

Boštjan Kocjan¹, Katja Seme², Mario Poljak³

Genetska osnova odpornosti *Staphylococcus aureus* proti meticilinu

Genetic Background of the Staphylococcus aureus Methicillin Resistance

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Staphylococcus aureus* – genetika, meticilinska rezistenca, geni bakterijski, molekularne diagnostične tehnike

Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA) je bil prvič izoliran pred več kot 30 leti in kmalu postal eden najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb tako pri odrasli kot tudi pri otroški populaciji. V zadnjem času se v izvenbolnišničnem okolju vse pogosteje soočamo s pojavljanjem sevov MRSA, ki se po dejavniki odpornosti in virulence ter dejavnikov tveganja za okužbo z MRSA razlikujejo od znanih bolnišničnih sevov. Pričujoči prispevek podaja pregled obstoječe literature o epidemiologiji okužb z MRSA in vzrokih odpornosti proti meticilinu. Podrobno je opisana sestava genetskih elementov, ki so osnova odpornosti proti meticilinu in ostalim betalaktamom. V nadaljevanju je predstavljena teorija o prenosu odpornosti proti meticilinu med stafilokoki ter opisani ključni dogodki v evoluciji, ki so verjetno privedli do nastanka različnih klonov MRSA. V zadnjem delu pregleda so predstavljene molekularne metode, ki se najpogosteje uporabljajo v diagnostiki okužb z MRSA in pri tipizaciji kliničnih izolatov MRSA.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus* – genetics, methicillin resistance, genes bacterial, molecular diagnostic techniques

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was first reported over 30 years ago. Within a decade, MRSA was established as an important nosocomial pathogen in both the adult and pediatric populations. MRSA has also emerged as a pathogen in adults and children without traditional risk factors for MRSA infection. Recent studies have demonstrated that these strains have novel resistance and virulence genes. This review focuses on the epidemiology of MRSA infections and the genetic background of methicillin resistance. The genetic background of methicillin resistance and the transfer of the resistance genes between staphylococci are discussed. A theory of MRSA evolution and the development of major globally spread MRSA clones are presented. In addition, widely used methods for the diagnostic and typing of MRSA isolates are also summarized.

¹ Boštjan Kocjan, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

² Doc. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

³ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

UVOD

Staphylococcus aureus je klasična, po Gramu pozitivna patogena bakterija okrogle oblike, ki povzroča omejene gnojne okužbe na različnih predelih telesa. Pogosto okuži kožo, mehka tkiva, kirurške in druge rane ter povzroča vnetje očesne veznice. V kolikor preide v kri, lahko povzroči bakteremijo in sepsa. Približno 30% zdrave odrasle populacije je kolonizirane z bakterijo *S. aureus*, največkrat v nosu, pod pazduho in v dimljah. Osebe, kolonizirane s *S. aureus*, lahko predstavljajo vir okužbe za bolnike na bolniških oddelkih, predvsem na oddelkih intenzivne nege. Koagulazno negativni stafilokoki (angl. *coagulase negative staphylococci*, CNS) vključujejo vrste *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* in številne ostale. Večina je normalnih kožnih komezalov in manj patogenih kot *S. aureus*. Okužbe s CNS so pogoste pri osebah z oslajenim imunskim sistemom in umetnimi vsadki. *S. saprophyticus* lahko povzroča tudi okužbe urinarnega trakta (1, 2). Odkritje antibiotikov v zgodnjih 50-ih letih prejšnjega stoletja je pomenilo bistven napredek v boju z bakterijskimi okužbami, saj se je po uvedbi penicilina v klinično prakso smrtnost zaradi stafilokoknih seps zmanjšala kar za 80%. Zaradi pojava in hitrega širjenja izolatov *S. aureus*, ki so postali odporni proti delovanju penicilina zaradi izločanja betalaktamaz, se je skoraj istočasno pojavila potreba po razvoju novih antibiotikov, ki bi bili učinkoviti pri zdravljenju stafilokoknih in drugih bakterijskih okužb. Uvedba novih protimikrobnih sredstev je bila nujna, saj se je odstotek bolnišničnih sevov *S. aureus*, ki so izločali betalaktamaze, vrtoglavo bližal 90%. Tudi naravni antibiotiki, kot so kloramfenikol, eritromicin, tetraciklin in streptomycin, ki so sprva delovali proti sevom *S. aureus* z betalaktamazami, so kasneje postali neučinkoviti. Izredno hitro naraščanje odpornosti proti različnim skupinam antibiotikov je bila pogosto posledica širjenja mobilnih genetskih elementov; transpozonov in plazmidov z zapisi za odpornost (1). Leta 1959 so sintetizirali prvi polysintetični penicilin, meticilin, ki je bil odporen proti delovanju betalaktamaz, encimov, ki cepijo betalaktamski obroč beta-

