

Monika Broda, Ireneusz Ciebiada, Andrzej Denys

KLONALNA TRANSMISJA METYCYLINO-OPORNEGO SZCZEPU
S. AUREUS (MRSA) W DWÓCH ODDZIAŁACH ZABIEGOWYCH
SZPITALA ŁÓDZKIEGO¹

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej Katedry Mikrobiologii UM w Łodzi
Kierownik: Andrzej Denys

*Dokonano fenotypowej i genotypowej charakterystyki szczepów
S. aureus izolowanych z wybranych oddziałów zabiegowych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Pirogowa w Łodzi.*

Słowa kluczowe: MRSA, PCR MP, zakażenia szpitalne

Key words: MRSA, PCR MP, nosocomial infections

WSTĘP

Bakterie należące do gatunku *S. aureus* dysponują bogatym wachlarzem czynników wirulencji, które – działając samodzielnie bądź w heterogenicznych zestawieniach – odpowiadają za zróżnicowany obraz procesu chorobowego (1). Ponadto doskonale przystosowują się do zmiennych warunków otoczenia, czego przykładem jest wypracowywanie mechanizmów oporności chroniących je przed każdym nowo wprowadzonym do leczenia związkiem o aktywności przeciwbakteryjnej (2). Metycylino-oporny *S. aureus* (ang. *methicillin-resistant S. aureus* – MRSA) jest jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych, wykazującym dodatkowo cechę wielolekooporności, co poważnie ogranicza możliwości terapeutyczne omawianych infekcji. Lekami z wyboru pozostają tu nadal antybiotyki glikopeptydowe, mimo narastającego już od kilku lat problemu spowodowanego pojawieniem się szczepów *S. aureus* opornych na wankomycynę. Na przestrzeni ostatnich dwóch dekad zmienił się również profil hospitalizowanych osób. Znakomita ich większość będący w bardzo poważnym stanie pacjenci osłabieni immunologicznie, ze skrajnych grup wiekowych, wymagający zwykle zastosowania inwazyjnych technik diagnostyczno-terapeutycznych (3,4). W połączeniu z długotrwałą presją selekcyjną antybiotyków zwiększa to ryzyko kolonizacji i zakażenia szczepami MRSA (5). Opisano wiele innych czynników ryzyka tych infekcji, zarówno w placówkach służby zdrowia, jak i poza nimi

¹ Badania finansowane przez UM w Łodzi (nr grantu: 502-15-377)

(3,6-9). W konsekwencji, zwiększona zachorowalność, śmiertelność i wydłużona hospitalizacja obciążają szpitalny budżet. Szczepy MRSA określane mianem „drobnoustrojów alarmowych”, muszą pozostawać w polu ciągłego zainteresowania nauk medycznych tak, aby podlegać stałej kontroli, która – przy użyciu odpowiednich narzędzi badawczych – nadążałaby za ich zmienną naturą.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 50 szczepów *S. aureus* wyizolowanych w okresie od 01.09.2004 do 31.08.2005, z trzech oddziałów zabiegowych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Pirogowa w Łodzi. Z oddziału chirurgicznego pochodziło 41 izolatów, z oddziału urologicznego – 4, z oddziału laryngologicznego – 5. Z bieżącego materiału klinicznego wyizolowano 37 szczepów (w tym: 29 – z rany pooperacyjnej, 4 – z krwi, 2 – z moczu oraz po jednym szczepie z wymazu z ucha i nosa), od personelu medycznego – 12 szczepów (w tym: 2 – z wymazów z rąk, 10 – z przedśionka nosa). Jeden szczep pochodził ze środowiska szpitalnego: z umywalki znajdującej się w pokoju opatunkowym oddziału urologicznego. Lekooporność i właściwości biochemiczne izolatów oceniano przy użyciu rutynowych technik mikrobiologicznych (10). Przeprowadzono analizę molekularną izolatów przy użyciu metody PCR MP (ang. *polymerase chain reaction melting profiles*); wykonano w firmie „DNA Gdańsk II” (11). Optymalna temperatura denaturacji (80°C) została eksperymentalnie wyznaczona dla kilku wybranych izolatów *S. aureus* przy użyciu termocyklera gradientowego (Biometra Tgradient Engine) przy zastosowaniu gradientu temperaturowego (78,3-81,3°C) na etapie denaturacji, w mieszaninie reakcyjnej PCR.

