawanych różnego typu zabiegom operacyjnym oraz molekularna analiza tych szczepów, ze szczególnym uwzględnieniem występowania u nich genów kodujących wybrane czynniki zjadliwości i lekooporności.

MATERIAŁ I METODY

Pochodzenie szczepów bakteryjnych. Szczepy były izolowane w trakcie realizacji rutynowego postępowania diagnostycznego w Katedrze Mikrobiologii CMUJ w Krakowie oraz w Korlab s.c. NZOZ Rudzkie Laboratorium Analityczno-Bakteriologiczne. Szczepy pozyskiwano od pacjentów z obszaru południowej Polski (Małopolska i Śląsk). Szczegółowej analizie poddawano tylko pierwsze izolacje uzyskane w okresie od 1.01.2013 do 31.12.2013 od 162 pacjentów z objawami ZMO, rozpoznawanymi zgodnie z definicjami ZMO wg. ECDC, w terminie do 30 dni od operacji – bądź 1 roku w przypadkach stosowania implantów. Pacjenci byli leczeni w ramach opieki szpitalnej (12 szpitali, 139 szczepów) albo ambulatoryjnej (23 szczepy). Ogółem uzyskano 162 szczepy *S. aureus*, w tym 29 szczepów MRSA. Wyniki badania niektórych szczepów (n=23) zostały opisane we wcześniejszej publikacji, której celem była analiza profilu epidemiologicznego *S. aureus* w różnych klinicznych zakażeniach, w tym skóry i tkanek miękkich (w tym

innych niż ZMO) (3). W niniejszej pracy określano wiek i płeć pacjentów z ZMO oraz typ zabiegu operacyjnego, któremu byli poddawani: chirurgia ogólna, naczyniowa, ortopedia i inne. W żadnym ze szpitali/oddziałów nie realizowano rutynowego nadzoru nad MRSA obejmującego badania przesiewowe oraz eradykację. Wszystkie szczepy przechowywano w temperaturze -70°C.

Badanie lekowrażliwości szczepów. Badanie lekowrażliwości 162 szczepów *S. aureus* realizowano zgodnie z zaleceniami European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. W metodzie dyfuzyjno-krążkowej wykorzystano następujące krążki (Oxoid, Basingstoke, UK): cefoksytyna (FOX, 30 µg), klindamycyna (DA, 2 µg), erytromycyna (E, 15 µg), ciprofloksacyna (CIP, 5 µg), moksyflokscyna (MXF, 5 µg), gentamycyna (CN, 10 µg), amikacyna (AK, 30 µg), tobramycyna (TOB, 10 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1.25/23.75 µg), mupirocyna (MUP, 200 µg) oraz linezolid (LZD, 10 µg) (8). W odniesieniu do wankomycyny (VAN), teikoplaniny (TEC) oraz tygecykliny (TGC) określano najmniejsze stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów (ang. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) z wykorzystaniem E-testów (bioMérieux, Paris, France). Fenotyp oporności MLSB badano metodą dwóch krążków, z krążkiem z erytromycyną umieszczonym w pobliżu krążka z klindamycyną.

Izolacja DNA. Badane szczepy bakteryjne hodowano w bulionie tryptozowo-sojowym w 37°C przez noc, a następnie izolowano genomowe DNA z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) zgodnie z instrukcją producenta.