laktamov. V kratkem obdobju so mu sledili še nekateri drugi protistafilokokni penicilini (oksacilin, kloksacilin, dikloksacilin, flukloksacilin) s podobnimi kemičnimi, protimikrobnimi in farmakološkimi lastnostmi.

MRSA

Zaradi izjemne učinkovitosti pri zdravljenju stafilokoknih okužb so meticilin pričeli množično uporabljati že kmalu po njegovem odkritju. Dve leti po njegovi uvedbi v klinično prakso so že poročali o prvih izolatih *S. aureus*, odpornih proti meticilinu (angl. *methicillin-resistant S. aureus*, MRSA). Po letu 1961 je MRSA postal najbolj pogost povzročitelj bolnišničnih okužb in epidemij širom po svetu. *S. aureus*, ki je odporen proti meticilinu, je odporen tudi proti vsem drugim betalaktamskim antibiotikom (vsem protistafilokoknim penicilinom, kombinaciji amoksicilina s klavulansko kislino in ampicilina s sulbaktamom, cefalosporinom, monobaktamom in karbapenemom). Odpornost MRSA proti vsem betalaktamom onemogoča učinkovito zdravljenje okužb s temi antibiotiki in zožuje izbor učinkovitih protimikrobnih sredstev (3). Vzrok za odpornost številnih izolatov *S. aureus* proti omenjeni skupini antibiotikov je prisotnost novega tipa penicilin vezujoče beljakovine, PBP2a (angl. *penicilin binding protein*).

Večina sevov MRSA je danes (poleg betalaktamov) odpornih tudi proti številnim drugim skupinam antibiotikov, zdravljenje okužb z MRSA pa večinoma omejeno na glikopeptide, vankomicin in teikoplanin. V zadnjem času za zdravljenje okužb z MRSA uporabljajo tudi tri nove antibiotike in sicer oksazolidinon linezolid, streptogramin daptomicin in ciklični lipopeptid kvinupristin-dalfopristin. Čeprav sevi MRSA niso bolj virulentni od na meticilin občutljivih *S. aureus* (angl. *methicillin-sensitive S. aureus*, MSSA), okužbe z MRSA povzročajo večjo smrtnost zaradi počasnejšega bakteričnega delovanja razpoložljivih antibiotikov. V zadnjem času raste tudi delež izolatov MRSA, ki kažejo zmanjšano občutljivost na še edine preostale antibiotike (glikopeptide), s katerimi že več kot 30 let uspešno zdravimo okužbe, povzročene s sevi MRSA. Zaskrbljujoč je tudi podatek, da je večina novih antibiotikov, izdelanih med leti 1975 in 1999 bore malo

doprinesla k izboljšanju učinkovitosti zdravljenja stafilokoknih okužb (1).

