

# Genski profil bakterije Staphylococcus aureus rezistentne na meticilin (MRSA) u Hrvatskoj i novosti u dijagnostici i terapiji

---

Stadnik, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:572228>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anja Stadnik**

**Genski profil bakterije *Staphylococcus aureus* rezistentne na meticilin (MRSA) u  
Hrvatskoj i novosti u dijagnostici i terapiji**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb – Rebro, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Budimir i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

ACME	arginin katabolički mobilni element (arginine catabolic mobile element)
Agr	akcesorni regulator gena(accessory gene regulator)
ATP	adenozin-trifosfat
<i>bsa</i>	bacteriocin <i>S.aureusa</i>
CA MRSA	izvanbolnička MRSA (community-associated)
CAMS	Croatian Academy of Medical Sciences
CARS	Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance
CC	klonalni kompleks
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EARSS	Europsko praćenja antimikrobne rezistencije (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)
ETA	eksfolijativni toksin A
ETB	eksfolijativni toksini B
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HA MRSA	bolnička MRSA (hospital-associated)
LA MRSA	MRSA povezana sa stokom (livestock-associated MRSA)
MGE	mobilni genski elementi
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MLEE	višelokusna enzimaska elektroforeza (multilocus enzyme electrophoresis)
MLST	tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (multilocus sequence typing)
MRSA	meticilin rezistentni <i>S. aureus</i>
MSCRAMM	površinske komponente mikroorganizama koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa (microbial surface components recognizing adherence matrix molecules)
MSSA	<i>S.aureus</i> osjetljiv na meticilin
PBP2A	protein koji veže penicilin 2A ( penicilin binding protein 2A)
PCR	lančana reakcija polimerazom (polymerase chain reaction)
PFGE	gel -elektroforeza u pulsirajućem polju (pulsed field gel electrophoresis)
PSM	modulin topiv u fenolu (phenol-soluble modulin)
PVL	Panton-Valentin leukocidin
RAPD	nasumično umnoženih poliformnih odsječaka DNA (randomly amplified polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizam dužine restrikcijskog elementa (restriction fragment length polymorphism)
SCC	stafilokokna kromosomska kasetna
SE	stafilokokni enterotoksin
<i>seh</i>	stafilokokni enterotoksin H
<i>spa</i>	gen za stafilokokni protein A
TSST	toksin sindroma toksičnog šoka
VNTR	lokusi s različitim brojem uzastopnih ponavljanja (variable number tandem repeats)

VRSA  
WGS

vankomicin- rezistentni *S.aureus*  
analize cijeloga genoma (whole genom sequencing)

Sažetak.....

Summary.....

1.	UVOD .....	1
1.1.	Mikrobiološke karakteristike i patogeneza bakterije <i>S.aureus</i> .....	1
1.2.	Epidemiologija.....	4
1.3.	Genetika meticilinske rezistencije .....	5
1.4.	MRSA klonovi .....	6
1.5.	Dosadašnja saznanja o MRSA u Hrvatskoj..... Error! Bookmark not defined.	
1.6.	Metode dijagnostike.....	11
1.7.	Kontrola i liječenje infekcija koje uzrokuje MRSA.....	14
2.	HIPOTEZA .....	16
3.	CILJEVI RADA.....	17
4.	METODE I MATERIJALI .....	18
5.	REZULTATI.....	19
6.	RASPRAVA.....	23
7.	ZAKLJUČAK.....	24
8.	ZAHVALA .....	25
9.	LITERATURA.....	26
10.	ŽIVOTOPIS.....	31

## SAŽETAK

Tema ovoga rada je bakterija *Staphylococcus aureus* rezistentna na meticilin (MRSA). Obradivat će se mikrobiološke karakteristike MRSA, epidemiološke karakteristike, genski profil, rezistencija na antibiotike i terapijske opcije općenito, te usporedba istih specifičnosti MRSA za Hrvatsku.

Za izradu rada korišteno je stotinu i šezdeset sedam izolata prikupljenih u razdoblju od 1.11. do 31.12. 2014. godine te dostavljenih u Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju. Uzorci iz kojih je izolirana MRSA potječu iz različitih sustava: 57 iz respiratornog sustava (trahealni aspirat, bronhoalveolarni lavat, nos, ždrijelo..), 60 uzoraka iz rana, 6 hemokultura, i 39 ostalih, među kojima 16 iz uzoraka urina. Identifikacija izolata kao SA potvrđena je korištenjem uređaja MALDI TOF MS firme Bruker Daltonics. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove provedeno je prema EUCAST standardima, i to na sljedeće antibiotike: penicilin, cefoksitin, klindamicin, eritromicin, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, ko-trimoksazol, tetraciklin, rifampicin, linezolid, mupirocin i vankomicin, a testiranje na ceftarolin je provedeno određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije putem E-testa. Provedeno je molekularno testiranje na *mecA* gena, SCC*mec* tipizacija, detekcija Pantone Valentine toksina (PVL).

Svi sojevi osjetljivi su na linezolid, vankomicin, i teikoplanin, 3 izolata bila su rezistentna na ko-trimoksazol, rezistencija na ciprofloksacin zabilježena je u 87,4 % izolata. Profili rezistencije za 12 izolata ukazivali su na tipične izvanbolničke MRSA (CA MRSA). Sojevi nisu bili multirezistentni jer su osjetljivi na sve testirane antibiotike, osim cefoksitina, pa i eritromicin i klindamicin. Od ispitanih sojeva, 7 od 12 bilo je osjetljivo na ciprofloksacin. Ne-multirezistentni MRSA sojevi su tipizirani kao SCC*mec* IV i V, predominantno spa t008, te t005, t1139, t011 i t355. Također, 5 od 12 ne-multirezistentnih bilo je PVL pozitivno, a PVL pozitivni izolati su imali spa tip t008, osim jednoga koji je bio t355. Godine 2014, prevalencija CA MRSA bila je 7,4 %, što je značajno više u usporedbi s 2004. godinom, kad smo imali 1,61 % CA MRSA u Hrvatskoj. Dominantni SCC*mec* tipovi su tip II i I, kao i SCC*mec*IV.

Rezultat veće prevalencije objašnjavamo time da je moguće došlo do transfera CA MRSA iz zajednice u bolničku sredinu, tipičnim skupinama bolesnika koji su se uglavnom povezivali s HA MRSA.

## Summary

The topic of this paper is a bacterium called methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). We will discuss MRSA's microbiological characteristics, epidemiological characteristics, genetic profile, antibiotic resistance and therapeutic options in general and then compare these with the same properties of MRSA found in Croatia.

For the purpose of writing this paper, 167 isolates were collected and delivered to the University Hospital Centre in Zagreb, Department of Clinical and Molecular Microbiology in the period from 1 November to 31 December 2014. The samples from which MRSA was isolated had come from various systems: 57 from the respiratory tract (tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage, nose, pharynx, etc.) 60 from wound samples, 6 from blood culture and 39 from other sources, 16 of which had been from urine. Identification of isolates as *S.aureus* was carried out by using the Bruker Daltonics MALDI TOF machine. EUCAST standards were used for antimicrobial drug sensitivity testing, and the antibiotics tested were as follows: penicillin, ceftazidime, clindamycin, erythromycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, co-trimoxazole, tetracycline, rifampicin, linezolid, mupirocin and vancomycin, while ceftaroline testing was performed by determining minimum inhibitory concentrations with the help of the Etest. Molecular tests for the *mecA* gene, SCC*mec* type determination, and Panton Valentine toxin (PVL) were also carried out.

All strains were sensitive to linezolid, vancomycin and tetracycline, 3 isolates were resistant to co-trimoxazole, and ciprofloxacin resistance was observed in 87,4% of the isolates. The resistance profiles of 12 isolates were proved to be community-associated MRSA (CA MRSA) strains. The strains were non-multiresistant because of their sensitivity to all of the tested antibiotics, even to clindamycin and erythromycin, except to ceftazidime. Out of those 12 strains, 7 were sensitive to ciprofloxacin. Non-multiresistant MRSA strains were classified as SCC*mec* types IV i V, predominantly as spa t008, t005, t1139, t011 and t355. Furthermore, 5 out of 12 non-multiresistant strains were PVL positive, and those PVL positive isolates were spa type t008, except for one, which was t355. In 2014, the CA MRSA prevalence was 7,4%, which is significantly higher in comparison to 2004, when the prevalence of CA MRSA in Croatia was 1,61%. The dominant SCC*mec* types were type II and IV.

The higher prevalence might be a result of transmission of CA MRSA from the community to hospital environments, to typical hospital patients that were generally HA MRSA positive.