Detekcja genów oporności i wirulencji z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). U wszystkich badanych izolatów (n=162) poszukiwano obecności genów oporności. Metodę PCR wykorzystano do amplifikacji genu *mecA* (154 par zasad, pz) z zastosowaniem opisanych wcześniej starterów (20). Jako dodatknej kontroli używano szczepu *S. aureus* ATCC 33591 (*mecA*+), a jako ujemnej kontroli szczepu *S. aureus* ATCC 25923 (*mecA*-). Metoda PCR była także zastosowana do wykrywania genu oporności na mupirocynę – *mupA* (458 pz) (1). W tym przypadku dodatnią kontrolę stanowił szczep *S. aureus* ATCC BAA-1708 (*mupA*+). Geny oporności na erytromycynę (*ermA* -645 pz, *ermB* -639 pz, *ermC* – 642 pz, i *msr*- 399 pz) były wykrywane metodą multipleks PCR, a w przypadku uzyskania dodatnich wyników, przy użyciu pojedynczych reakcji PCR, z poszczególnymi starterami (133). W prowadzonych badaniach poszukiwano najczęściej wykrywanych genów oporności związanych z występującymi mechanizmami oporności: MRSA (*mecA*) oraz MLSB (*msr*, *ermA*, *ermB*, *ermC*). Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5xTBE (70 min, 90V) i wizualizowano w transiluminatorze UVP GelDocIT Imaging System (UVP, Upland, Canada). W elektroforezie stosowano marker wielkości 100-1000 pz (ThermoScientifics, Waltham, MA, USA). Izolaty *S. aureus* były także badane pod kątem obecności wybranych genów wirulencji z wykorzystaniem metody PCR z opisanymi wcześniej starterami: *lukE* (leukocydyna *lukE* 269 pz), *pvl* (leukocydyna Panton-Valentine, PVL 433 pz), *tsst-1* (toksyna zespołu wstrząsu toksycznego, TSST 559 pz) oraz *eta* i *etb* (eksfoliatyna A i B, 119 pz i 200pz) (11, 13, 14). Jako dodatnich kontroli użyto szczepów *S. aureus* o numerach 2535/07 (*eta*+, *etb*+, *lukE*+), 6616/09 (*tsst1*+, *pvl*+) użyczonych przez Prof. Marka Gniadkowskiego z Narodowego Instytutu Leków z Warszawy.

Genotypowanie *spa* oraz RFLP-PFGE. Wszystkie izolaty MRSA (n=29) poddano typowaniu *spa*. Wykonano sekwencjonowanie genu *spa* kodującego polimorficzny region X białka A *S. aureus*. W tym celu, przy użyciu metody PCR, amplifikowano gen *spa*, a produkty amplifikacji rozdzielano elektroforezą w 1,5% żelu agarozowym (31, 5). Produkty PCR sekwencjonowano w zewnętrznym laboratorium (Genomed, Warsaw, Poland). Sekwencje nukleotydowe amplikonów były analizowane w celu określenia różnych typów *spa* dla poszczególnych izolatów z wykorzystaniem strony internetowej Ridom, prowadzonej przez Ridom GmbH (Münster, Germany) (24).

Wszystkie izolaty MRSA (n=29) poddano genotypowaniu z wykorzystaniem metody RFLP-PFGE (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism by Pulsed-Field Gel Electrophoresis) według opublikowanego wcześniej protokołu z drobnymi modyfikacjami, używając aparatu CHEF-DR III (Bio-Rad) (17). Program GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) był wykorzystany do przeprowadzenia analizy podobieństwa, stosowano współczynnik Dice i metodę średniego wiązania (UPGMA, ang. the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Na dendrogramie podobieństwa (Ryc. 1) zaznaczono izolaty o identycznych pulsotypach (zaliczono je do jednego klonu), jako wzorca używano szczepu *S. aureus* ATCC 11632.

Analiza statystyczna. Dane nominalne porównywano stosując test Fisher'a, wykorzystano Statistica 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Istotność statystyczną przyjęto na poziomie 0,05.

Komisja Bioetyczna. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/227/B/2012).

WYNIKI

Badane przypadki ZMO i lekooporność *S. aureus*. Mediana wieku pacjentów wyniosła 61 lat, mężczyźni stanowili 54,9% badanych. Szczepy MRSA (n=29 ogółem) były istotnie częściej izolowane od starszych pacjentów (67 vs. 60 lata, p=0,005) oraz od pacjentów po zabiegach w zakresie chirurgii naczyniowej, gdzie ryzyko MRSA było czterokrotnie wyższe niż MSSA (20,7% vs. 6,0%, OR 4,08 95% CI 1,293–12,849, p=0,02).