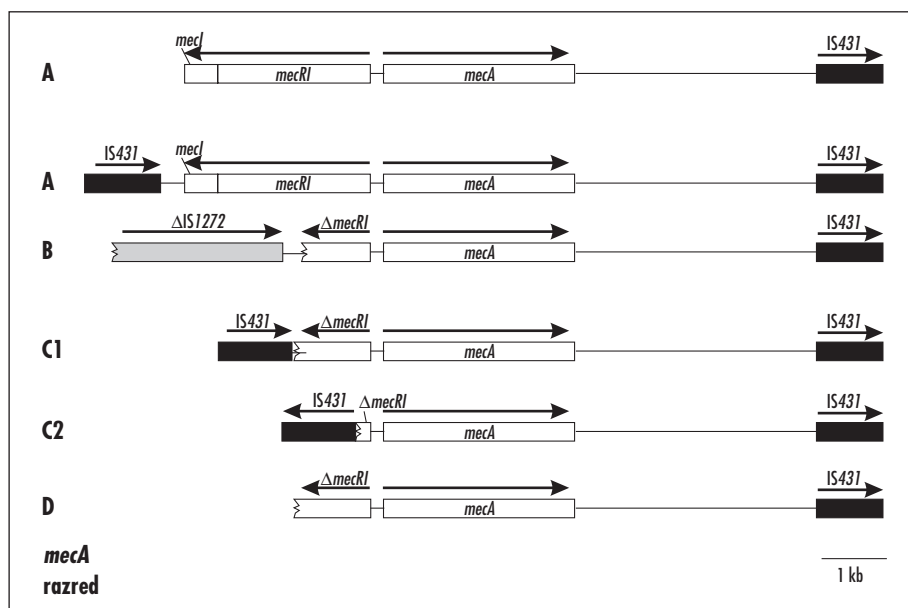
Beljakovina PBP2a

Beljakovino PBP2a kodira gen *mecA*, ki je prisoten na kromosomu številnih proti metilicilinu odpornih sevov stafilokoknih vrst. PBP2a je po svoji funkciji transpeptidaza, ki katalizira nastanek prečnih povezav v peptidoglikanskem delu celične stene MRSA. Za razliko od ostalih PBP-jev (*S. aureus* ima 4 skupine PBP), ima PBP2a nizko afiniteto vezave za betalaktame in je sposobna učinkovite sinteze celične stene tudi takrat, ko so vsi ostali PBP zavrti. Vezava betalaktamov na beljakovine PBP MSSA povzroči njihovo inaktivacijo, kar se odraža v zaviranju sinteze celične stene, spremembi zgradbe celice in celičnih procesov, povezanih s celično steno in delitvijo celice. Posledica motnje normalnega delovanja in zgradbe celične stene je razpad bakterijske celice. Visoko stopnjo odpornosti proti metilicilinu (in večini betalaktamov) dosežejo le stafilokoki, ki izražajo zapis za *mecA*, medtem ko so ostale oblike odpornosti (t. i. nizka stopnja odpornosti) posledica prekomernega izražanja betalaktamaz (angl. *borderline oxacillin-resistant*

S. aureus, sevi BORSA), povečanja količine obstoječih PBP ali zmanjšanje njihove afinitete (angl. *modified normal PBP*s of *S. aureus*, sevi MODSA) (4).

Sestava *mecA*-genskega kompleksa

Genski kompleks *mecA* nosi zapis za inducibilno odpornost proti metilicilinu. Sestavljen je iz insercijskih sekvenc (IS), genov za uravnavanje izražanja *mecA* (*mecI*, *mecR1*) in zapisa za beljakovino PBP2a. Glede na kombinacijo naštetih elementov delimo genski kompleks *mecA* v štiri osnovne razrede (slika 1). Genotip razreda A *mecI-mecR1-mecA-IS431mec* predstavlja prototipsko strukturo genskega kompleksa *mecA*. V ostalih razredih sta gena *mecI* in *mecR1* delno ali popolnoma izbrisana na račun integracije dveh dodatnih insercijskih zaporedij, IS1272 (razred B) ali IS431 (razred C). Razred D ima najenostavnejšo zgradbo, sestavljeno samo iz gena *mecA* in IS431 (Δ *mecR1-mecA-IS431mec*). Pri izolatih MRSA sta bila dokazana le razreda A in B, medtem ko sta razreda C in D omejena na CNS: *S. haemolyticus*, *S. hominis* in *S. caprae* (5, 6). *MecA* kompleksa A in B sta pogosta tudi pri ostalih stafilokoknih vrstah (7).