## 1. UVOD

*Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin (MRSA) još uvijek predstavlja vrlo značajnu prijetnju u obliku multirezistentne bakterije, koja je prisutna globalno, a u većini slučajeva izaziva infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi. MRSA može izazvati široki spektar infekcija u svakom organskom sustavu ljudskog tijela. Također je poznato i njegovo širenje u zajednicu, prepoznavši ga kao patogena u osoba koje nisu imale nikakve tipične rizične čimbenike za MRSA kolonizaciju/infekciju. Jedno od područja u kojima se MRSA udomaćio su i farme za uzgoj životinja za preradu mesa, osobito farme svinja, kojim putem dalje dopire u industriju hrane, a MRSA koja se povezuje sa stočnim uzgojem naziva se LA (Livestock associated) MRSA. (17)

### 1.1. Mikrobiološke karakteristike i patogeneza *S.aureusa*

*Staphylococcus aureus* Gram je pozitivni kok koji je istodobno i komenzalni organizam i patogen. Najčešće kolonizira prednji dio nosnica, 20% ljudi je perzistentno kolonizirano, a 30% intermitentno. Upravo nosno kliconoštvo pridonosi širenju i perzistenciji meticilin rezistentnog *S.aureus* (MRSA). Osim nosnica, kolonizira aksile, prepone i gastrointestinalni trakt, a kliconoše imaju veći rizik od infekcije ako su probijeni obrambeni mehanizmi, primjerice brijanjem, aspiracijom kateterizacijom ili kirurški. Fakultativni je anaerob, nepokretni, katalaza -pozitivan, koagulaza -pozitivan, nesporogeni patogen koji može uzrokovati niz je infekcija, od infekcija kože i potkožnog tkiva (folikulitis, furunkul, karbunkul, infekcija rana, celulitis, nekrotizirajući fascitis), pneumonije, osteomijelitise, artritise, infekcije vezane za prostetske materijale kao što su kateteri (urinarni, intravaskularni) ili proteze zglobova, do sistemnih infekcija, bakterijemije, meningitis, endokarditisa. Također posebnu skupinu bolesti čine one posredovane toksinima, stafilokokni sindrom ogoljele kože i toksični šok sindrom. (43)

*S.aureus* ima mogućnost stvarati biofilm, što je ekstracelularna polisaharidna mreža koja omogućuje kolonizaciju, kako kože tako i protetskog materijala, zatim antifagocitna kapsulu koju posjeduje više od 90% stafilokoknih izolata i 11 serotipova, a zwitterionska kapsula ( i pozitivno i negativno nabijena) sudjeluje u formiranju apscesa. Površinski adhezini MSCRAMM (površinske komponente

mikroba koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa) su npr. protein A, kolagen i fibrinogen vezajući protein kojima se bakterija veže za tkivo domaćina. MSCRAMM su inicijatori endovaskularnih infekcija, infekcija kosti i zglobova i protetskih materijala. Različiti sojevi *S.aureus* imaju drugačije MSCRAMM proteine pa imaju predispoziciju uzrokovati različite infekcije. Protein A veže Fc dio imunoglobulina i prevenira opsonizaciju. MSCRAMM proteine u bakteriju usidruju peptidoglikani. Inače, modifikacijom peptidoglikana povezana je s antimikrobnom rezistencijom, a tekoična i lipotekoična kiselina su komponente staničnoga zida, a makrofazi reagiraju na lipotekoičnu kiselinu otpuštajući citokine. Za invaziju kroz tkivo domaćina bitni su enzimi proteaze, lipaze i elastaze. Hemolizina ima četiri ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), te se u literaturi posebno navodi hemolizin Panton-Valentin leukocidin (PVL) kojeg kodiraju dva gena (*lukS* i *lukF*). Sojevi koji luče PVL uzrokuju furunkulozu i tešku hemoragičnu pneumoniju. Eksfolijativni toksini ETA i ETB, kodirani *eta* i *etb* genima, uzrokuju stafilokokni sindrom ogoljele kože i bulozni impetigo. Dva su glavna superantigena, toksin sindroma toksičnog šoka TSST-1 koji vodi u istoimeni sindrom te stafilokokni enterotoksin SE, uzrok stafilokoknog trovanja hranom. Patogenetski tj. genomski otoci su dijelovi genoma veličine od 15 do 70 kB, a kodiraju za virulentne faktore ili su povezani s antimikrobnom rezistencijom. Posebni otok rezistencije je *SCCmec* (stafilokokna kromosomska kaset) koji nosi gena za daje rezistenciju na meticilin MRSE. ( 43, 11)

Ekspresija stafilokoknih virulentnih faktora precizno je regulirana kako ne bi došlo do prekomjerne metaboličke potrošnje te se izražavaju samo kada bakteriji to odgovara. U fazi replikacije (logaritamski rast) dolazi do ekspresije MSCRAMM proteina koji omogućavaju kolonizaciju bakterije, a u kasnijoj fazi, stacionarnoj, luče se toksini za lakšu invaziju stafilokoka kroz tkiva domaćina. Među važnijim genima zaduženih za regulaciju ekspresije virulentnih faktora je *agr* (akcesorni gen regulator). *Agr* mutanti su manje virulentni, a određeni tipovi *agr* gena se povezuju sa specifičnim kliničkim sindromima. Drugi regulatorni geni su *ArlR* i *ArlS*, *SaeRS*, *Rot* i *mgr*. (11)

Brojni su patogenetski mehanizmi kojima se *S.aureus* služi za invaziju tkiva domaćina i uzrokovanje infekcije, no važno je naglasiti da različiti sojevi posjeduju različite virulentne faktore, adhezine ili toksine i razlikuju se prema sposobnosti stvaranja biofilma i otpornosti na fagocitozu. Distribucija nekih virulentnih faktora ovisi

o klonalnom tipu dok drugi ne ovise. No kolika je ekspresija tih gena tijekom infekcije nije posve poznato. (11)

## 1.2. Epidemiologija

Superbakterije su već dugo uzrok brojnih hospitalnih infekcija, a hospitalne gangrene, pijemije i erizipela uzrokovane hemolitičkim streptokokima i izolatima *S.aureus* bile su uzrok visoke smrtnosti za brojne bolnice u devetnaestom stoljeću. Otkrivanjem penicilina smatralo se da se problem stafilokoka riješio no počeli su se javljati rezistentni sojevi.(41) Prvi penicilin -rezistentni soj *S.aureus* pojavio se 1942., svoju rezistenciju dugovao je penicilinazi, enzimu koji kida  $\beta$  laktamski prsten, karakterističan za  $\beta$  laktamske antibiotike, kao što su penicilin i njegovi derivati.(33) MRSA je značajan uzrok hospitalnih infekcija u Europi. U zemljama EU, Islandu i Norveškoj, 2008. MRSA je činila 44% od svih hospitalnih infekcija, 22% više smrti i 41% više dodatnih dana hospitalizacije zbog infekcije što je uzrokovalo i dodatne troškove liječenja.(21) Za razliku od njih, neke zemlje imaju nižu stopu MRSA infekcija (često <1%), najvjerojatnije zbog žustre nadzorne politike, prati i uništi, ali i ograničenja u prepisivanju antibiotika.(33) Nedavna Japanska studija pokazuje da visoka stopa potrošnje antibiotika, kroz duži period, vodi u opterećenje MRSA infekcijama.(28). Osim HA MRSA, teret se proširio i u izvanbolničke uvjete. Od 1990.tih raste incidencija izvanbolničke, CA MRSA, ali je pronađena i među stocom, LA MRSA.( 21)