Najczęstszy profil oporności dotyczył 90 szczepów (55,6%), które nie wykazały oporności na żaden z badanych antybiotyków, natomiast 7 szczepów (4,3%) wykazało oporność na każdy z antybiotyków poza linezolidem, glikopeptydami i tygecykliną – na te antybiotyki wszystkie przebadane szczepy pozostawały wrażliwe. Najwyższą lekooporność badane szczepy wykazywały wobec makrolidów (erytromycyna), linkozamidów oraz fluorochinolonów. Częstość występowania MRSA wyniosła ogółem 17,9%. Dokładna analiza wykazała jednak znaczące różnice w zależności od oddziału szpitalnego, na którym byli hospitalizowani pacjenci. I tak, na oddziałach ortopedii częstość ta wynosiła 8,7%, na oddziałach chirurgii ogólnej 17,7% a na oddziałach chirurgii naczyń 42,9% . Znacząco wyższy udział szczepów lekoopornych na różne grupy antybiotyków stwierdzono w przypadku konstytutywnego fenotypu cMLSB niż indukcyjnego fenotypu iMLSB (p=0,00156), ale ryzyko oporności MLSB nie miało związku z typem operacji. Szczepy MRSA były w znacznie większym stopniu odporne na antybiotyki, dotyczyło to szczególnie lekooporności na 5 albo więcej grup antybiotyków (Tabela 2). Wartość MIC_{50}/MIC_{90}

wankomycyny i teikoplaniny dla szczepów MRSA wynosiła 1/1,5 mg/ml natomiast tygecykliny: 0.064/0.125 mg/ml. Gronkowce o fenotypie MLSB przejawiały wyższe wartości MIC glikopeptydów (VAN/TEC), ($p=0,002$) (obserwacja ta nie dotyczyła MIC tygecykliny). Obecność genu oporności na mupirocynę stwierdzono u jednego szczepu MSSA, ale badanie fenotypowe tego szczepu nie wykazało oporności.

Tabela 1 Charakterystyka pacjentów z objawami zakażenia miejsca operowanego o etiologii *Staphylococcus aureus*

Charakterystyka badanej grupy		ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value	prewalencja MRSA (%)
Wiek (lata) (mediana, kwartyle: Q1;Q3)		61 (48;69)	67 (58;80)	60 (48;68)	N/A	0,0048	N/A
Płeć	kobiety (n;%)	73 (45,1)	11 (37,9)	62 (46,6)	1,34 (0,596-3,022)	0,39434	14,7
	mężczyźni (n;%)	89 (54,9)	18 (62,1)	71 (53,4)			20,2
Typ zabiegu operacyjnego	ogólna (n;%)	113 (69,8)	20 (69,0)	93 (69,9)	0,96 (0,401-2,281)	0,90354	17,7
	ortopedia (n;%)	23 (14,2)	2 (6,9)	21 (15,8)	0,36 (0,079-1,630)	0,17233	8,7
	naczyniowa (n;%)	14 (8,6)	6 (20,7)	8 (6,0)	4,08 (1,293-12,849)	0,02098	42,9
	inne (n;%)	12 (7,4)	1 (3,5)	11 (8,3)	0,39 (0,049-3,196)	0,32889	8,3
	ogółem	162 (100)	29 (100)	133 (100)	N/A	0,157	17,9

MRSA metycylinooporny *Staphylococcus aureus*, MSSA metycylinowrażliwy *Staphylococcus aureus*; OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio; N/A nie dotyczy

Czynniki zjadliwości i genotypowanie. U badanych izolatów najczęściej stwierdzano obecność genu kodującego leukocydynę *lukE* (Tabela 3). Udział *tsst-1* był istotnie wyższy u szczepów izolowanych od pacjentów oddziałów chirurgii ogólnej (51,7% vs 26,3, OR=2,61; 95% CI: 1,146–5,959; $p=0,05$). Najmniejszą liczbę badanych czynników stwierdzono u szczepów pochodzących od pacjentów z ZMO z oddziałów ortopedycznych (27,6% vs. 88,7%, OR=0,33; 95% CI 0,126–0,885; $p=0,03$). Gen kodujący eksfoliatynę *eta* stwierdzono u istotnie młodszych pacjentów (mediana wieku (Q1;Q3): 34 (31;55) vs. 61 (50;70), $p=0,0009$). Liczba czynników zjadliwości, a zatem i stopień zjadliwości nie miał związku z fenotypem MRSA czy MLSB.