Slika 1. Različice genskega kompleksa *mecA* (7).

Izražanje gena *mecA* je zelo zapleteno. Poleg običajnih regulatorjev izražanja *MecI* in *MecR1* na njegovo sintezo (verjetno) vplivajo beljakovine, ki sodelujejo pri uravnavanju izražanja betalaktamaz, regulacijska pot genov *fem*, ki kodirajo peptidoglikan modificirajoče encime, ter delecije oziroma mutacije samega gena za represor *MecI* (1, 8).

Genetski mobilni element SCCmec

Kompleks *mecA* je del 21–60 kb velikega genetskega elementa, *SCCmec* (angl. *staphylococcal cassette chromosome mec*). *SCCmec* predstavlja nov razred mobilnih genetskih elementov in je sestavljen iz dveh neodvisnih delov, genskega kompleksa *mecA* in kompleksa genov *ccr* (3, 9). Konce t. i. genske kasete *SCCmec* sestavljajo obrnjene in neposredne ponovitve, ki so mesta delovanja mestno specifičnih encimov rekombinaz *CcrA* in *CcrB* iz družine invertaz/resolvaz. Obe rekombinazi sta sestavni del *SCCmec* in sodelujeta pri integraciji in izrezu elementa iz/v bakterijskega kromosoma (*attB_{sc}* mesto v odprtem bralnem okvirju *orfX*) in sta tako posredno odgovorni za njegovo gibljivost (6, 10).

Glede na kombinacijo alelnih različic genov *ccr* (tip 1, 2, 3) in strukturnih razredov genskega kompleksa *mecA* (A-D) delimo *SCCmec* na štiri tipe: tip I *SCCmec* (*ccr-1* + razred B), tip II *SCCmec* (*ccr-2* + razred A), tip III *SCCmec* (*ccr3* + razred A) in tip IV *SCCmec* (*ccr2* + razred B). Tipi genskih kaset *SCCmec* se razlikujejo po velikosti, genetski organizaciji in številu oziroma tipu genov (gibljivih genetskih elementov), ki jih nosijo (6).

CA-MRSA

Večina izolatov MRSA, ki so razširjeni v bolnišničnem okolju (angl. *hospital acquired-MRSA*, H-MRSA), ima enega od obstoječih zapisov za gensko kaseto *SCCmec* tipa I, II, ali III. Molekularne analize izolatov MRSA, ki se vse pogosteje širijo v izvenbolnišničnem okolju (angl. *community acquired-MRSA*, CA-MRSA), kažejo na prisotnost novega tipa *SCCmec*, opredeljenega kot tip IV. Kot kaže, je ta tip zelo razširjen med CA-MRSA, ki so začeli resno ogrožati izvenbolnišnične populacije, predvsem majhne otroke in ljudi, ki živijo

v tesnem stiku (zaporniki, ekipe športnikov ipd.) (11). Po nekaterih poročilih naj bi bil omenjeni tip *SCCmec* pogost tudi pri sevih H-MRSA oziroma se ta pojavlja znotraj petih filogenetsko različnih linij MSSA, ki krožijo v bolnišnicah. Njegova pogostost v bolnišničnem okolju naj bi v prihodnosti naraščala kot posledica klonalnega sprejemanja *SCCmec* tipa IV (glej naprej) (12). Teorija o prenosu MRSA iz bolnišničnega v izvenbolnišnično okolje je zelo priročna, vendar številne lastnosti, značilne za izolate H-MRSA in CA-MRSA, nakazujejo, da gre po vsej verjetnosti za horizontalno širjenje *mecA* (*SCCmec* IV) med klone, ki krožijo znotraj posameznega okolja (5, 12–14).