WYNIKI

Właściwości fenotypowe szczepów *S. aureus* oceniano na podstawie prezentowanych przez nie wzorów lekooporności oraz profili biochemicznych. W tabeli I przedstawiono wyniki analizy antybiotykooporności. Metacyliny-oporność wykazano u 24 spośród 50 izolatów, z czego 21 szczepów MRSA pochodziło z oddziału chirurgicznego, 2 szczepy – z oddziału urologicznego i 1 szczep – z oddziału laryngologicznego. Spośród 24 szczepów MRSA – 19 wyizolowano z materiału klinicznego, 4 szczepy – od personelu medycznego i 1 szczep – z nieożywionego środowiska szpitalnego. Większość izolatów MRSA (19 z 24) posiadała cechę wielolekooporności, zdefiniowaną jako oporność na badane antybiotyki β -laktamowe i jednocześnie oporność na trzy lub więcej spośród pozostałych badanych grup antybiotyków. W przypadku metacyliny-wrażliwych szczepów *S. aureus* większość, tj. 18 z 26, nie była wielolekooporna. Profil biochemiczny wszystkich izolatów oceniano w oparciu o prezentowaną przez nie aktywność enzymatyczną tego samego zestawu enzymów – wg testu API Staph (bioMérieux). Każdy różniący się od pozostałych kod numeryczny API Staph traktowano jako odrębny profil aktywności biochemicznej. W ten sposób dla *S. aureus* wyodrębniono 12 odmiennych biotypów (tabela II). Wyodrębniono grupy izolatów *S. aureus* o bardzo zbliżonych charakterystykach fenotypowych zakładając, iż te właśnie szczepy wykazują pokrewieństwo genetyczne. Dlatego wszystkie izolaty poddano analizie genetycznej przy użyciu nowej techniki biologii molekularnej PCR MP. Wśród izolatów

Tabela I. Antybiotykooporność szczepów *S. aureus*Table I. Antibiotic resistance of *S. aureus* strains

Antybiotyk	Szczepy <i>S. aureus</i> (N=50)					
	Oporne		Średniowrażliwe		Wrażliwe	
	n	%	n	%	n	%
FOX	24	48,00	0	0,00	26	52,00
P	40	80,00	0	0,00	10	20,00
E	30	60,00	0	0,00	20	40,00
CC	29	58,00	0	0,00	21	42,00
CIP	19	38,00	3	6,00	28	56,00
SXT	15	30,00	1	2,00	34	68,00
GM	22	44,00	0	0,00	28	56,00
TE	36	72,00	0	0,00	14	28,00
FA	1	2,00	0	0,00	49	98,00
VA	0	0,00	0	0,00	50	100,00
TEC	0	0,00	0	0,00	50	100,00
MUP	0	0,00	0	0,00	50	100,00

FOX – cefoksytyna, P – penicylina, E – erytromycyna, CC – klindamycyna, CIP – ciprofloksacyna, SXT – kotrimoksazol, GM – gentamicyna, TE – tetracyklina, FA – kwas fusydowy, VA – wankomycyna, TEC – teikoplanina, MUP – mupirocyna

Tabela II. Profile biochemiczne prezentowane przez szczepy *S. aureus*Table II. Biochemical profiles demonstrated by *S. aureus* strains

Kod numeryczny testu API	Szczepy <i>S. aureus</i>	
	n	%
67 36 153	28	56,00
67 36 151	5	10,00
67 36 113	3	6,00
67 32 153	3	6,00
63 16 153	3	6,00
63 36 153	2	4,00
67 36 152	1	2,00
67 36 053	1	2,00
67 36 051	1	2,00
67 16 153	1	2,00
67 16 151	1	2,00
63 36 053	1	2,00
Razem	50	100,00

DNA genomowego wyróżniono 15 odmiennych profili genetycznych (A-O). Najliczniej reprezentowany był profil A, który zarejestrowano u 20 szczepów. Dla pięciu kolejnych szczepów ustalono wspólną PCR MP-grupę C. Profil F był charakterystyczny dla czterech

Tabela III. Charakterystyka szczepów *S. aureus* o profilu genetycznym A
Table III. Characteristics of *S. aureus* strains belonging to genotype A

Nr	Data izolacji	Oddział	Źródło izolacji	Kod API	Fenotyp antybiotykooporności						
1	09.2004	CH	Wymaz z owrzodzenia kikuta	67 16 151	FOX	P	E			SXT	TE
3	09.2004	CH	Wymaz z owrzodzenia kikuta	67 36 151	FOX	P	E		CIP		TE
4	10.2004	CH	Wymaz z drenu trzustki	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
5	10.2004	CH	Wymaz z owrzodzenia stopy	67 36 151	FOX	P	E			CIP	TE
16	11.2004	CH	Wymaz z owrzodzenia kikuta	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
18	11.2004	CH	Wysięk z rany krocoza	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
21	11.2004	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
22	11.2004	U	Mocz	67 32 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
26	12.2004	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
27	12.2004	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
38	01.2005	CH	Krew	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
39	01.2005	CH	Wymaz z owrzodzenia głowy	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
40	12.2004	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
43	01.2005	CH	Krew	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
50	02.2005	CH	Wymaz z owrzodzenia kikuta	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
54	01.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
68	04.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIPi	GM
69	04.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	FOX	P	E	CC		CIP	GM
70	04.2005	CH	Dłoń pielęgniarki	67 36 113	FOX	P	E	CC		CIP	GM
144	01.2005	U	Umywalka	67 36 051	FOX	P	E			CIP	TE

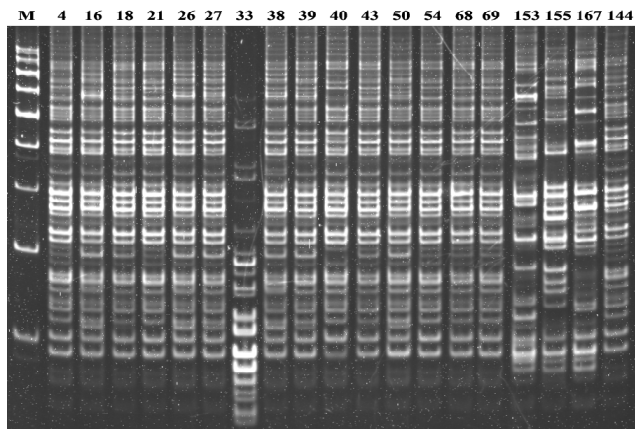
CH – oddział chirurgiczny, U – oddział urologiczny; FOX – cefoksytyna, P – penicylina, E – erytromycyna, CC – klindamycyna, CIP – ciprofloksacyna, SXT – kotrimoksazol, GM – gentamicyna, TE – tetracyklina, CIPi – średnia wrażliwość na ciprofloksacynę

Tabela IV. Charakterystyka szczepów *S. aureus* należących do MP PCR-grup C, D, F, H i O
 Table IV. Characteristics of *S. aureus* strains belonging to MP PCR-groups C, D, F, H, and O

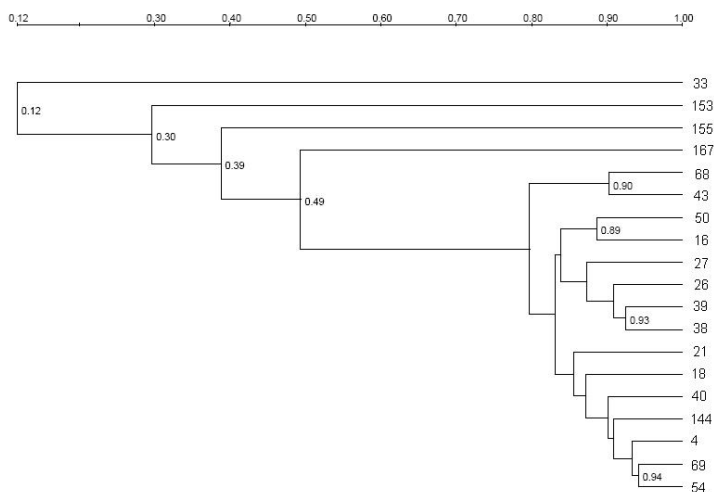
Nr	Data izolacji	Oddział	Źródło izolacji	Kod API	Fenotyp antybiotykooporności	Genotyp
15	11.2004	CH	Wysięk z rany pachwiny	67 36 153	P	C
25	12.2004	CH	Krew	67 36 153		TE C
30	02.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 32 153	P E	TE C
34	12.2004	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	P E CC CIP	TE C
36	01.2005	CH	Mocz	67 32 153	E CC SXT	TE C
17	11.2004	CH	Wymaz z rany głowy	67 36 153	P	D
64	04.2005	L	Wymaz z ucha	67 36 153	P	D
65	04.2005	L	Wymaz z nosa pacjenta	67 36 151	P E CC SXT	TE D
20	11.2004	CH	Krew	67 36 053	P	F
74	06.2005	L	Wymaz z nosa lekarza	67 36 153	P	F
83	07.2005	CH	Wymaz z nosa lekarza	67 36 153	Wrzżliwy na badane antybiotyki	F
155	03.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 36 153	E CC CIP SXT	F
48	01.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	67 16 153	P E CC	TE H
52	01.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	63 16 153	P	TE H
62	04.2005	CH	Wysięk z jamy brzusznej	63 36 053	P	TE H
166	05.2005	CH	Wymaz z nosa lekarza	63 36 153	Wrzżliwy na badane antybiotyki	O
167	05.2005	CH	Wymaz z nosa lekarza	67 36 153	FOX P	O
170	05.2004	U	Wymaz z nosa lekarza	67 36 153	P	O

CH – oddział chirurgiczny, L – oddział laryngologiczny, U – oddział urologiczny, FOX – cefoksytyna, P – penicylina, E – erytromycyna, CC – klindamycyna, CIP – ciprofloksacyna, SXT – kotrimoksazol, GM – gentamicyna, TE – tetracyklina

a)



b)



Ryc. 1. Dendrogram ilustrujący bliskie pokrewieństwo 15 izolatów *S. aureus* należących do MP PCR-grupy A oraz odmienne genotypy 4 izolatów *S. aureus* z MP PCR-grup: F (nr 155), G (nr 33), L (nr 153) i O (nr 167)

Fig. 1. Dendrogram that shows close relatedness of 15 *S. aureus* isolates belonging to MP PCR-group A and distinct genotypes of 4 *S. aureus* isolates from MP PCR-groups: F (no. 155), G (no. 33), L (no. 153), and O (no. 167)

a) Elektroforogram MP PCR stanowiący podstawę do wyznaczenia dendrogramu; M – marker wielkości; 4 ... 167 – numery wybranych szczepów *S. aureus*; b) Dendrogram

izolatów. Każdy z profili D, H, i O był reprezentowany przez trzy różne szczepy. Po dwa izolaty wykazywały profile K, L i M. Pozostałe PCR MP-grupy stwierdzano u pojedynczych szczepów *S. aureus*. Szczepy z tej samej PCR MP-grupy wywodziły się od tego samego szczepu macierzystego. Podjęto próbę wytypowania szczepów dominujących na oddziałach zabiegowych, ich potencjalnych źródeł i dróg transmisji. W tabeli III zestawiono pełne informacje zebrane w toku badań szczepów o profilu genetycznym A, dla których profil lekooporności był taki sam bądź bardzo zbliżony i korelował z profilem genetycznym. Dla porównania, w tabeli IV przedstawiono pełną charakterystykę fenotypową, a także profil genetyczny szczepów *S. aureus*, które najliczniej reprezentowały pozostałe grupy, tj. C, D, F, H i O (brak tu dodatkowej korelacji pomiędzy ich charakterystyką fenotypową i genotypową). W celu zobrazowania stopnia pokrewieństwa, dla wybranych 19 izolatów wyznaczono dendrogram (ryc. 1). Wśród nich 15 należało do PCR MP-grupy A (izolaty nr, 4, 16, 18, 21, 26, 27, 38, 39, 40, 43, 50, 54, 68, 69 i 144). Pozostałe cztery szczepy (nr 33, 153, 155 i 167) wykazywały genetyczną odrębność w stosunku do izolatów o profilu A i należały do odrębnych genotypów (odpowiednio: G, L, F i O).

DYSKUSJA

Opisano kilka istotnych źródeł bakterii *S. aureus* powodujących zakażenia szpitalne, wśród nich personel medyczny, powierzchnie i sprzęt szpitalny oraz florę mikrobiologiczną pacjentów (3,6,7), co potwierdziły badania własne. Duże znaczenie ma tu również wzajemna wymiana, nabywanej przez osoby hospitalizowane, szpitalnej flory gronkowcowej. Kontrola nad zakażeniami szpitalnymi o etiologii *S. aureus* jest tylko obowiązkiem, ale i koniecznością. Uzyskane wyniki wskazują, że w badaniach epidemiologicznych szpitalnych szczepów *S. aureus* zastosowanie może znaleźć następujące rozwiązanie: w pierwszym etapie – wstępne różnicowanie i wytypowanie puli szczepów podejrzanych o pokrewieństwo epidemiczne w oparciu o analizę ich lekowrażliwości, a także biorąc pod uwagę czas, miejsce i źródło izolacji; w drugim etapie – weryfikacja postawionej hipotezy poprzez potwierdzenie bądź wykluczenie pokrewieństwa genetycznego izolatów przy użyciu techniki PCR MP. Opierając się na profilu lekooporności izolatów MRSA, można z dużym prawdopodobieństwem wskazać subpopulację szczepów epidemicznych. Dla wielu pracowni mikrobiologicznych typowanie na podstawie antybiogramu jest niewątpliwie najbardziej dostępnym z narzędzi do badań epidemiologicznych, jednak w takim przypadku konieczna jest weryfikacja uzyskanych rezultatów metodami biologii molekularnej. Na podstawie uzyskanych wyników nie można niestety sformułować jednoznacznych wniosków na temat rezerwuaru patogenów, które wywołały wykrytą endemię, natomiast transmisja z pewnością miała charakter krzyżowy i najprawdopodobniej odbywała się poprzez ręce personelu. Programy kontroli zakażeń szpitalnych koncentrują się głównie na dwóch rodzajach ogniw łańcucha epidemicznego, mianowicie na pacjentach oraz na personelu medycznym, często umniejszając znaczenie środowiska szpitalnego. Autorom niniejszej pracy bliższe jest jednak stanowisko aktywnego nadzoru także i nad tym ogniwem, szczególnie w oddziałach zabiegowych, które są obszarem podwyższonego ryzyka nabycia zakażenia szpitalnego, co znajduje potwierdzenie w prezentowanych wynikach badań własnych.

WNIOSKI

1. Szczepy *S. aureus* stanowiące przedmiot badań charakteryzują się wysoką opornością na antybiotyki przeciwwronkowcowe i wykazują często wielolekooporność wraz z opornością na metycylinę.
2. Genetycznie spokrewnione metycylino-oporne szczepy *S. aureus* w większości posiadają podobny profil lekooporności.
3. Wykryto klonalną transmisję metycylino-opornego szczepu *S. aureus* w oddziale chirurgicznym i urologicznym.
4. Stwierdzono, że dyfuzyjno-krażkowa metoda badania oporności na antybiotyki oraz technika PCR MP mogą być wykorzystywane w badaniach epidemiologicznych nad *S. aureus*.

M Broda, I Ciebiada, A Denys

CLONAL TRANSMISSION OF METHICILLIN-RESISTANT *S. AUREUS* (MRSA) STRAIN IN TWO SURGICAL WARDS IN ŁÓDŹ

SUMMARY

Objective: Phenotypic and genotypic characteristics of *S. aureus* strains isolated from selected operative wards

Methods: A group of 50 strains were analysed. Bacterial strains were isolated from three operative wards of Pirogow Specialistic Hospital in Łódź in a year. Biochemical properties and drug resistance were estimated using standard microbiological techniques. PCR MP technique was used for genotypic analysis.

Main observations: A convergence of genotyping results and antibiotic resistance profiles among MRSA strains was observed. Thus, the antibiogram may serve as the instrument for the preliminary typing of *S. aureus* strains that may be related. However, this hypothesis has to be verified, for example by using PCR MP technique.

Results: Methicillin-resistance was demonstrated in 24 out of 50 *S. aureus* isolates. Most MRSA strains (19 out of 24) presented multidrugresistance. Twelve various profiles of enzymatic activity and fifteen different genotypes (A-O) were singled out among the investigated strains. Profile A, recorded in 20 strains, was most frequent (Dice Coefficient: 0,80-0,94).

Conclusions: 1. *S. aureus* strains present high resistance to antibiotics frequently showing multidrug-resistance coupled with methicillin-resistance 2. Genetically related MRSA strains present a stable drug-resistance pattern 3. Clonal transmission of MRSA strain was observed in two operative wards 4. The disc-diffusion method for testing antibiotic-resistance and PCR MP technique are useful in epidemiological investigation for *S. aureus*.

PIŚMIENNICTWO

1. Broda M. Aktywność biologiczna gronkowców w aspekcie zakażeń szpitalnych. Kwart Ortop 2004;53:1-6.
2. Broda M. Szpitalne szczepy gronkowców – zagadnienia związane z lekoopornością. Kwart Ortop 2004;53:7-13.

3. Marshall C, Wolfe R, Kossmann T, i in. Risk factors for acquisition of MRSA by trauma patients in the intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004;57:245-52.
4. Öncü S, Özsüt H, Yildirim A, i in. Central venous catheter related infections: risk factors and the effect of glycopeptide antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003;2:1-6.
5. Graffunder EM, Venezia RA. Risk factors associated with nosocomial MRSA infection including previous use of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:999-1005.
6. Borg MA. Bed occupancy and overcrowding as determinant factors in the incidence of MRSA infections within general ward settings. *J Hosp Infect* 2003;54:316-18.
7. McBryde ES, Bradley LC, Whitby M, i in. An investigation of contact transmission of MRSA. *J Hosp Infect* 2004;58:104-8.
8. Lu PL, Chin LC, Peng CF, i in. Risk factors and molecular analysis of community MRSA carriage. *J Clin Microbiol* 2005;43:132-9.
9. Maudsley J, Stone SP, Kibbler CC, i in. The community prevalence of MRSA in older people living in their own homes: implications for treatment, screening and surveillance in the UK. *J Hosp Infect* 2004;57:258-62.
10. Broda M, Denys A. Fenotypowa charakterystyka szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z oddziałów zabiegowych. *Acta Clin Morphol* 2007;10:10-18.
11. Krawczyk B, Samet A, Leibner J, i in. Evaluation of a PCR Melting Profile technique for bacterial strain differentiation. *J Clin Microbiol* 2006;44:2327-32.

Otrzymano: 17.10. 2007 r.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Monika Broda

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej UM w Łodzi

90-647 Łódź, Pl. Hallera 1

e-mail: microbiology@op.pl