Analiza profili restrykcyjnych izolatów MRSA po cięciu enzymem *SmaI* w typowaniu PFGE nie ujawniła jednego dominującego klonu epidemicznego: 29 izolatów wykazywało 27 różnych pulsotypów, większość z nich charakteryzowała się podobieństwem na poziomie poniżej 70%-80%, co sugeruje genetycznie różnorodną populację. Znalezione dwie pary szczepów o identycznych pulsotypach, pochodziły one z różnych szpitali. Typowanie *spa* wykazało 10 różnych typów *spa*, dominowały dwa główne typy: t003 (41.4%) i t138 (17.2%). Spośród trzech szczepów MRSA posiadających gen *pvl* dwa należały do typu t138, a jeden do t003. Wszystkie pulsotypy, typy *spa* oraz geny wirulencji dla szczepów MRSA są przedstawione na Rycinie 1.

Tabela 2. Lekooporność *Staphylococcus aureus* wg. fenotypu: MSSA vs. MRSA

Kategoria antybiotyków	Lek przeciw/drobnoustrojowy	ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value
aminoglikozydy	gentamycyna	21 (13,0)	11 (38,0)	10 (8,0)	7,52 (2,6- 20,208)	<0,0004
	amikacyna	37 (22,8)	21 (72,0)	16 (12,0)	19,19 (7,295-50,51)	<0,0001
	tobramycyna	34 (21,0)	23 (79,0)	11 (8,0)	42,52 (14,295-126,447)	<0,0001
fluorochinolony	ciprofloksacyna	38 (23,5)	26 (90,0)	12 (9,0)	87,39 (23,015-331,822)	<0,0001
	moksyflokscacyna	31 (19,1)	24 (83,0)	7 (5,0)	86,4 (25,308-294,967)	<0,0001
linkozamidy	klindamycyna	38 (23,5)	22 (76,0)	16 (12,0)	22,982 (8,470-62,358)	<0,0001
makrolidy	erytromycyna	44 (27,2)	22 (76,0)	22 (17,0)	15,86 (6,037-41,652)	<0,0001
glikopeptydy	wankomycyna	0	0	0	N/A	N/A
	teikoplanina	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	N/A	N/A
glicylocykliny	tygecyklina	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	N/A	N/A
oksazolidony	linezolid	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	N/A	N/A
inne	mupirocyna	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,8)	N/A	0,67311
	trimetoprim/sulfametoksazol	16 (9,9)	8 (28,0)	8 (6,0)	5,95 (2,014-17,590)	<0,00145
MLSB, tak (n;%)		40 (75,3)	21 (72,4)	19 (14,3)	15,75 (6,102-40,650)	<0,0001