PRENOS *mecA*

Analize stafilokoknih genomov nakazujejo, da poteka prenos gena *mecA* iz CNS na seve *S. aureus* s pomočjo genske kasete *SCCmec*. Prvi proti meticilinu odporen *S. aureus* (izoliran v zgodnjih 60-ih) se je verjetno razvil iz epidemične linije MSSA po sprejetju genske kasete *SCCmec* tipa I od neznanega CNS. CNS predstavljajo verjeten rezervoar gena *mecA*, ki se preko horizontalnega genskega prenosa širi na seve *S. aureus*. Prenos *mecA* iz CNS na MSSA poteka z do sedaj še nepojasnjenim mehanizmom, po vsej verjetnosti pa gen *mecA* ostaja znotraj kasete *SCCmec*. Različne tipe (ali različice obstoječih tipov) *SCCmec* pogosto najdemo tudi pri proti meticilinu odpornih CNS (angl. *methicillin-resistant CNS*, MRCNS) (A-, B-razred), prav tako pri proti meticilinu občutljivih CNS (angl. *methicillin-sensitive CNS*, MSCNS) najdemo *SCC*-ju podobne strukture (6, 7, 10, 15, 16). Vse to nakazuje, da je med stafilokoki prenos gena *mecA* možen, vendar ni znano, kako pogosto se to dogaja. Kot enega možnih donorjev gena *mecA* omenjajo *S. epidermidis*, ki je najpogostejši proti meticilinu odporen CNS (16). Genetski gibljivi element *SCC* je verjetno namenjen tudi izmenjavi ostalih genetskih informacij in ni omejen le na prenos gena *mecA*. Najverjetneje obstaja cela družina kaset *SCC* in *SCCmec* je ena od tistih, ki je specializirana za prenos odpornosti proti meticilinu (6). Znanim tipom genske kasete *SCCmec* se bodo v kratkem verjetno pridružili novi, saj obstoječi

PCR (angl. *polymerase chain reaction*) oligonukleotidni začetniki za tipizacijo SCCmec ne pokrivajo vseh kliničnih izolatov MRSA (14).

Z medvrstnim prenosom specifičnih genov stafilokokne vrste premagujejo stresne situacije, kot je prisotnost antibiotikov, težkih kovin, pomanjkanje hranil in gostiteljev imunski odziv. Genski kaseti SCCmec tipa II in III sta pogosti pri klonih MRSA (dominirali sta v 1980-ih), ki poleg običajne odpornosti proti meticilinu izkazujejo tudi odpornost proti različnim drugim skupinam antibiotikov. Poleg zapisa za *mecA* imata ti dve kaseti vgrajene transpozone (Ψ Tn554, Tn554), kopije plazmidov pUB110 in pT118 ter gen za odpornost proti živemu srebru (*mer*). Ti dodatni genetski elementi kodirajo odpornost proti kadmiju in nebetalaktamskim antibiotikom: eritromicinu, tobramicinu/bleomicinu in tetraciklinu (5, 10). V nasprotju z ostalimi člani skupine SCCmec je novi tip IV manjši in ima samo zapis za gen *mecA*. Pri obstoječih tipih genske kasete SCCmec so prisotni tudi nekateri geni, katerih vloga ni povsem jasna, vendar ni povezana z odpornostjo proti antibiotikom (6).