### 1.3. Genetika meticilinske rezistencije

Meticilin se pojavio 1959-1960 i unutar godine dana pojavili su se meticilin rezistentni izolati. Uzrok te rezistencije je *mecA* gen, dio mobilnog genskog elementa *SCCmec* kazete, koji kodira PBP2A sa smanjenim afinitetom za  $\beta$  laktamske antibiotike. *SCCmec* je okružen rekombinantnim genima (*ccrA/ccrC*) koji dopuštaju horizontalnu transmisiju unutar vrste i između vrsta. Porijeklo *SCCmec* gena je nejasno no mogli bi biti koagulaza negativni stafilocoki. Prvi meticilin osjetljivi *S.aureus* (MSSA), najvjerojatniji primatelj *SCCmec* gena (specifično, tipa I), bila je prva MRSA, označena ST250-MRSA-I.(11) Broj *SCCmec* tipova stalno raste otkrivanjem novih elemenata. Osim *ccr* gena koji služi za integraciju i eksciziju sa kromosoma, drugi elementi *SCCmec* mog varirati, neki od njih sadrže dodatne gena za antibiotsku rezistenciju te neke gena za virulentne faktore, npr. PSM-mec i peptidni toksin. Mnogi MRSA klonovi razvili su rezistenciju i na primjerice, eritromicin, klindamicin i tetraciklin. Osjetljivost multirezistentnih sojeva samo na vankomicin je zabrinjavajuća, a zabilježeni su i vankomicin rezistentni MRSA sojevi (VRSA).(33) Najnovija istraživanja upućuju na novi mehanizam rezistencije *S.aureusa* na meticilin. Izolirana je MRSA negativna na *mecA* i *mecC* gene kao i na *SCCmec-orfX* junkcijsku regiju, ali pozitivna na *mecB* gen, prethodno opisana samo u *Macrococcus caseolyticus* no ne i stafilocoka. Gen *mecB* nalazi se uz  $\beta$  laktamske regulatorne gene kao što su *mecR*, *mecl*, and *blaZ*, a dio je 84.6-kb velike regije multirezistentnog plazmida koji nosi gene za dodatnu rezistenciju na aminoglikozide, makrolide i tetracikline. Mehanizam  $\beta$ -laktamske rezistencije ovisan o plazmidu smatra se rizikom za ubrzano širenje MRSA i neučinkovitosti  $\beta$ -laktamskih antibiotika, prvim izborom liječenja stafilokoknih infekcija. (2)

#### 1.4. MRSA klonovi

Gotovo svi MRSA klonovi detektirani diljem svijeta pripadaju u pet klonalna kompleksa (CCs): 5, 8, 22, 30 i 45. Prvi MRSA klon usvojio je *SCCmec* element tipa I i pripadao je CC 8. Novi MRSA klonovi koji su se javljali kasnije, tijekom pandemije 1980-tih, pripadali su istom CC, ali sa novim *SCCmec* tipovima, tip II i III. To su bili Iberijski klon (EMRSA-5, ST247), Brazilsko/Mađarski (EMRSA-1, ST239). Važni klonovi su i New York/Japanski (ST5, USA100) i pedijatrijski (ST5), a oba pripadaju CC5. (33).

U bolnicama su kontaminirani materijal i medicinski instrumenti izvor MRSA infekcije, no ona najčešće potječe od pacijenata ili medicinskog osoblja koji su nositelji MRSA. Vestibulum nosa, nosno predvorje najučestalije je mjesto kliconoštva *S.aureusa*, a MSCRAMM igraju ulogu u kolonizaciji nosa. Vezujući faktor B i površinski proteini G i X (SasG i SasX) dokazano vežu epitelne stanice nosa.(33) Opisani SasX protein posebno je zanimljiv jer se povezuje sa MRSA epidemijским valom.(Li et al., 2012) Pet glavnih klonova HA-MRSA uzrokovalo je tijekom povijesti te infekcije, Iberijski, Brazilski, Mađarski, New York/Japanski i Pedijatrijski klon, a bili su opisani na više načina, npr. PFGE (gel elektroforeza u pulsirajućem polju) i MLST (tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci) metodama.(11) *SCCmec* pronađen u HA MRSA su tip I, II i III.(34) Nozokomijalne infekcije uzrokovane sa MRSA nisu drugačije od onih uzrokovanih sa MSSA, a uključuju infekcije kože i mekih tkiva, pluća, kostiju, zglobova, endovaskularne infekcije, sepsu, ali i infekcije vezane za medicinske uređaje.(33). MRSA infekcije za razliku od MSSA infekcija, nose veći trošak, produljeni boravak u bolnici i veći mortalitet.(14) Tip CC30/USA200, jedan od dominantnih tipova HA MRSA u SAD-u sadrži gena za TSST. No sojevi koji sadrže mutacije *agrC* i *hla* (lokusi  $\alpha$  toksina), smanjuju akutnu virulenciju.(33)

Do 1990tih, MRSA je bila isključivo patogen vezan za bolnice. No u SAD-u su se javile MRSA infekcije kod osoba bez povijesti prethodne hospitalizacije., što upućuje da CA MRSA može uzrokovati infekcije i kod prethodno zdravih ljudi bez predisponirajući čimbenika.(33) Izolat CA MRSA ST1 i PFGE tip USA400 (MW2 soj) otkriven je između 1997. i 1999. kada je u Minesoti i Sjevernoj Dakoti umrlo četvero djece od infekcije uzrokovane CA MRSA. Svi slučajevi bili su povezani s nekrotizirajućom pneumonijom, pulmonalnim apscesom i sepsom. PGFE tip USA300

povezuje se pak s nekrotizirajućim fascitisom, purpurom fulminans toksičnim šok sindromom i Waterhouse-Friedrichsen sindromom. Broj infekcija uzrokovanih CA-MRSA raste, a sojevi uzročnici tih infekcija ulaze u bolnice i briše se linija između bolničkih i izvanbolničkih sojeva. Većina sojeva koja uzrokuje virulentne infekcije nose *SCCmecIV* (ili nekad *SCCmecV*) i uglavnom su osjetljivi na neke  $\beta$ -laktamske antibiotike. Prevalentni sojevi CA-MRSA u svijetu su ST80 (Francuska-Švicarska), ST30 (SWP klon), ST93 (Australija Queensland klon) i imaju *SCCmecIV*. (11). Teorija da CA MRSA ima povećanu virulenciju u odnosu na HA MRSA i da uzrokuje infekcije kod prethodno zdravih ljudi objašnjava se činjenicom da ubija ljudske neutrofile, prvu liniju obrane protiv stafilokokne infekcije. Dvije su teorije kako to CA MRSA postiže, iako se međusobno teorije ne isključuju. Prva teorija virulentnost pripisuje akviziciji MGE (mobilnog genskog elementa) koji sadrže PVL, a druga teorija govori o povećanoj ekspresiji gena PSM (modulin topiv u fenolu) citolizina,  $\alpha$  toksina i drugih virulentnih determinanti.(33) Smatra se da je to posljedica postojanja PVL, inače odsutnog kod HA MRSA, koji posjeduje leukocitolitičku i dermonekrotičnu aktivnost. PVL uglavnom se nalazi u USA300 i USA400 sojevima i u sojevima s *SCCmec* tipom IV. Leukotoksini, a tako i PVL luči se kao toksin od dvije komponente, S i F proteina. Ovisno o specifičnoj kombinaciji S i F proteina, toksin varira u svojim leukocitolitičkim, eritrocitolitičkim i dermonekrotičnim svojstvima.(11). Učinci PVL ispitani su na brojnim modelima, no u konačnici nije donesen jedinstven zaključak o tome da li je soj PVL-pozitivan virulentniji od PVL-negativnog i potrebna su daljnja istraživanja. (11) PSM amfipatski su peptidi sa citolitičkom aktivnosti prema humanim neutrofilima. Svi sojevi *S.aureus* posjeduju gene *psm* za PSM peptide no CA MRSA pokazuje njihovu veću produkciju u odnosu na HA MRSA.(33). Osim što su citolitički, sudjeluju i u stafilokoknom formiranju biofilma, stvarajući strukture nalik na fibrile te omogućuju i odvajanje biofilma što vodi u diseminirane inekcije.(34) Što se tiče  $\alpha$  toksina, iako nije citolitički za humane neutrofile, citolitičan je za eritrocite i makrofage, pospješuje prodor epitelne barijere djelomično u interakciji sa ADAM10 receptorom.(14)

USA400 je vrlo virulentan soj CA MRSA. Geni *mec* i *blaZ* kodiraju za penicilinazu, i to je jedini mehanizam rezistencije ovom soju. Virulentni faktori koje posjeduje su PVL operon, 16 jedinstvenih superantigeni gena, 11 gena za egzotoksine i 5 gena za enterotoksine. Također jedinstven za USA400 je stafilokokni enterotoksin H (*seh*), a

može voditi u sindrom nalik na toksični šok. Genski klaster „bacteriocin *S.aureus*“ (*bsa*) kodira potencijalni bacteriocin, antibakterijskog djelovanja, a mogao bi pomoći USA400 soju za natjecanje sa ostalom kolonizirajućom florom i povećati šansu za infekciju ovom bakterijom.(11) USA300 vodi u veću incidenciju infekcija CA-MRSAom. Također je SCC*meclV* i PVL pozitivan te ima bacteriocinski klaster gena. Drugačije je to što sadrži ACME ( arginin katabolički mobilni element) koji kodira za arginin deaminazu, razgrađujući L-arginin na ugljični dioksid, adenzin trifosfat (ATP) i amonijak. Upravo ovaj enzim, arginin deaminaza olakšava bakteriji kolonizaciju kiselog okoliša, kože, proliferaciju u uvjetima s malo kisika, primjerice u apscesu, te inhibirajući produkciju dušikovog oksida i proliferaciju mononukleara kao i invaziju tkivo domaćina. (11) CA MRSA izolati su obično osjetljivi na većinu  $\beta$ - laktamskih antibiotika, a multirezistencija je češća u HA MRSA izolatima. No, bilo je zabilježenih slučajeva multirezistentnog klona CA MRSA i to USA300 klon koji je bio rezistentan na klindamicin i mupirocin, a većina izolata je bilo rezistentno i na tetraciklin. Klonovi USA300 koji nisu multirezistentni, obično su rezistentni samo na eritromicin, ciprofloksacin, meticilin i  $\beta$ - laktamske antibiotike.(34)

LA MRSA, soj je pronađen među svinjama u 17 država članica EU, no pronađena je i među govedom i peradi. Klon MRSA izoliran iz svinja nije mogao biti tipiziran metodom PFGE zbog metilacije DNA, no MLST metodom utvrđeno je da pripada klonalnom kompleksu CC398. U nekih MRSA CC398 izolata određen je PVL gen i *cfr* plazmid koji nosi rezistenciju na oksazolidone. Iako su životinje uglavnom samo kolonizirane sa MRSA, opisane su infekcije u svinja i konja. 23-38% osoba u kontaktu sa koloniziranim svinjama ili mesom krava bilo je kolonizirano sa MRSA te također i 4% članova njihovih obitelji bez da su bili u direktnom kontaktu sa životinjama. Problem je i unošenje MRSA CC398 soja u bolnice koja vodi u nozokomijalne infekcije pacijenata sa predispozicijom za razvitak MRSA infekcije. Ovaj soj može uzrokovati endokarditis, infekcije mekih tkiva i pneumoniju povezanu s mehaničkom ventilacijom. (21)



## 1.5. Dosadašnja saznanja o MRSA u Hrvatskoj

MRSA je prisutna u Hrvatskoj već 45 godina no njena se prevalencija nije strogo pratila kroz cijeli period. Prvi podaci datiraju iz 1970-tih, a prvi brojevi se javljaju 1992.godine kad je prevalencija u bolnicama bila 12% i 20% 1995.godine.(3) Prije 1998.godine u Hrvatskoj nije bilo službenog i sistematičnog praćenja MRSA no tada je Odbor a rezistenciju Hrvatske Akademije Medicinskih znanosti inicirao i koordinirao sistemni nadzor nad MRSA u Hrvatskoj. Između 1998. i 2004. postotak MRSA izolata iznosio je od 18-24% bez značajnijih trendova porasta ili pada. Od 2001.godine Hrvatska u sklopu Europskog praćenja antimikrobne rezistencije (EARSS) prikuplja podatke o izolatima iz hemokultura i likvora laboratorija Hrvatske. Podaci koje su prikupljali su osjetljivost na antibiotike, demografski podaci o pacijentima i njihova osnovna dijagnoza. 2001. prevalencija *S.aureusa* iznosila je 32%, a najveći postotak izolata iz likvora i hemokulture datira iz 2004. i 2008. Važno je da postotak izolata pada nakon 2008. i pad se nastavlja i u 2010. i 2011. kada je iznosio 14%. (4)

Da bi definirali točnu vrstu MRSA izolata, potrebno je utvrditi njegov MLST tip, SCC*mec* tip i, potvrditi radi li se o pozitivnom *mecA* genu. (4). PFGE bila je zlatni standard za tipizaciju, ali sve više se koriste metode analize cijeloga genoma WGS (whole genom sequencing). Također, standardne metode tipizacije su i SCC*mec* tipiziranje, MLST i spa tipizacija (tipizacija dijela gen koji kodira stafilokokni protein A).(3)

U Hrvatskoj najčešći izolati pripadaju HA MRSA, i to Arhaični klon (ST250), Berlinski (ST45), Brazilsko/Mađarski (ST239), Iberijski (ST247), New York/Japan (ST5), Pedijatrijski (ST%), Južno Njemački (ST228)klon i epidemijski klonovi Ujedinjenog Kraljevstva (EMRSA 2/6, UK EMRSA 3,15, 16).(3) Između 2001. i 2002. u uzorku izolata iz hemokulture dominiraju ST111 i ST247, za ST111 smatra se da je evoluirao iz Južnonjemačkog klona (ST228). U 2004. godini, od 248 MRSA sojeva iz cijele Hrvatske njih 78% povezana je s ST111-MRSA-I klonom. Tipizacijskim tehnikama određene su i druge klonalne linije, ali u značajno manjem postotku, ST247-MRSA-I (4%), ST45-MRSA-IV (2%), ST5-MRSA-I (2%), ST239-MRSA-III (2%), ST5MRSA-II (1%), ST8-MRSA-IV (1 %) i ST5-MRSA-IV (<1 %).(4) U Hrvatskoj, CA MRSA prvi puta je izolirana 2006.godine. (23) Sustavnom analizom različitih izolata u Hrvatskoj, određena je prevalencija od 0,03%. U 2011. godini,

izolirana je MRSA iz vestibuluma nosa zdravih ljudi različitih dobnih skupina u postotku od 0,012% (oko 800 SA, 7 od njih MRSA). (4) Najvažniji CA MRSA sojevi su Europski (ST80), Južno Pacifički (ST30), USA 300 (ST8), USA 400 (ST1) i USA 1000 (ST59). (3) Također, u Hrvatskoj je u uzorcima prašine, na 6 od 8 farmi svinja, pronađena MRSA, klasificirana kao LA MRSA jer svi izolati pripadaju ST398 koji se zasad jedini povezuje s MRSA podrijetlom iz životinja koje se uzgajaju za proizvodnju hrane. (13).

## 1.6. Metode dijagnostike

Brojne su metode za tipizaciju MRSA bakterije. Zlatni standard za njenu tipizaciju je elektroforeza u pulsirajućem polju, poznatija pod kraticom PFGE (35), a od ostalih, ne manje značajnih treba spomenuti fenotipske metode tipizacije, molekularne metode tipizacije, tipizacija višestrukih lokusa (MLST), *Spa* tipiziranje i *SCCmec* tipiziranje.

Svaka od njih ima svojih pozitivnih i negativnih strana. Što se tiče fenotipske metode tipizacije, za utvrđivanje sličnosti među izolatima i njihove povezanosti u epidemiološkom smislu, koristile su se: biotipizacija, fagotipizacija, višelokusna enzimsko elektroforeza (MLEE) i serotipizacija kapsularnog polisaharida. Navedene metode imaju određene nedostatke. Serotipizacija ima ograničenu primjenjivost jer veliki dio nepovezanih izolata pripada malom broju kapsularnih serotipova (26). Fagotipizacija ima također ograničenu primjenu jer značajan broj izolata ne posjeduje bakteriofag i na njih nije moguće primijeniti ovu metodu (12). MLEE je tehnički zahtjevno provodiva metoda (27), i stoga je malo centara imalo pristup metodi. Fenotipskim metodama tipizacije pripada i ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove, koje osim tipizacijske ima i praktičnu vrijednost u preporuci za liječenje infekcije. Rutinski u laboratorijima se koristi disk-difuzija (Kirby-Bauer metoda), a za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucijska metoda ili E-test metoda (AB Biodisk, Solna, Švedska). Fenotipizacijske metode danas su uglavnom zamijenjene genotipskim metodama.

Molekularne metode tipizacije su brojne, a elektroforeza nukleinskih kiselina osnova je metoda, tu spadaju ribotipizacije, elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE), restrikcijske analize plazmidne DNA (44), restrikcijske analize PCR produkta koagulaza-gena (*coa*) (25), polimorfizam fragmenata nakon restrikcije PCR-RFLP, PCR analize «inter-IS256 spacer» polimorfizma (9) metoda slučajno namnoženih fragmenata RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), binarno tipiziranje, tipizacija na osnovu varijabilnog broja ponavljajućih segmenata - VNTR (variable number tandem repeats) i drugih, na PCR temeljenih metoda. Southern blot hibridizacija MRSA fragmenata nakon RFLP može sadržavati gene specifične za stafilokok u obliku probe, uključujući *mec*, transposon Tn554, *agr*, *aph(2'')*-*aac(6')* (gen rezistencije na aminoglikozide) (5)

Tipizacija insercijskih sekvenci se također provodi s RFLP fragmentima s probama za sekvence IS257/431 (38). RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) analiza koristi se za tipizaciju *S.aureus* a iz nje je razvijena metoda binarnog tipiziranja iz koje je, uz upotrebu rafiniranih podloga, proba i signalizacije i detekcije, kao i povećanjem broja ciljnih mjesta, razvijena micro array tehnologija. Najčešće upotrebljavane, s dobrim diskriminatornim svojstvima i standardiziranim protokolima su PFGE, MLST, *spa* tipiziranje, *SCCmec* tipiziranje. Genetsku različitost stafilokoka moguće je ispitati raznim metodama od kojih je najčešće upotrebljavana metoda elektroforeze u pulsirajućem polju nakon restrikcije *Sma*I enzimom (PFGE) (10, 40) . Metoda se temelji na cijepanju genoma bakterije restrikcijskim enzimima (u slučaju *S.aureus* radi se o *Sma*I enzimu) nakon izolacije DNA u agaroznim kalupima i detekciji fragmenata elektroforezom u pulsirajućem polju. PFGE se, nakon što je prvi put opisana 1983. godine (138) razvila u referentnu metodu za tipizaciju mikroorganizama, tzv. zlatni standard za *S.aureus*. Zbog veličine fragmenata DNA koje se dobivaju restrikcijom enzimima koji rijetko cijepaju DNA (10-800 kpb) (47) putovanje kroz elektroforetski gel je sporo jer pokretljivost molekula DNA od 50 kpb naviše ne ovisi samo o molekularnoj težini (45) . Kretanje kroz elektroforetski gel poboljšano je upotrebom električnog polja koje mijenja smjer kroz gradijent vremenskih intervala, tako da se i tako velike molekule vizualno i fizički razdvoje. Usporedba sličnosti genoma većeg broja izolata izvodi se uz pomoć kompjutorskih softverskih sustava. Za kompjutorsku analizu PFGE profila neophodno je na svakom elektroforetskom gelu imati ravnomjerno raspoređene standardizirane vrpce. Bez obzira koristi li se kompjutorski sustav ili vizualna komparacija, na korisniku je da odluči koja vrijednost mu predstavlja «značajnu razliku». Tako, na primjer, ukoliko se koristi Dice koeficijent od 0,85 ili veći, odgovara razlici u tri ili manje restrikcijskih fragmenata između izolata. Treba napomenuti da PFGE kao metoda ima najveću vrijednost ukoliko se uzima u obzir kontekst u kojem se izolati nalaze. Osnovni nedostatak PFGE metode je relativno loša inelaboratorijska reproducibilnost rezultata (30, 40), iako ima i pozitivnih iskustava s reproducibilnošću (3, 40). Prednost metode je primjenjivost na sve bakterijske vrste, visoka moć razlučivanja, velika intralaboratorijska reproducibilnost. MLST je metoda razvijena za potrebe istraživanja populacijske i evolucijske biologije značajnih ljudskih patogena, među njima i *S.aureus*. *Spa* tipiziranje odnosi se na sekvenciranje kratkih ponavljajućih sekvenci (SSR) regije u kojoj se nalazi *spa* gen, koji kodira protein A kod *S. aureus*

(15) . Polimorfna X regija *spa* gena građena je od varijabilnog broja 24-članih ponavljajućih fragmenata. Do razlike među fragmentima dolazi zbog delecije, točkastih mutacija i duplikacije nukleotidnih skupina. Sastav ponavljajućih fragmenata predstavljen je slovima (46) tako da skupina fragmenata koja se nalazi u određenom izolatu čini «*spa repeat*» kod. Ponavljajući fragmenti se, obzirom na povećanje njihovog broja i lakšu obradu podataka, označavaju i brojem (40, 7) . Metoda *spa* tipizacije je pogodna za istraživanje povezanosti izolata unutar epidemija u bolnici, detektira genetičke mikrovarijacije, a može se upotrijebiti u filogenetskim studijama gdje su ključne genetske makrovarijacije (46). Osnovna prednost ove metode je u jednostavnosti, budući da se sekvencira samo jedan genski lokus (37), manja je i mogućnost pogreške. Diskriminatorna sposobnost se nalazi između MLST i PFGE (42). Moguće je grupiranje *spa* tipova u komplekse, što olakšava interpretaciju rezultata (32, 40). U tipiziranju *SCCmec* genskog segmenta najčešće korištena i citirana je metoda Oliveira i koautora u kojoj se višestrukom PCR metodom detektirano šest genskih lokusa i *mecA* gen u *SCCmec* kompleksu (29) Malim modifikacijama metode, koristeći iste početnice, moguće je tipizirati i *SCCmec* tipa V<sup>130</sup> .Postoje još neke metode za *SCCmec* tipizaciju (40). Zhang i koautori su predložili novi mutipleks PCR koji koristi nove početnice i pomoću kojeg se mogu razlikovati podtipovi *SCCmec* IV ( a, b, c, d) . Nedavno je predložena i nova klasifikacijska shema za nomenklaturu *SCCmec*. Prijedlog naziva sadrži u sebi tip *ccr* gena (broj) i *mec* kompleks (slovo) (40). Na taj način tip I *SCCmec* postaje tip 1A, tip II *SCCmec* postaje tip 2A, tip III bi se označavao kao 3A, novi naziv tipa IV je tip 2B tip, a tip V je *SCCmec* tip 5C. Razlike u J (junkyard) regiji bi se označavale dodatnom brojevima.

## 1.7. Kontrola i liječenje infekcija koje uzrokuje MRSA

U Hrvatskoj, rezistencija na antibiotike kontinuirano se prati od 1996 kroz aktivnosti Odbora za praćenje rezistencije bakterija pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske i Referentnog centra za praćenje rezistencije na antibiotike Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb. Na području praćenja rezistencije Hrvatska je uključena u europski projekt EARSS. (18) EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardi (verzija 3.0) u 2013. korišteni su kao službena metodologija za testiranje osjetljivosti na antibiotike. Metoda disk difuzije najčešća je metoda za testiranje antibiotske osjetljivosti u Hrvatskoj kojom se određuje minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Postotak MRSA varirao je između 18 i 24%, bez značajnog rasta ili pada, između 1998 i 2004. Zatim je 2010. postotak MRSA počeo padati (25% 2007., 26% 2008., 21% 2009., 16% 2010., 14% 2011., 13% 2012. i 12% 2013.godine). Godišnji izvještaji kliničkih bolnica iz 2013. zabilježio je postotak izolata MRSA od svih *S.aureus* između 0 i 37% (srednja vrijednost 15.3, medijan 13). U istim bolnicama je 2005. postotak MRSA varirao od 7.6% do 88% (neobjavljeni podaci). Zabilježen je i pad gentamicin rezistentnih MRSA izolata (91% 2006., 81% 2009., 77% 2010., 69% 2011., 64% 2012. i 59% 2013.). Rezistencija na linezolid i vankomicin nije zabilježena tijekom perioda praćenja, a MIC za vankomicin bila je slična rezultatima dobivenih i 2012.godine, sa visokim postotkom (20%) izolata s MIC vrijednosti 2.0 mg/l.(3)

U svrhu prevencije, kontrole i liječenja MRSA infekcija, donesene su smjernice objavljene u Hrvatskoj u Liječničkom Vjesniku. Kao mjere kontrole i prevencije infekcija u bolnicama navode se primjerice, važnost edukacije cjelokupnog osoblja ustanove, upotreba antibiotika (osobito cefalosporina 3. generacije i fluorokinolona), standardni postupci higijene, ako nema MRSA u bolnici, pojačane mjere higijene pri pojavi MRSA u bolnici, praćenje učestalosti, dekolonizacija MRSA pozitivnih bolesnika i osoblja. Navedene su i mjere postupanja sa MRSA pozitivnim pacijentima i kožnim ulceracijama i urinarnim kateterom. Što se tiče terapije, glikopeptidi se preporučaju za infekcije kože i mekih tkiva, uz vankomicin i teikoplanin, linezolid, daptomicin ili tigeciklin. Odraslima se može dati tetraciklin ako je soj osjetljiv in vitro,

osim u teškim infekcijama s visokim rizikom za bakterijemiju ili endokarditis. U slučaju rezistencije na monoterapiju, antibiotici se mogu kombinirati (glikopeptidi i rifampicin, glikopeptidi i rifampicin, glikopeptidi i trimetoprim-sulfametoksazol, doksiciklin), ako su ti antibiotici efikasni in vitro, ali učinak kombinacije antibiotika je upitan. U MRSA sojeva osjetljivih na makrolide i linkozamide, ne preporuča se uporaba eritromicina zbog indukcije antibiotske rezistencije, već se u tim slučajevima preporuča klindamicin. (3, 16)

## **2. HIPOTEZA**

Postotak CA MRSA unutar MRSA izolata iz Hrvatske u 2014. biti će veći u odnosu na prethodna analizirana razdoblja.

Genski profili MRSA biti će različiti u odnosu na ranije zabilježene genotipove.

Antimikrobna osjetljivosti MRSA nije bitno drukčija u odnosu na osjetljivost na antimikrobne lijekove u ranijem razdoblju.



### 3. CILJEVI RADA

**Utvrđiti prevalenciju MRSA u Hrvatskoj**

**Istražiti iz kojih je uzoraka MRSA izolirana**

**Analizirati genske profile, markere virulencije i usporediti ih s ranijim genotipovima dobivenim spa sekvencioniranjem, PFGE i MLST tehnikama.**

**Analizirati epidemiološke i demografske podatke bolesnika kod kojih je MRSA izolirana**

Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, koordinirao je MRSA studiju s ciljem prikupljanja izolata iz Hrvatske, analizirajući genetske profile, kao i osjetljivost na antimikrobne lijekove prikupljenih izolata. Cilj ove studije je bio prikupljanje MRSA izolata iz raznih, reprezentativnih dijelova prikazati prevalenciju izvanbolničkih MRSA, kao i njihove fenotipske i genotipske karakteristike. Stotinu i šezdeset sedam izolata je zaprimljeno u KMM KBC-a, izolata prikupljenih u razdoblju od 1.11. do 31.12. 2014. godine. Uzorci iz kojih su sojevi izolirani potječu iz različitih sustava: 57-iz respiratornog sustava (trahealni aspirat, bronhoalveolarni lavat, nos, ždrijelo..), 60 uzoraka iz rana, 6 hemokultura, i 39 ostalih, među kojima 16 iz uzoraka urina. (17)

Popis laboratorija i broja izolata koje su dostavili u KMM, KBC Zagreb. (Tablica 1.)

*Tablica 1. Popis laboratorija i broja izolata koje su dostavili u KMM, KBC Zagreb*

Laboratorij u HR	Broj dostavljenih MRSA izolata
ZAGREB-SVETI DUH	38
ZAGREB-KBC ZAGREB	20
ZAGREB-KB DUBRAVA	16
ZAGREB-ZZJZ ANDRIJA ŠTAMPAR	3
SISAK	12
OSIJEK	10
DUBROVNIK	10
PULA	8
ČAKOVEC	6
GOSPIĆ	3
SPLIT	4
ZABOK	2
VINKOVCI	2
VARAŽDIN	15
KIB F. MIHALJEVIĆ ZAGREB	17
KB MERKUR ZAGREB	6

#### 4. METODE I MATERIJALI

Identifikacija izolata kao SA je potvrđena korištenjem MALDI Tof MS uređaja tvrtke Bruker Daltonics, i analizom je nađeno da su 2 od 167 dostavljenih izolata pogrešno identificirana te su izbačeni iz daljnje analize. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove provedeno je prema EUCAST standardima, testiranje je provedeno na sljedeće antibiotike: penicilin, cefoksitin, klindamicin, eritrocimin, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, ko-trimoksazol, tetraciklin, rifampicin, linezolid, mupirocin i vankomicin. Testiranje na ceftarolin je provedeno određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije putem E-testa. Nakon utvrđivanja osjetljivosti na cefoksitin, daljnja 3 izolata su odbačena zbog osjetljivosti na cefoksitin a provedeno je molekularno testiranje prisutnosti *mecA* gena, koji je bio negativan u ta 3 izolata. Osim fenotipskih i metoda masene spektrometrije, provedena je i molekularna tipizacija izolata: SCC*mec* tipizacija, prema ranijim publikacijama, kao i detekcija Pantone Valentine toksina (PVL). Tipizacija temeljem sekvencioniranja-Spa tipizacija provedena je korištenjem SeqNet protokola i Ridom StaphType softvera.(3, 17) Metode su objašnjene u podnaslovu Metode dijagnostike.

## 5. REZULTATI

Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove: svi sojevi osjetljivi su na linezolid, vankomicin, i teikoplanin, a MIK-ovi ceftarolina varirali su od 0,125 mg/L do 1 mg/L za sve osim jedan izolat koji je pokazivao MIK ceftarolina od 2mg/L (0,61% rezistencije na ceftarolin). Među testiranim sojevima, samo 3 izolata bila su rezistentna na ko-trimoksazol (1,85% rezistencija na ko-trimoksazol). Rezistencija na ciprofloksacin zabilježena je u 87,4 % izolata. Profili rezistencije za 12 izolata ukazivali su na tipične izvanbolničke MRSA. Nisu bili multirezistentni, osjetljivi su dakle, na sve testirane antibiotike, osim cefoksitina, pa i eritromicin i klindamicin. Od njih 12 čak 7 ih je bilo osjetljivo i na ciprofloksacin. Ne-multirezistentni MRSA sojevi su tipizirani kao SCC*mec* IV i V, predominantno spa t008, te t005, t1139, t011 i t355.

PVL pozitivnima je okarakterizirano 5 izolata od njih 12 ne-multirezistentnih, a PVL pozitivni izolati su imali spa tip t008, osim jednoga koji je bio t355.

Analizirajući demografske karakteristike, srednja dob bolesnika kod kojih je izolirana "bolnička" MRSA je bila 63,73 godine, dok je u izvanbolničkoj skupini srednja vrijednost 35,66 godina, što je, zapravo, i očekivano. 38% pacijenata iz studije živjelo je u vlastitom domu, a njih 22,2% je smješteno u neku od ustanova za umirovljene ili za dugotrajnu skrb. Obrađujući podatke o faktorima rizika za stjecanje MRSA, kod 9 bolesnika, osim onih koji su bili hospitalizirani, netko od obitelji radio je u zdravstvenom sustavu. Za 53 bolesnika nismo imali podatke u prethodno uporabi antibiotika, dok je njih 60,7% od ukupnog broja bolesnika u studiji upotrebljavalo antibiotike u godini koja je prethodila MRSA izolaciji. Osim razlike u godinama, nije zamijećena druga bitna razlika u skupinama HA MRSA bolesnika u odnosu na CA MRSA, jednaki je postotak hospitaliziranih i ambulantnih pacijenta. Također, zamijećeni su slični rizični čimbenici u ove dvije skupine. U jedne osobe je zabilježena dodatna povezanost s bolničkim sustavom. Epidemiološki podaci dobiveni su iz iscrpnog upitnika koji je uglavnom bio samo djelomično popunjen. (17)

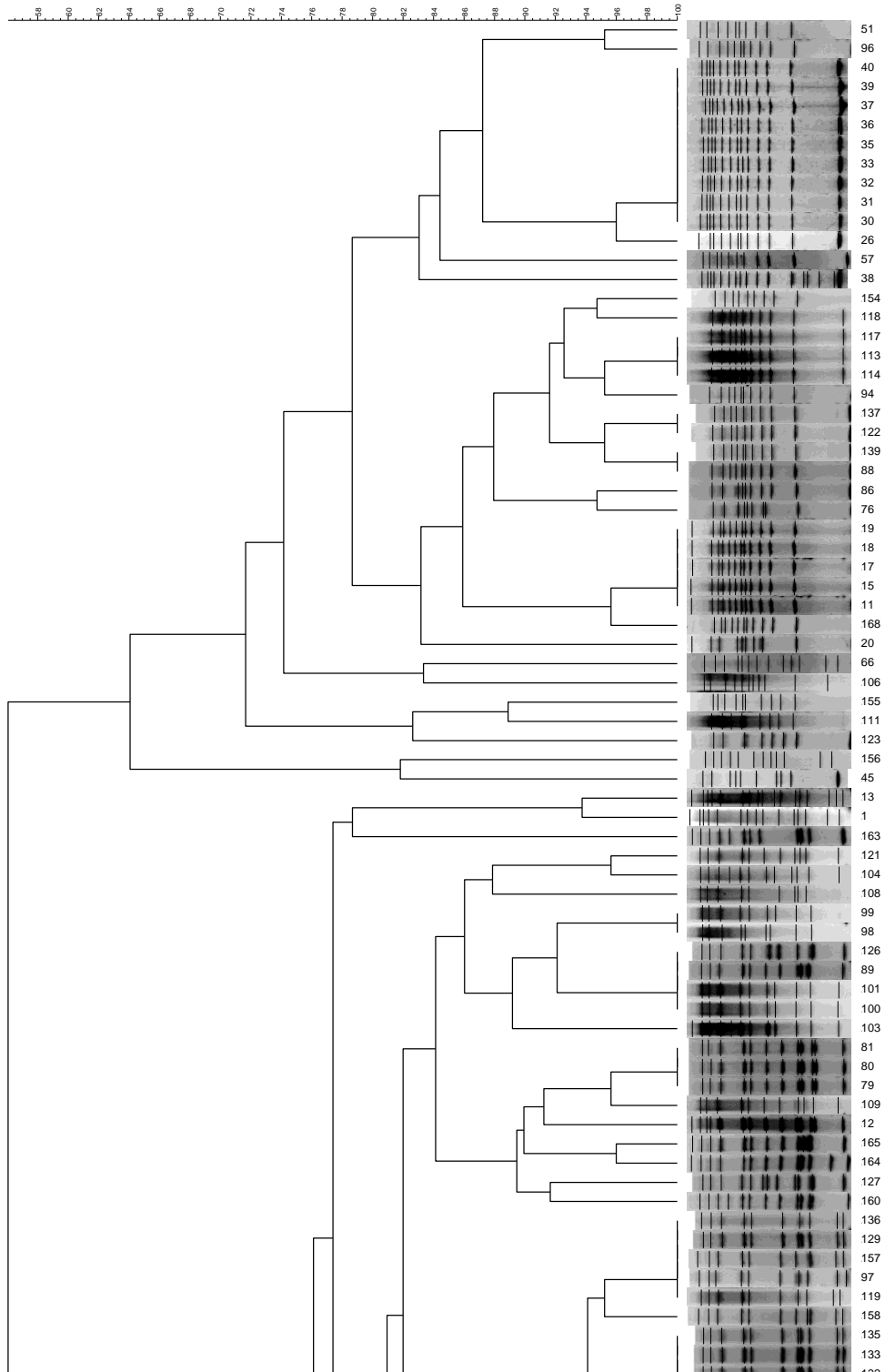
Prevalencija CA MRSA, temeljem ovih kombiniranih genotipskih i fenotipskih, s epidemiološkim kriterijima, je 7,4% u 2014. godini, što je značajno više u usporedbi s 2004. godinom, kad smo imali 1,61% CA MRSA u Hrvatskoj. Dominantni SCC*mec*

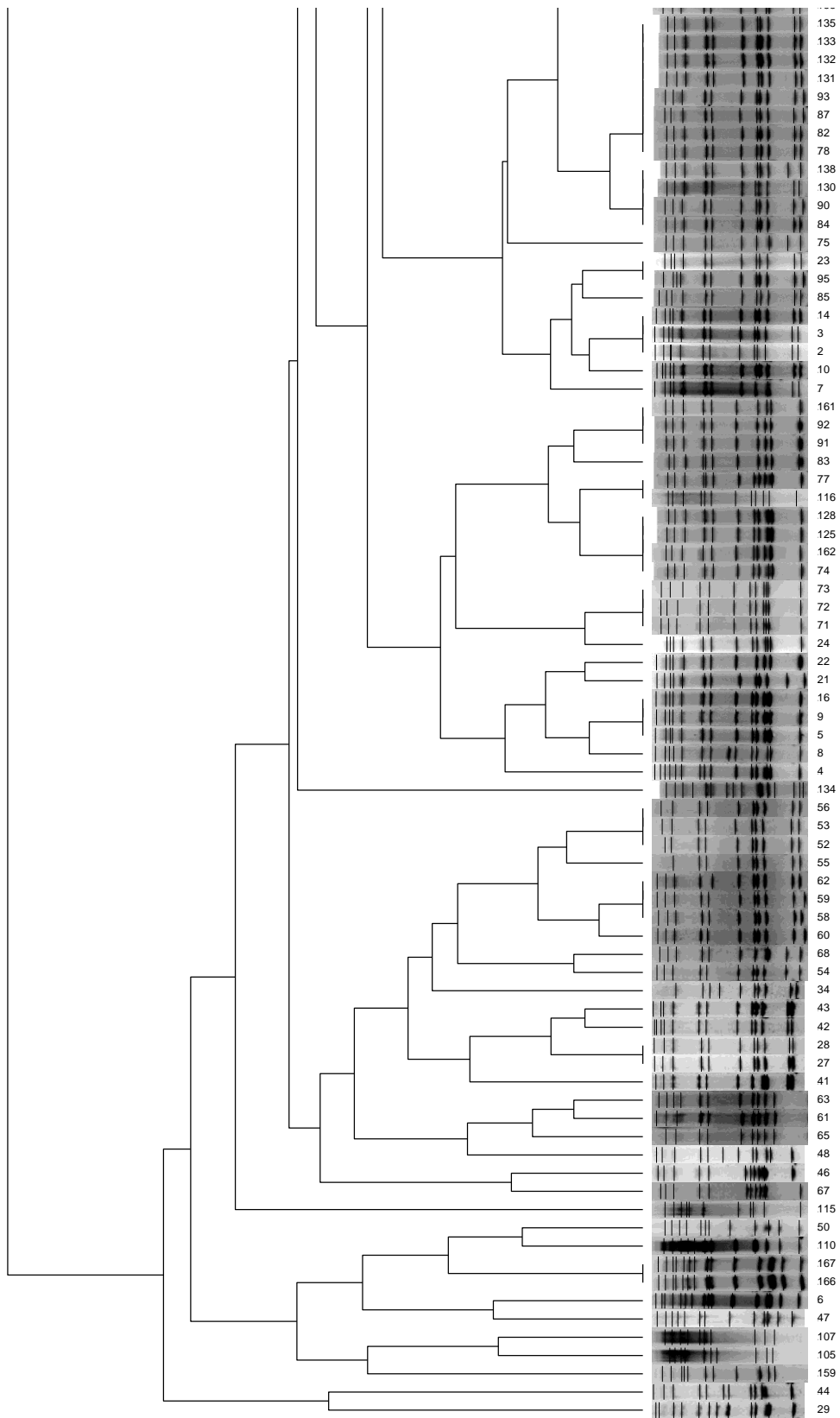
tipovi su tip II i I kao i SCCmec IV. Zabilježen je i SCCmec tip V, ali 10 % izolata nije moglo biti tipizirano korištenjem metodologije uveden u našem laboratoriju. Spa tipizacija, tablica 2. (3,17)

*Tablica 2. Spa tipizacija*

Spa tip	Podrijetlo izolata	Broj MRSA istog spa tipa
t003	Zagreb, Sisak, Gospić, Pula	28
t014	Zagreb, Osijek, Čakovec, Vinkovci, Sisak	24
t022	Zagreb, Sisak, Čakovec	22
t041	Osijek, Zagreb	12
t001	Split, Dubrovnik, Zagreb	8
t005	Zagreb, Čakovec, Sisak	6
t008	Zagreb, Dubrovnik	5

Na slici 1. dendogramom prikazani su izolati MRSE, njih ukupno 145, razvrstanih prema 80%-tnoj sličnosti u 14 grupa. Šest izolata koji ne pripadaju niti jednoj grupi su izdvojeni izolati, tzv. "singletoni". U 1. grupu spada 14 izolata, u 2. grupu 19, 3. grupu 2, u 4. grupu 3, u 5. grupu 2, u 6. grupu 2, u 7. grupu 46, u 8. grupu 21, u 9. grupu 16, u 10. grupu 4, u 11. grupu 2, u 12. grupu 4, u 13. grupu 2 i u 14. grupu 2.





Slika 1. Dendrogram sličnosti izolata MRSA (145 sojeva)

## 6. RASPRAVA

U Hrvatskoj MRSA je prisutna već više od 45 godina i imala je velik utjecaj na zdravstvo. Od 1996. na državnoj razini prati se rezistencija na antibiotike osnivanjem CARS (Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance) u sklopu CAMS (Croatian Academy of Medical Sciences), a praćenje je upotpunjeno 2001. s EARS-Net. (3)

Između 2001. i 2013. godine zabilježen je pad invazivnih MRSA izolata što prati trend u Europi (2009. je preskočena zbog prelaska EARS na ECDC). Do 2008. postotak izolata je i dalje visok no nakon toga postotci padaju, a najniži, 22%, zabilježen je 2012. Smatra se da je uzrok toga kombinacija bolje infrastrukture i organizacije kontrole infekcija, provođenje dobre higijenske prakse i ostali faktori. Udio MRSA (sve MRSE i svi njeni sojevi) počeo je padati 2010. (25% u 2007., 26% u 2008., 21% u 2009., 16% u 2010., 14% u 2011., 13% u 2012. i 12% u 2013.). Također, godišnji izvještaji kliničkih bolnica iz 2013. pokazuju da postotak MRSA u *S.aureus* izolatima varira između 0 i 37% (srednja vrijednost 15.3, medijan 13), dok u istim bolnicama 2005. se postotak MRSA kreće između 7.6 i 88%. U Hrvatskoj je 2004. predominantni SCC*mec* tip bio tip I, varijanta Južno Njemačkoga klona. (3).

Prevalencija CA MRSA je 2014. bila 7,4% što je u odnosu na 2004.g značajno više jer je tada bilo svega 1,61% CA MRSA u Hrvatskoj, a ta činjenica nas može uputiti da je moguće došlo do transfera CA MRSA iz zajednice u bolničku sredinu, u tipične skupine bolesnika koji su se uglavnom povezivali s HA MRSA. Zabilježeno je najviše SCC*mec* tipovi II i I kao i SCC*mec* IV, što označava porast prevalencije tipova II i IV u odnosu na 2004.

## 7. ZAKLJUČAK

2014. godine, prisutan je značajno veći broj CA MRSA, kao i značajna promjena u distribuciji MRSA spa tipova, u usporedbi s 2004. godinom, kad je dominantan bio tip t041, SCC*mec* I, a nakon njega, t001 i t003 koji je još uvijek brojčano snažno zastupljen, kao i povećan broj spa tipova t008, tipično prisutnih u CA MRSA, koji posjeduju i važnu karakteristiku virulencije, PVL toksin. (17)

Ono što je zabrinjavajuće je širenje MRSA u različite ekološke niše što znači da ju je moguće pronaći, tj. izolirati u hrani, životinjama, te je njeno širenje neovisno o klasičnim rizičnim čimbenicima kao što su boravak u bolnici, kronične bolesti, pomagala koja narušavaju prirodne barijere ili dugotrajna uporaba antibiotika.(4)

Ipak, ono što možemo učiniti u bitci protiv širenje MRSE, a tako i infekcija prouzrokovanih njome, je u prvom redu jačanja kampanja za higijenu ruku, jer su čiste ruke najvažniji faktor u prevenciji hospitalnih infekcija, zbog čega je WHO donijela smjernice za higijenu ruku u zdravstvenim ustanovama.(20)



## **8. ZAHVALA**

Ovom prilikom želim zahvaliti prof. dr. sc. Ani Budimir na danim materijalima, objašnjenju problematike rada te sugestijama za pisanje, koji bi bez nje bio puno mukotrpniji nego što je na kraju ispao.

Veliko hvala i kolegama, prijateljima i ponajprije obitelji na neprekidnoj podršci i sretnim trenucima u prekidima od pisanja.

## 9. LITERATURA

1. Aramburu, C., et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Switzerland: first surveillance report. *Euro Surveill*, 2006. 11(1): p. 42-3.
2. Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E. A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., ... Peters, G. (2018). Plasmid-Encoded Transferable mecB - Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 24(2), 242–248.
3. Budimir, A. (2016). MRSA in Croatia: Prevalence and management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(2), 167–176.
4. Budimir, A., Bošnjak, Z., & Kalenić, S. (2012). Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) u Hrvatskoj. In *Infektoloski Glasnik* (Vol. 32, pp. 59–66).
5. Community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). 2005.
6. Dancer, S.J., et al., MRSA acquisition in an intensive care unit. *Am J Infect Control*, 2006. 34(1): p. 10-7.
7. Daum, R.S., et al., A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*, 2002. 186(9): p. 1344-7.
8. Eady, E.A. and J.H. Cove, Staphylococcal resistance revised: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* -an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2003. 1.
9. Etienne, J., Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection? *Clin Infect Dis*, 2005. 41(5): p. 591-3.
10. From the Centers for Disease Control and Prevention. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Among Healthy Newborns-Chicago and Los Angeles County. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004. 55: p. 329-332.

11. Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 5(Suppl 5), S350-9
12. Groom, A.V., et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *Jama*, 2001. 286(10): p. 1201-5.
13. Habrun, B., Račić, I., Beck, R., Budimir, A., Benić, M., Kompes, G., ... Cvetnić, Ž. (2011). The presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on large pig breeding farms in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(4), 419–425.
14. Hanberger, H., Walther, S., Leone, M., Barie, P. S., Rello, J., Lipman, J., ... Vincent, J. L. (2011). Increased mortality associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the Intensive Care Unit: Results from the EPIC II study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(4), 331–335.
15. Hanssen, A.M., et al., Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(5): p. 2118-24.
16. <http://iskra.bfm.hr/Upload/Smjernice/Mrsa/mrsa.pdf> Accessed 25/03/2018
17. <http://www.hdkm.hr/wp-content/uploads/2017/11/2017-Rezistencije-knjiga-2016-za-web.pdf> Accessed 25/03/2018
18. <http://www.iskra.bfm.hr/hrv/Articles.aspx?id=39> Accessed 25/03/2018
19. Jevons, M.P., "Celbenin" -resistant staphylococci. *BMJ*, 1961. 1: p. 124-25.
20. Kalenić, S., Budimir, A., Bošnjak, Z., Acketa, L., Belina, D., Benko, I., ... Juraga, A. T. (2011). Smjernice za higijenu ruku u zdravstvenim ustanovama. *Lijecnicki Vjesnik*, 133(5–6), 155–170.
21. Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., ... Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*.

22. Krzyston-Russjan, J., et al., First community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in Croatia. *Clin Microbiol Infect*, 2006. 12(7): p. 697-8.
23. Krzysztoń-Russjan, J., Tambic-Andrasevic, A., Bukovski, S., Sabat, A., & Hryniewicz, W. (2006). First community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in Croatia [3]. *Clinical Microbiology and Infection*.
24. Li, M., Du, X., Villaruz, A. E., Diep, B. A., Wang, D., Song, Y., ... Otto, M. (2012). MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nature Medicine*, 18(5), 816–819.
25. Muller-Premru, M., et al., New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005. 24(12): p. 848-50.
26. Naimi, T.S., et al., Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*, 2003. 290(22): p. 2976-84.
27. Naimi, T.S., et al., Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis*, 2001. 33(7): p. 990-6.
28. Nakamura, A., Miyake, K., Misawa, S., Kuno, Y., Horii, T., Hori, S., ... Ohsaka, A. (2012). Association between antimicrobial consumption and clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A 14-year study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(1), 90–95.
29. Nimmo, G.R., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust*, 2006. 17: p. 374-75.
30. Obed, A., et al., Fatal pneumonia caused by Panton-Valentine Leucocidine-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (PVL-MRSA) transmitted from a healthy donor in living-donor liver transplantation. *Transplantation*, 2006. 81(1): p. 121-4.

31. O'Brien, F.G., et al., Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(7): p. 3185-90.
32. Otter, J.A. and G.L. French, Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. <http://infection.thelancet.com>, 2006. 6(december): p. 753-755.
33. Otto, M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1513–1521.
34. Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: What makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*.
35. Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., ... ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *European Communicable Disease Bulletin*, 18(4), 20380.
36. Salgado, C.D., B.M. Farr, and D.P. Calfee, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis*, 2003. 36(2): p. 131-9.
37. Sanches, I.S., et al., Tracing the origin of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods. *Microb Drug Resist*, 1995. 2: p. 319-329.
38. Seybold, U., et al., Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis*, 2006. 42(5): p. 647-56.
39. Shukla, S.K., et al., Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(8): p. 3752-7.
40. Stewart, G.T. and R.J. Holt, Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br Med J*, 1963. 1(5326): p. 308-11.
41. Tansey, E. M. (2008). Superbugs and Superdrugs: a History of Mrsa. *Wellcome Witnesses to Twentieth Century Medicine*, 32.

42. *Tiemersma, E.W., et al., Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis, 2004. 10(9): p. 1627-34.*
43. *Tokor Estee, Moran Ed, C. F. (2009). Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*
44. *Udo, E.E., N. Al-Sweih, and B. Noronha, Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals. Clin Microbiol Infect, 2006. 12(3): p. 262-9.*
45. *Vandenesch, F., et al., Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis, 2003. 9(8): p. 978-84.*
46. *Wannet, W.J., et al., Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol, 2004. 42(7): p. 3077-82.*
47. *Zaoutis, T.E., et al., Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001-2003. Pediatr Infect Dis J, 2006. 25(4): p. 343-8.*

## 10. ŽIVOTOPIS

Anja Stadnik, rođena 4.6.1994. godine u Zagrebu. Pohađala OŠ „Milka Trnina“ Križ nakon čega završava opću gimnaziju SŠ „Ivan Švear“ u Križu. 2012.godine upisuje Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu te je redovita studentica. Govori engleski i njemački jezik. Područje zanimanja: medicinska mikrobiologija, patologija, neuroznanost.