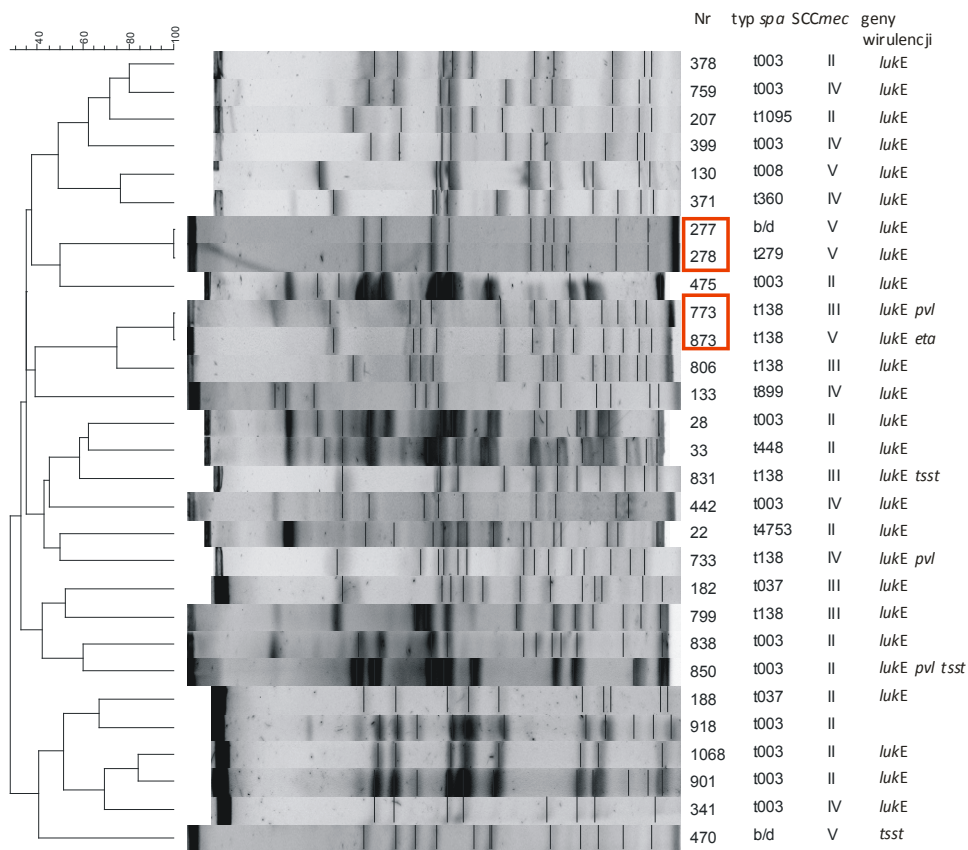
MRSA metycylinooporny *Staphylococcus aureus*, MSSA metycylinowrażliwy *Staphylococcus aureus*; OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio; N/A nie dotyczy

Tabela 3. Obecność genów warunkujący czynnik zjadliwości wg fenotypu: MSSA vs. MRSA

Gen warunkujący czynnik zjadliwości, tak	ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value
<i>lukE</i> (n;%)	145 (89,5)	27 (93)	118 (89)	1,72 (0,370-7,953)	0,37902
<i>tsst-1</i> (n;%)	29 (17,9)	4 (14)	25 (19)	0,69 (0,221-2,165)	0,71168
<i>pvl</i> (n;%)	9 (5,8)	3 (10)	6 (5)	2,44 (0,574-10,399)	0,20345
<i>eta</i> (n;%)	10 (6,2)	1 (3)	6 (5)	0,76 (0,088-6,531)	0,43595
Liczba znalezionych genów [n;%]					
0 (n;%)	10 (6,2)	1 (3)	9 (7)	0,49 (0,059-4,044)	0,646
1 (n;%)	114 (70,4)	22 (76)	92 (69)	1,40 (0,554-3,538)	
2 (n;%)	35 (21,6)	5 (17)	30 (23)	0,72 (0,251-2,036)	
3 (n;%)	3 (1,9)	1 (3)	2 (2)	2,34 (0,205-26,703)	

lukE LukDE leukocydyny, *pvl* leukocydyna Panton-Valentina, *tsst-1* toksyna toxic shock syndrome toxin-1, *eta* eksfoliatyna A, OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio; N/A nie dotyczy

Rycina 1. Dendrogram podobieństwa izolatów MRSA genotypowanych przy użyciu metody PFGE wraz z typami *spa* i genami wirulencji. Ramkami oznaczono szczepy o identycznych pulsotypach.