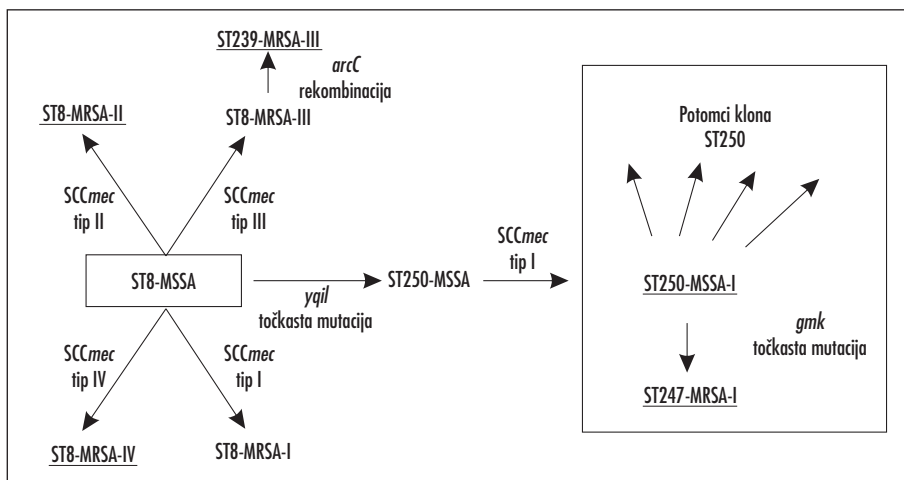
EVOLUCIJSKI IZVOR MRSA

Evolucijski izvor pglavitnih klonov MRSA je še vedno slabo poznan. Pomanjkanje univerzalnega poimenovanja, izbor različnih metod in nestrinjanje glede števila pglavitnih klonov so vzroki, ki raziskave močno zapletajo. Začetne analize izolatov, ki so temeljile zgolj na sistemu polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP), so utemeljevale hipotezo, da je izvor MRSA verjetno klonalni. Po tej hipotezi naj bi v preteklosti gen *mecA* vstopil v populacijo *S. aureus*, pri čemer je nastal en sam klon MRSA, ki se je nato razširil po svetu (17, 18). Druga hipoteza predpostavlja, da so se sevi MRSA razvili večkrat v smislu horizontalnega prenosa gena *mecA* v filogenetsko oddaljene, proti meticilinu občutljive seve *S. aureus* (9, 19). Slednjo hipotezo potrjujejo tudi rezultati tipizacije mednarodne zbirke kliničnih izolatov MRSA (N = 359) in MSSA (N = 553), zbranih v 20 državah v letih 1961–1999 (12, 14). Z določitvijo tipa genske kasete SCCmec z metodo PCR in

nukleotidnega zaporedja nekaterih intrinzičnih (angl. *housekeeping gene*) genov *S. aureus* z metodo MLST (angl. *multilocus sequence typing*) je bilo zaključeno:

- večino okužb povzročajo maloštevilni pandemični kloni,
- odpornost proti meticilinu se je pojavila v petih filogenetsko različnih linijah MSSA; nastalo je 5 pglavitnih linij MRSA: CC5, CC8, CC22, CC30 in CC45,
- obstaja 11 pglavitnih epidemičnih klonov MRSA (angl. *epidemic MRSA*, EMRSA), ki pripadajo omenjenim 5 linijam in so odgovorni za večino svetovnih bolnišničnih okužb,
- znotraj določene linije se je odpornost proti meticilinu pojavila večkrat; pglavitni kloni EMRSA so se razvili iz uspešnih epidemičnih sevov MSSA (klonov MSSA, ki so že bili prisotni v bolnišnicah) s sprejetjem različnih tipov genskih kaset SCCmec (slika 2, klon ST8-MSSA) ali po genetskih spremembah prvotnih klonov EMRSA (slika 2, klon ST8-MRSA-III). V različnih časovnih intervalih je lahko isti sev MSSA sprejel različne SCCmec ter tako botroval nastanku klonov EMRSA z različnimi SCCmec (slika 2, klon ST8-MSSA). Obstaja tudi možnost, da je specifičen klon MRSA po prejetju genske kasete SCCmec zamenjal obstoječi tip SCCmec z novim (angl. *replacement of the SCCmec type*). Ta pojav naj bi bil manj pogost od sprejetja tipov SCCmec s strani sevov MSSA.