DYSKUSJA

Prezentowane dane są wynikami pierwszych wielośrodkowych badań poświęconych mikrobiologii ZMO w Polsce. Dotychczas dostępne dane dotyczące zakażeń uogólnionych z roku 2013 wskazują na udział MRSA na poziomie 16% oraz ponad 15% ich udział w różnych formach klinicznych zakażeń w szpitalach wieloprofilowych, co było nieco niższym poziomem niż średnia europejska (3, 7). W badaniach *Luczak-Kadłubowskiej* i wsp. (15) MRSA w zakażeniach miejsca operowanego w Polsce, występowały z częstotnością 22,7%. Podobnie wyniki uzyskano w badaniu *Matyni* i wsp. (16), w którym dodatkowo analizowano częstość występowania szczepów MRSA w zależności od województwa – w woj. małopolskim MRSA stanowił 20,5% izolatów *S. aureus*, w woj. śląskim 16,1%. W pracach tych nie podawano typów zabiegów operacyjnych, po których stwierdzano ZMO, co zgodnie z prezentowanymi danymi ma istotne znaczenie w epidemiologii MRSA.

Wcześniej jednośrodkowe badania autorów wykazały ryzyko MRSA po zabiegach kardiochirurgicznych i ortopedycznych na poziomie porównywalnym do danych ogólnoeuropejskich ECDC (35, 36), podczas gdy w bieżącej analizie udział MRSA zna-

cząco różnił się w zależności od typu oddziału i był niższy od opisywanego przez ECDC (7). Szczególnie zwraca uwagę niska częstość występowania MRSA u pacjentów po zabiegach ortopedycznych, przy braku w badanych szpitalach rutynowego nadzoru nad MRSA.

Przeprowadzone badania wykazały, że analizowane przez nas szczepy rzadko posiadały geny kodujące poszczególne geny zjadliwości, co wskazuje na potencjalnie ich niską zjadliwość. Gen kodujący *tsst-1* był obecny w większej części szczepów niż *pvl* (17,9% szczepów vs. 5,5%). Wysoki udział *tsst-1* raportował również Rijnders (25) na podstawie badań *S. aureus* holenderskich oddziałów intensywnej terapii (21%). Jednak prezentowane dane odbiegają od obserwacji Schmitza (30), który wskazywał na wyższy udział *tsst-1* u szczepów fenotypu MRSA (MSSA 8% vs. MRSA 16%). W badaniach Chini i wsp. (2) stwierdzono wyższą niż w niniejszej pracy częstość występowania genu *pvl* (14% szczepów vs. 5,8%), a udział lekoopornych szczepów z genem *pvl* był nawet znacznie wyższy (4,6% MSSA vs. 23% MRSA) niż w prezentowanych danych w tej pracy (5,0% MSSA vs. 10,0% MRSA) – jednak tendencja pozostała taka sama. Prezentowane wyniki nie wskazują na powiązanie pomiędzy genami wirulencji, szczególnie *pvl* z konkretnym typem *spa*.

W niniejszym badaniu wykazano odwrotną zależność pomiędzy wiekiem pacjentów, a obecnością u badanych szczepów genów kodujących eksfoliatynę. Wynika z tego, że nie można wykluczyć ryzyka rozwoju zakażeń ZMO u starszych pacjentów szczepami nie posiadającymi pełnej zjadliwości.

Wielolekooporność szczepów ze ZMO wyniosła w badanej populacji 17,9%, ale co ważne, szczepy MRSA statystycznie istotnie częściej były odporne również na wiele innych grup leków. Spostrzeżenie to potwierdza wyniki uzyskane przez innych autorów (2, 16, 29). Obserwowana w naszych badaniach częstość występowania szczepów MRSA jest wysoka, chociaż pojedyncze doniesienia z Polski, jak i z innych krajów, zwłaszcza rozwijających się, wykazują jeszcze wyższy, sięgający 30-90%, udział MRSA wśród izolatów *S. aureus* (12, 21, 35, 27). Niniejsza analiza potwierdza niestety szczególne narażenie na MRSA pacjentów starszych, co znajduje również potwierdzenie we wcześniejszych wynikach uzyskanych przez autorów, pokazujących korelację pomiędzy wiekiem pacjentów a częstością izolacji szczepów MRSA jak i opornością tych szczepów na antybiotyki inne niż beta-laktamy, zwłaszcza trimetoprim z sulfametoksazolem (23).

Uzyskane w naszych badaniach wartości MIC odpowiadają danym uzyskanym przez Takesue (34), a brak wcześniejszych danych z Polski uniemożliwia ocenę dynamiki zmian w wartościach MIC.

Liczne wcześniejsze doniesienia wskazywały na możliwy, odwrotnie proporcjonalny, związek pomiędzy lekoopornością szczepów a ich zjadliwością (29, 18). Zarówno jednak niniejsze dane, jak i wcześniejsze prace autorów nie potwierdzają istnienia podobnego związku w badanych szczepach pochodzących z przypadków zakażeń u pacjentów południowej Polski (22, 27).

W prezentowanej pracy, podobnie jak w doniesieniach Perl'a (21), stwierdzono występowanie oporności badanych szczepów na mupirocynę na niskim poziomie. Jednak co ważne, brak wrażliwości nie został wykryty metodą dyfuzyjno-krażkową, co wskazuje na konieczność realizacji badań przesiewowych dla oznaczenia oporności na mupirocynę technikami PCR.

Wynik typowania *spa* szczepów MRSA wykazał dominację typu t003 (ponad 40%), należącego do kompleksu klonalnego CC5. Podobny typ *spa* dominował w badaniach prowadzonych przez Ilczyszyn i wsp. (9) właśnie w grupie szczepów MRSA pomimo, że badane szczepy izolowane były z zakażeń inwazyjnych całkiem innej grupy pacjentów - dzieci

i noworodków. Drugim znaczącym w naszych badaniach typem *spa* był t138 związany w literaturze z kompleksem klonalnym CC8 (32)

Wynik typowania izolatów metodą RFLP-PFGE pokazuje duże genetyczne zróżnicowanie szczepów MRSA pochodzących od pacjentów ze ZMO, co sugeruje, że nie pochodzą one z jednego źródła. Nie zidentyfikowano żadnego klonu epidemicznego, co świadczy o braku transmisji horyzontalnej. Oznacza to, że kolonizacja szczepami MRSA dokonywała się u badanych pacjentów w środowisku pozaszpitalnym. Dotyczyło to przede wszystkim pacjentów chirurgii naczyniowej, gdzie istnieje duże ryzyko konieczności hospitalizacji i operacji pacjentów z ranami przewlekłymi. Zatem w tej grupie pacjentów nadzór nad zakażeniami MRSA powinien obejmować również badania przesiewowe próbek materiału z ran oraz stosowaniem odpowiednich leków, np. oktenidyny (26). Potwierdzają to dane opisujące różnorodność szczepów MRSA izolowanych w szpitalach Polski południowej nie tylko z zakażeń miejsca operowanego ale również innych form klinicznych zakażeń, mających podstawowe znaczenie w epidemiologii zakażeń w szpitalach (3).

Podsumowując należy stwierdzić, że uzyskane wyniki wskazują na konieczność stosowania u pacjentów z przewlekłymi ranami profilaktyki zakażeń o etiologii MRSA uwzględniającego stosowanie również przedoperacyjnej eradykacji MRSA z ran przewlekłych.

Badanie było finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki: DEC-2011/03/B/NZ7/01911.

PIŚMIENNICTWO

1. Anthony RM, Connor AM, Power EG i inni. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 30-4.
2. Chini V, Petinaki E, Foka A i inni. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 29-34.
3. Chmielarczyk A, Pomorska-Wesołowska M, Szczypta A i inni. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from different types of infections from patients hospitalized in 12 regional, non-teaching hospitals in southern Poland. *J Hosp Infect* 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.10.024>
4. Grimes J, Carpenter C, Reinker K. Toxic shock syndrome as a complication of orthopaedic surgery. *J Pediatr Orthop* 1995; 15: 666-71.
5. Harmsen D, Claus H, Witte W i inni. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-8.
6. Holmes A, Ganner M, McGuane S i inni. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2384-90.
7. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx (access 9.08.2016)
8. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf (access 9.04.2015)