Če povzamemo na kratko: večina klonov EMRSA se genetsko ujema s pglavitnimi kloni MSSA, razlikujejo se le v prisotnosti oziroma odsotnosti in tipu genske kasete SCCmec, kar nakazuje na možen horizontalni prenos gena *mecA* med obstoječimi linijami MSSA. Do podobnega zaključka so prišli tudi Wielders in sodelavci (9). Kot kaže, so sevi MSSA, ki so prisotni v bolnišničnem okolju, dobro prilagojeni na (večkratni) sprejem gena *mecA*, kar je v primeru uvedbe meticilina omogočilo nastanek številnih klonov MRSA (EMRSA). Zaradi povečane uporabe vankomicina v klinični praksi tudi kloni EMRSA postajajo vse manj občutljivi na glikopeptide oziroma se pojavljajo različice obstoječih klonov EMRSA, ki so tudi GISA



Slika 2. Razvoj poglavitnih klonov MRSA v filogenetski skupini CC8.

Klon ST8-MSSA predstavlja verjetnega prednika nekaterih (podčrtani) poglavitnih epidemičnih klonov MRSA (14, 19).

(angl. *glycopeptide intermediate resistant S. aureus*) (14).

Na osnovi uporabe DNA-mikromrež (angl. *DNA microarray*) so dokazali prisotnost gena *mecA* v vsaj petih zelo različnih genetskih skupinah MRSA, kar dokazuje, da je imel horizontalni prenos gena *mecA* verjetno poglavito vlogo pri evoluciji MRSA (9). Tudi v raziskavi, objavljeni leta 2001, je bilo dokazano, da v svetu obstajajo najmanj trije različni kloni MRSA, ki nosijo različne zapise za element *SCCmec* (I–III) (10). Podobno je bil z uporabo elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (angl. *pulse field gel electrophoresis*, PFGE) in ribotipizacije dokazan ponavljajoč se horizontalni prenos gena *mecA* v obstoječe (genetsko različne) linije MSSA – kloni MRSA ustrezajo svojim klonom MSSA (9).

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA MRSA

V večini rutinskih diagnostičnih laboratorijev poteka prepoznavna *S. aureus* in določanje odpornosti proti meticilinu na osnovi klasičnih fenotipskih metod. Klasične identifikacijske metode (test DNaze, test proste koagulaze, aglutinacijski testi za površinske antigene in drugi) so počasne in lahko dajejo lažno pozitivne oziroma negativne rezultate. Tudi na

osnovi rezultatov različnih fenotipskih testov za ugotavljanje odpornosti proti meticilinu (disk difuzijska metoda z oksacilinom, presejalna plošča OXA, lateks aglutinacijski testi za PBP2a) je včasih nemogoče zaključiti, ali imamo opravka z odpornim izolatom ali ne. Napačna prepoznavna bakterijskega izolata in/ali napačna opredelitev odpornosti proti meticilinu pa ima lahko hude klinične, epidemiološke in nenazadnje tudi ekonomske posledice.

V praksi se zato vse pogosteje uporabljajo različne molekularne hibridizacijske metode, metode razvejane DNA (angl. *branched DNA*, bDNA) in druge metode pomnoževanja (npr. PCR), s katerimi lahko hitro in zanesljivo ločujemo med izolati MSCNS, MRCNS, MSSA in MRSA. Za odkrivanje ribosomalne RNA *S. aureus* lahko uporabimo kolorimetričen hibridizacijski test AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA, ZDA), za dokazovanje gena *mecA* pa metodološko podoben test Velogene Rapid MRSA (ID Biomedical Corporation, Vancouver, Canada). Razvili so tudi številne različice PCR, s katerimi lahko hkrati pomnožujejo različne stafilokokne gene in odseke gena *mecA*, zato natančna opredelitev stafilokoknih izolatov danes več ne bi smela predstavljati problema (4, 20–22). Dokaz prisotnosti gena *mecA* z metodo PCR velja za zlati standard dokazovanja odpornosti proti meticilinu (4). Kljub izredno visoki občutljivosti

in specifičnosti molekularnih metod jih večina laboratorijev uporablja le kot dopolnilo k razreševanju določenih nejasnih primerov, saj je visoka cena molekularnih metod in nezmožnost obdelave velikega števila vzorcev še vedno precejšnja ovira.

MOLEKULARNE METODE ZA TIPIZACIJO MRSA

Trenutno obstaja kar nekaj tipizacijskih metod, ki temeljijo na analizi bakterijske DNA, s katerimi lahko razločujemo med različnimi sevi *S. aureus*. Uporabljamo jih lahko za raziskovanje epidemij bolnišničnih okužb z MRSA (klinične študije), so neprecenljive za nadzor in omejevanje znotraj- in medbolnišničnega širjenja klonov MRSA ter izredno pomembne za napovedovanje in obvladovanje izbruhov epidemij. Najbolj pogosto uporabljene metode so:

- analiza plazmidnih profilov (angl. *plasmid profile analysis*),
- analiza kromosomske DNA po razgradnji z restrikcijskimi encimi (angl. *analysis of chromosomal DNA after enzymatic restriction*, REA), REA z metodo prenosa po Southernu (angl. *Southern blotting*),
- PFGE,
- tehnike, ki vključujejo PCR in MLST,

- različne izvedbe PCR-ja: Rep-PCR (angl. *repetitive palindromic extragenic elements PCR*), AP-PCR (angl. *arbitrarily primed PCR*), RAPD (angl. *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (angl. *amplified fragment length polymorphism*) oziroma njegova izvedenka s florokromi fAFLP.

Za globalne epidemiološke študije so primerne predvsem nove tipizacijske metode (npr. MLST), ki imajo večjo moč razločevanja (angl. *discriminatory power*) med posameznimi sevi MRSA, so visoko ponovljive in jih je lažje standardizirati. Čeprav sta PFGE in fAFLP pogosto uporabljani in zanesljivi metodi z veliko močjo razločevanja, naj bi bili primernejši zgolj za ugotavljanje sorodnosti izolatov MRSA, osamljenih pri posameznih epidemijah znotraj določene bolnišnice. Za primerjavo izolatov MRSA (MSSA, GISA) med laboratoriji in natančno uvrstitev izolatov med poglavitne epidemične klone EMRSA ali potencialno nove naj bi se uporabljala metoda MLST v kombinaciji z molekularno opredelitvijo tipa genske kasete SCC*mec* (14, 23–26). Čeprav precej kompleksna in počasna metoda PFGE zaenkrat ostaja zlati standard za tipizacijo izolatov MRSA. Morebitna pocenitev opreme in stroškov izvedbe pa napoveduje metodi MLST širšo in pogostejšo uporabnost.

ZAHVALA

Prof. dr. Mariji Gubina, dr. med., se zahvaljujemo za idejo in spodbudo za nastanek tega članka.

LITERATURA

1. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16 Suppl 1: S3–10.
2. Seme K. Stafilokoki. In: Ihan L, Gubina M editors. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. 1st ed. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002. p. 139–45.
3. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1549–55.
4. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 836–71.
5. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 486–93.
6. Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ma XX, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I et al. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003; 185: 2711–22.
7. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1955–63.

8. McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coincided by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol* 2001; 183: 6862–8.
9. Wielders CL, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3970–5.
10. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1323–36.
11. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1147–52.
12. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3926–34.
13. Chambers HF. Tracking the spread of CMRSA. *APUA Newsletter* 2003; 21: 1–5.
14. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7687–92.
15. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1449–58.
16. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCC_{mec} type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3574–9.
17. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227–30.
18. Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J* 1998; 39: 526–33.
19. Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 92–7.
20. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2429–33.
21. Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2392–7.
22. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1875–84.
23. Quelle LS, Corso A, Galas M, Sordelli DO. STAR gene restriction profile analysis in epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: description of the new method and comparison with other polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 455–64.
24. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis* 2003; 7: 32–43.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–9.
26. Ip M, Lyon DJ, Chio F, Enright MC, Cheng AF. Characterization of isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Hong Kong by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4980–5.