9. Ilcyszyn WM, Sabat AJ, Akkerboom V i inni. Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, spa Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers. PLoS One 2016; 11: e0151937.
10. Jarnigan J. Is the burden of *Staphylococcus aureus* among patients with surgical-site infections growing? Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 457-60.
11. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP i inni. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 426-30.
12. Leski TA, Gniadkowski M, Skoczyńska A i inni. Outbreak of mupirocin-resistant staphylococci in a hospital in Warsaw, Poland, due to plasmid transmission and clonal spread of several strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 2781-8.
13. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F i inni. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32.
14. Løvseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J Clin Microbiol 2004; 42: 3869-72.
15. Łuczak-Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J i inni. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. J Clin Microbiol 2008; 46: 2930-7.
16. Matynia B, Młodzinska E, Hryniewicz W. Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 379-85.
17. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE i inni. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clinical Microbiology 2003; 41: 5113-20.
18. Melzer M, Eykyn J, Gransden R, Chinn S. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* More Virulent than Methicillin-Susceptible *S. aureus*? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. Clin Infect Dis 2003; 37: 1456-60.
19. Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. Microbiol Immunol 2003; 47: 81-90.
20. Pereira EM, Schuenck RP, Malvar KL i inni. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. Microbiol Res 2010; 165: 243-9.
21. Perl TM, Cullen JJ, Wenzel R i inni. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 2002; 346: 1871-7.
22. Pobiega M, Myjak I, Pomorska-Wesołowska M i inni. Virulence Potential of *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated From Diabetic Foot Ulcers Among Patients From Southern Poland. Curr Vasc Pharmacol. 2016 Jun 24.
23. Pomorska-Wesołowska M, Różańska A, Natkaniec J i inni. Longevity and gender as the risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in southern Poland. BMC Geriatr. 2017;10;17(1):51. doi: 10.1186/s12877-017-0442-3.
24. RidomSpaServer, available from <http://www.spaserver.ridom.de/> (access 9.04.2015).
25. Rijnders MI, Deurenberg RH, Boumans ML i inni. Antibiotic Resistance Surveillance Group, Stobberingh EE: Population structure of *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care unit patients in the Netherlands over an 11-year period (1996 to 2006). J Clin Microbiol 2009; 47: 4090-5.
26. Rohr U, Mueller C, Wilhelm M i inni. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* whole-body decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidinedi hydrochloride J Hosp Infect 2003; 54: 305-9.

27. Romaniszyn D, Różańska A, Wójkowska-Mach J i inni. Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* infections – data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009-2012. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 169.
28. Ruzickova V, Voller J, Pantucek R i inni. Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50: 499-502.
29. Sapri HF, Sani NAM, Neoh H, Hussin S. Epidemiological Study on *Staphylococcus aureus* Isolates Reveals Inverse Relationship between Antibiotic Resistance and Virulence Repertoire. *Indian J Microbiol* 2013; 53: 321-2.
30. Schmitz FJ, MacKenzie CR, Geisel R i inni. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 699-708.
31. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO i inni. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3556-63.
32. Shore AC, Brennan OM, Deasy EC i inni. DNA microarray profiling of a diverse collection of nosocomial methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates assigns the majority to the correct sequence type and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type and results in the subsequent identification and characterization of novel SCCmec-SCCM1 composite islands. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5340-55.
33. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A i inni. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2562-6.
34. Takesue Y, Watanabe A, Hanaki H i inni. Nationwide surveillance of antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from surgical site infections (SSI) in Japan. *J Infect Chemother* 2012; 18: 816-26.
35. Wójkowska-Mach J, Baran M, Synowiec E i inni. Surgical site infections following cardiac surgery supervision-own experience. *Przegląd Lekarski*, 2008; 65: 335-9.
36. Wójkowska-Mach J, Jaje E, Romaniszyn D i inni. Comparison of SSI rate in endoarthoplasty of hip and knee in a Cracow patient population and the importance of post discharge surveillance. *Infection* 2008; 36: 36-40.

Otrzymano: 21 XI 2016 r.

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysa 18, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków