

GENETSKA OPREDELITEV ZA METICILIN OBČUTLJIVIH IN PROTI METICILINU ODPORNIH SEVOV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, IZOLIRANIH IZ HEMOKULTUR V SLOVENSКИH BOLNIŠNICAH, S TIPIZACIJO SPA

GENETIC CHARACTERIZATION OF METHICILLIN-SUSCEPTIBLE AND METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM BLOODSTREAM INFECTIONS IN SLOVENE HOSPITALS USING SPA TYPING

Vesna Cvitković Špik¹, Irena Grmek Košnik², Slavica Lorenčič Robnik³, Tjaša Žohar Čretnik⁴, Ljudmila Sarjanovič⁵, Martina Kavčič⁶, Tatjana Harlander⁷, Iztok Štrumbelj⁸, Viktorija Tomič⁹, Irena Piltaver Vajdec¹⁰, Jerneja Fišer¹¹, Jana Kolman¹², Manica Mueller Premru¹

Prispelo: 10. 9. 2008 - Sprejeto: 29. 12. 2008

Pregledni znanstveni članek
UDK 616.9

Izvleček

Staphylococcus aureus je drugi najpogostejši bakterijski povzročitelj invazivnih okužb v Sloveniji. S tipizacijo izolatov za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) iz hemokultur bolnikov z bakteriemijo iz vse Slovenije v 6- mesečnem obdobju smo poskušali ugotoviti, katerim spa tipom pripadajo invazivni izolati MSSA in MRSA v Sloveniji, kakšna je genetska raznolikost MSSA in MRSA ter preveriti uporabnost tipizacije spa za epidemiološke raziskave *S. aureus* v Sloveniji.

Od 1. septembra 2006 do 28. februarja 2007 smo v 11 slovenskih laboratorijih, ki izvajajo mikrobiološko diagnostiko za 15 bolnišnic, zbirali zaporedno izolirane primoizolate MSSA (največ pet) in zaporedno izolirane primoizolate MRSA (največ pet) iz hemokultur bolnikov. Isole *S. aureus* smo tipizirali s tipizacijo spa, to je z določanjem nukleotidnega zaporedja polimorfnega X dela gena spa, ki kodira protein A.

Od 58 zbranih izolatov *S. aureus* iz vse Slovenije smo uspeli tipizirati 54 izolatov. Prevladujoči spa tipi med izolati MSSA so bili t091, t015 in t005, med izolati MRSA pa t041.

Ugotovili smo, da spa tipi, ki prevladujejo med invazivnimi izolati *S. aureus* pri nas, prevladujejo tudi v sosednjih državah. Tipizacija *S. aureus* z metodo spa je pokazala veliko genetsko raznolikost invazivnih sevov MSSA in manjšo raznolikost invazivnih sevov MRSA. Tipizacija spa je uporabna tipizacijska metoda za lokalno epidemiologijo MSSA v kratkem in daljšem časovnem obdobju.

Ključne besede: *Staphylococcus aureus*, bakteriemija, hemokulture, molekularna tipizacija, tipizacija spa

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

² Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska 12, 4001 Kranj

³ Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska 1, 2000 Maribor

⁴ Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Gregorčičeva 5, 3000 Celje

⁵ Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska 13, 5000 Nova Gorica

⁶ Zavod za zdravstveno varstvo Koper, Verdijeva 11, 6000 Koper

⁷ Zavod za zdravstveno varstvo Novo Mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

⁸ Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

⁹ Bolnišnica Golnik, Klinični oddelk za pljučne bolezni in alergijo-KOPA, Golnik 36, 4204 Golnik

¹⁰ Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Gosposvetska 1, 2380 Slovenj Gradec

¹¹ Splošna bolnišnica dr. Franca Derganca Nova Gorica, Ulica padlih borcev 13a, 5290 Šempeter pri Novi Gorici

¹² Univerzitetni klinični center Ljubljana, Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

Kontaktni naslov: e-pošta: vesna.cvitkovic-spik@mf.uni-lj.si

Abstract

Staphylococcus aureus is the second leading cause of invasive bacterial infections in Slovenia. The aims of this 6-month study were to identify the most prevalent *spa* types among invasive isolates of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in Slovene hospitals, to determine genetic diversity of MSSA and MRSA, and to test the applicability of *spa* typing to epidemiological studies of *S. aureus* in Slovenia. Over a period of six months (1 September 2006 – 28 February 2007), up to five successive methicillin-susceptible (MSSA) blood culture isolates and a maximum of five successive methicillin-resistant (MRSA) blood culture isolates per hospital were obtained from different patients with bacteremia. The isolates were characterized by *spa* typing based on sequencing of polymorphic region X of the *S. aureus* protein A gene.

Among the 58 isolates collected 54 were successfully *spa* typed. The predominant *spa* types among MSSA isolates were t091, t015, t005, and among MRSA, t041.

The predominant *spa* types among invasive *S. aureus* strains isolated in Slovenia predominated also in the neighbouring countries. The study showed high genetic diversity of invasive MSSA isolates and lower genetic diversity of invasive MRSA isolates in Slovenia. *Spa* typing is a good typing method for short- and long-term epidemiological studies of MSSA on a local scale.

Key words: *Staphylococcus aureus*, bacteriemia, blood cultures, molecular typing, *spa* typing

Uvod

Staphylococcus aureus je drugi najpogostejši povzročitelj invazivnih okužb v Sloveniji in tudi drugod po Evropi (1). Med invazivnimi izolati *S. aureus* iz hemokultur prevladujejo pri nas izolati *S. aureus*, ki so za meticilin občutljivi (MSSA). Prevalenca proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) iz hemokultur je namreč v Sloveniji v primerjavi z nekaterimi sosednjimi državami dokaj nizka. V zadnjih letih smo zaznali uspešno znižanje z 21 % leta 2000, na 7 % leta 2006 (1). Okužbe z MRSA podaljšajo bolnišnično zdravljenje in so vzrok višje umrljivosti (2).

Molekularno tipizacijo uporabljamo za nadzor epidemičnih sevov *S. aureus*, predvsem za odkrivanje bolj virulentnih klonov MSSA, poti širjenja MRSA med posameznimi bolniki in med različnimi kliničnimi oddelki. Z njo lahko potrdimo ali izključimo genetsko sorodnost med izolati *S. aureus* in s tem ločimo med epidemičnimi in endemičnimi ter sporadičnimi sevi. Trenutno imamo za tipizacijo *S. aureus* na voljo več molekularnih tipizacijskih metod. Izbira metode ali kombinacije metod je odvisna od namena, za katerega potrebujemo tipizacijo (3).

Najpogostejši namen tipizacije *S. aureus* je nadzor nad epidemičnimi sevi bolnišnično pridobljenih MRSA. Tu je potrebno ločiti med genetsko zelo podobnimi sevi *S. aureus*, zato se uporabljajo tipizacijske metode z visoko močjo ločljivosti. Tipizacijska metoda analize kromosomske DNK s pulzno elektroforezo (PFGE) je še vedno najpogosteje uporabljena tipizacijska

metoda za raziskave lokalne epidemiologije *S. aureus* v kratkem časovnem obdobju in velja zaradi visoke moči ločevanja med sevi za zlati standard (4). Ima pa PFGE slabosti kot so: slabša ponovljivost, ločevanje le med omejenim številom izolatov, slaba primerljivost rezultatov med različnimi laboratoriji. Torej PFGE ni primerna metoda za epidemiologijo na širšem geografskem področju in v daljšem časovnem obdobju (5).

Drugi najpogostejši namen tipizacije je nadzor nad okužbami z invazivnimi MSSA, tretji namen pa nadzor nad okužbami z zelo virulentnimi, v domačem okolju pridobljenimi sevi MRSA (CA-MRSA- community-acquired MRSA) (6), ki izdelujejo toksin Panton-Valentine levkocidin (PVL) (7, 8). Zaradi prednosti v primerjavi s PFGE (3) se v zadnjem času za tipizacijo *S. aureus* vedno bolj uveljavljajo metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja, med katerimi je tudi tipizacija *spa*. S to metodo tipiziramo seve glede na razlike v nukleotidnem zaporedju polimorfnega dela X gena *spa*, ki kodira protein A (*Staphylococcus aureus* protein A) (9, 10). Glavne prednosti tipizacije *spa* v primerjavi s PFGE so: hitra pridobitev rezultatov, nedvoumni in dobro ponovljivi številčni rezultati, možnost dodajanja rezultatov v spletne baze podatkov, ki so dostopne vsem, enostavno elektronsko izmenjevanje rezultatov znotraj laboratorijev in med njimi, enostavna uporaba standardizirane nomenklature in uporaba podatkov za preproste filogenetske analize (11). Sevi CA-MRSA se pojavljajo sporadično ali v izbruhih in se genetsko

precej razlikujejo od bolnišničnih klonov MRSA, zato za tipizacijo ni potrebna tako visoka moč ločljivosti in lahko uporabimo tipizacijo *spa*.

Kljub naštetim prednostim v primerjavi z metodo PFGE pa ima tipizacija *spa* premajhno moč ločevanja med izolati, če želimo dokazovati prenos MRSA med bolniki na oddelkih ali med bolnišnicami, kjer v visokem deležu prevladujejo sevi epidemične MRSA posameznega *spa* tipa (11). To je tudi glavni razlog, ki ga navaja Faria s sod., ko svetuje kombinacijo tipizacije *spa* in PFGE kot najboljšo izbiro za tipizacijo *S. aureus* (12).

Za ugotavljanje evolucijske sorodnosti *S. aureus*, pri čemer se ločuje med posameznimi sevi oz. kloni na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju, ki so posledica zelo redkih mutacij, torej v daljšem časovnem obdobju, pa je najprimernejša večgenska sekvenčna tipizacija- MLST (multilocus - sequence typing). MLST temelji na sekveniranju delov sedmih genov, pomembnih za esencialne metabolične funkcije bakterij (nevtralni geni, ki niso pod selekcijskim pritiskom) (13). Njena prednost v primerjavi z drugimi tipizacijskimi metodami je ta, da zanesljivo in z zelo dobro ponovljivostjo prepozna sorodnosti med kloni *S. aureus* tekom dolgih obdobj in na geografsko oddaljenih področjih, slabost pa je visoka cena in zahtevnost izvedbe (3).

S sekvenčnim tipom (ST), ki ga določimo z metodo MLST, *spa* tipom, ki ga določimo s tipizacijo *spa* in s tipom genskega elementa *SCCmec* (*SCCmec* I-V), so enoznačno definirani posamezni glavni epidemični kloni MRSA, ki trenutno krožijo po svetu (14).

V naši raziskavi smo s tipizacijo izolatov *S. aureus* iz hemokultur bolnikov z bakteriemijo iz cele Slovenije v 6-mesečnem obdobju poskušali ugotoviti, katerim *spa* tipom pripadajo invazivni izolati MSSA in MRSA v Sloveniji, kakšna je genetska raznolikost MSSA in MRSA ter preveriti uporabnost tipizacije *spa* za epidemiološke raziskave *S. aureus* v Sloveniji.

Metode

V obdobju od 1. septembra 2006 do 28. februarja 2007 smo v 11 slovenskih laboratorijih, ki so vključeni v mrežo EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), zbirali zaporedno izolirane primoizolate MSSA (največ pet) in zaporedno izolirane primoizolate MRSA (največ pet) iz hemokultur bolnikov v 15 vključenih bolnišnicah. Zbrali smo 58 primoizolatov iz 12 bolnišnic, od tega je bilo 48 izolatov MSSA in 10 izolatov MRSA (Tabela 1). Tri

bolnišnice izolatov *S. aureus* iz hemokultur v tem obdobju niso imele.

Izolate *S. aureus* smo tipizirali z metodo tipizacije *spa*. Metoda temelji na sekveniranju in analizi kromatograma nukleotidnega zaporedja polimorfnege dela X gena *spa* za protein A. Ta polimorfni del je sestavljen iz različnega števila različnih ponavljajočih se, največkrat 24 baznih parov dolgih zaporedij.

Bakterijsko DNK smo iz 24-urne bakterijske kulture izolirali z reagentom Insta Gene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA). Polimorfno zaporedje X smo pomnoževali z oligonukleotidnima začetnikoma *spa*-1113f (5'TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C'3) in *spa*-1514r (5'CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT'3), kot je opisal Harmsen s sod. (11). Produktom smo določili nukleotidno zaporedje po protokolu, ki ga opisuje Strommengerjeva s sod. (15) z reagenti BigDye Terminator v3.1 MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in aparatom ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). *Spa* tip smo določili s pomočjo programa za tipizacijo *spa*, Ridom StaphType (Ridom GmbH, Wurzburg, Germany), ki z analizo kromatograma prepozna posamezna ponavljajoča se zaporedja ter glede na njihovo razporeditev in število določi, kateremu *spa* tipu ustrezajo (11). Kromatogram nukleotidnega zaporedja smo po končani analizi poslali preko spleta na strežnik <http://www.ridom.de/spaserver/>, s čimer smo ponovno preverili kakovost kromatograma in shranili podatek o izolaciji seva z določenim *spa* tipom v podatkovno bazo. Glede na to, da za tipizacijo *S. aureus* vedno več in pogosteje uporabljamo tipizacijo *spa*, stalno odkrivamo tudi nove *spa* tipe in podatkovna baza na strežniku <http://www.ridom.de/spaserver/> se stalno povečuje. Ta baza hrani tudi podatke o frekvenci in geografski lokaciji posameznih *spa* tipov.

Rezultati

Od 58 zbranih izolatov *S. aureus*, med katerimi je bilo 48 MSSA in 10 MRSA, smo s tipizacijo *spa* uspeli tipizirati 54 (93 %) izolatov. Treh izolatov MSSA in enega MRSA nismo uspeli tipizirati.

Tipizirani izolati so spadali v 32 različnih *spa* tipov, od tega 45 izolatov MSSA v 29 in devet izolatov MRSA v tri različne *spa* tipe.

Med MSSA je prevladoval *spa* tip t091. Temu je pripadalo 9 izolatov, našli pa smo ga v obdobju trajanja študije v sedmih bolnišnicah. Drugi najpogostejši je bil *spa* tip t015, ki mu je pripadalo pet izolatov v treh bolnišnicah. Tretji najpogostejši je bil *spa* tip t005, ki

Tabela 1. Zbrani invazivni izolati MSSA in MRSA po laboratorijih in bolnišnicah in njihovi tipi *spa*.Table 1. Invasive MSSA and MRSA isolates collected in laboratories from different hospitals and their *spa* types.

Laboratorij / Laboratory	Bolnišnica / Hospital	Število izolatov MSSA in MRSA / No. of MSSA and MRSA isolates	<i>Spa</i> tip / <i>Spa</i> type
1	SI 001 A	MSSA (5)	t091, t116, t331, t761, t1469
		MRSA (5)	t041, t041, t041, t041, t041
2	SI 002 A	MSSA (3)	t015, t073, t757
3	SI 003 A	MSSA (5)	t091, t091, t015, t056, t156
		MRSA (1)	t003
4	SI 004 A	MSSA (4)	t091, t015, t015, t2830
	SI 004 C	MSSA (1)	t012
5	SI 005 A	MSSA (5)	t091, t116, t084, t846, t1132
		MRSA (1)	t041
6	SI 006 A	MSSA (1)	NT
7	SI 007 A	MSSA (5)	t091, t643, t102, NT, NT
		MRSA (1)	t041
8	SI 008 A	MSSA (5)	t005, t334, t382, t550, t541
		MRSA (2)	t001, NT
9	SI 009 A	MSSA (5)	t091, t091, t122, t2471, t2829
10	SI 010 A	MSSA (4)	t015, t026, t435, t548
11	SI 011 A	MSSA (5)	t091, t005, t005, t026, t474

MSSA: za meticilin občutljiv *Staphylococcus aureus*; MRSA: proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*;
NT- neuspešna tipizacija

so ga imeli trije izolati v treh bolnišnicah. Sledila sta *spa* tipa t026 in t116, ki sta jima pripadala po dva izolata. Kar 24 *spa* tipov je bilo sporadičnih oz. so jim pripadali posamezni izolati MSSA. Med njimi sta bila dva nova oziroma prvič vnešena v podatkovno bazo v strežniku Ridom spaserver, *spa* tipa t2829 in t2830 (Tabela 1, 2).

Pri MRSA je prevladoval *spa* tip t041, ki mu je pripadalo sedem izolatov iz treh bolnišnic. V *spa* tipa t001 in t003 je bil uvrščen po en izolat MRSA iz posameznih bolnišnic (Tabela 1, 2).

Razpravljanje

Ugotovili smo, da je genetska heterogenost *S. aureus* velika, saj je 54 tipiziranih izolatov spadalo v kar 32 *spa* tipov. K veliki genetski heterogenosti so najbolj prispevali MSSA, saj je 45 tipiziranih izolatov spadalo v 29 različnih *spa* tipov. Pri MRSA je bila heterogenost majhna, saj je devet izolatov spadalo le v tri *spa* tipe.

Tipizirati nam ni uspelo štirih izolatov, od tega treh izolatov MSSA in enega izolata MRSA. Pri izolatu

Tabela 2. Število tipiziranih izolatov MSSA in MRSA, tipi *spa* in njihova frekvenca.Table 2. The number of *spa* typed isolates of MSSA and MRSA, *spa* types and their frequency.

Skupina	Število tipiziranih izolatov	Število <i>spa</i> tipov	Najpogostejši tipi <i>spa</i> (št. izolatov)
MSSA	45	29	t091 (9) t015 (5) t005 (3) t026 (2) t116 (2) sporadični (24)
MRSA	9	3	t041 (7) t001 (1) t003 (1)
Skupaj	54	32	32/ 54

MSSA nam z uporabljenima oligonukleotidnima začetnikoma ni uspelo pomnožiti polimorfne delo X gena *spa*, o čemer poročajo pri približno 1 % izolatov *Staphylococcus aureus* tudi Faria s sod. (12) in Strommengerjeva s sod. (15). Pri ostalih treh neuspešno tipiziranih izolatih pa nam ni uspelo pridobiti dovolj kakovostnega nukleotidnega zaporedja za vnos v Ridom spaserver, ki ima zelo stroge zahteve glede kakovosti nukleotidnega zaporedja, s čimer se zagotavlja kakovost baze podatkov (11).

Prevladujoči *spa* tip t091 smo določili pri devetih izolatih MSSA bolnikov z bakteriemijo in je predstavljal 16,7 % vseh tipiziranih izolatov. Bolniki s tem *spa* tipom so bili iz sedmih bolnišnic, kar kaže na razširjenost po celi Sloveniji. *Spa* tip t091, ki z metodo MLST spada v sekvenčni tip (sequence type) ST-7, je precej razširjen po Evropi, vključno v naših sosednjih državah Avstriji in Italiji (16). Glede na podatkovno bazo v Ridom spaserver, kjer so vnešeni *spa* tipi *S. aureus* iz različnih kužnin iz večinoma evropskih držav, je od vseh 4231 dosedaj vnešenih *spa* tipov ta *spa* tip na 15. mestu najpogosteje izoliranih *spa* tipov (16). Frekvenca vnosa tega *spa* tipa v Ridom spaserver je 1,06 % vseh *spa* tipov (16).

Drugi najpogostejši *spa* tip med izolati MSSA je bil t015, ki mu je pripadalo pet izolatov v treh bolnišnicah, kar je 9,3 % vseh izolatov *S. aureus* tipiziranih v naši raziskavi. Tudi ta *spa* tip (ST-45) je zelo razširjen po Evropi in je hkrati tudi 10. najpogosteje izolirani *spa* tip (frekvenca v Ridom spaserver je 1,30 %). Prisoten je v vseh naših sosednjih državah (16).

Spa tip t005 (ST-22, 23, 60), ki so mu pripadali trije izolati MSSA iz treh bolnišnic (5,6 % vseh *S. aureus*), so po podatkih Ridom spaserver izolirali med našimi sosednjimi državami samo v Italiji (16). Ta *spa* tip ima frekvenco izolacije v Evropi 0,76 %.

Štiriindvajset izolatov MSSA (53 %) pa je spadalo v sporadične *spa* tipe. Med njimi smo dokazali dva nova, še neopisana *spa* tipa in ju dodali v podatkovno bazo Ridom spaserver kot t2829 in t2830. Heterogenost sevov MSSA izoliranih iz hemokultur v Sloveniji je primerljiva z rezultati tipizacije *spa* MSSA iz objav (15).

Med izolati MRSA je prevladoval *spa* tip t041, ki mu je pripadalo sedem izolatov iz treh bolnišnic. V eni bolnišnici smo dokazali izolat MRSA *spa* tipa t003, v eni pa izolat *spa* tipa t001. Vsi ti trije *spa* tipi spadajo, glede na podatkovno bazo Ridom spaserver, v klonalni kompleks CC5, kar pomeni, da imajo skupnega prednika (14).

Spa tip t001 so pri izolatih MRSA iz različnih kužnin iz Slovenije iz obdobja 1981-1998 dokazali že Cookson in sod. (3). Z MLST so določili, da spada v ST-228 in z določanjem tipa genskega elementa *SCCmec*, da je nosilec *SCCmec* I. V ta klon (ST-228-MRSA-I), znan kot južnonemški epidemični klon MRSA, so uvrščeni tudi *spa* tipi t041, t023, t188, t201 (5). V Evropi je zelo razširjen, tudi v vseh naših sosednjih državah (16). *Spa* tip t001 je osmi najpogosteje izolirani *spa* tip v Evropi (frekvenca izolacije v podatkovni bazi Ridom spaserver je 1,94 %), *spa* tip t041 pa je nekoliko manj pogost (frekvenca izolacije med vsemi *S. aureus* je 0,78 %) (16).

Cookson in sod. (3) *spa* tipa t003 med slovenskimi izolati niso našli, zato bi lahko le ugibali, v kateri klon sodi (Rhine Hesse MRSA, EMRSA-3 ali klon New York). Glede na Ridom spaser je t003 najpogosteje izoliran *spa* tip s frekvenco izolacije 13,45 % (16). V naši okolici je opisan tudi v Avstriji in na Hrvaškem. Tudi v raziskavi Strommengerjeve s sod. je spadalo med 1176 tipiziranimi izolati MRSA več kot 50 % v samo dva *spa* tipa, t032 in t003 (15), kar je posledica klonalnega širjenja MRSA. V naši študiji zaradi premajhnega vzorca tipiziranih izolatov MRSA ne moremo sklepati o genetski heterogenosti MRSA v celi Sloveniji v daljšem obdobju. Obstajajo lahko namreč še drugi *spa* tipi MRSA in je zato dejanska heterogenost višja, kot jo prikazujejo naši rezultati. Možno je, vendar redko, da spadajo v isti *spa* tip izolati MRSA in tudi MSSA. Tak je npr. t008, kamor spadajo MSSA in MRSA sevi (15). V naši raziskavi tega nismo opazili. V raziskavi Strommengerjeve s sod. je bilo med 221 *spa* tipi pri 1459 izolatih *S. aureus* takih *spa* tipov 28 (15).

Zaključek

V Sloveniji so prevladovali med izolati MSSA iz hemokultur v obdobju 6 mesecev *spa* tipi t091, t015 in t005, ki so med najpogostejšimi *spa* tipi tudi v naših sosednjih državah in drugod po Evropi. Med izolati MSSA smo dokazali dva nova *spa* tipa, t2829 in t2830.

Med 9 izolati MRSA iz hemokultur v istem časovnem obdobju smo v več bolnišnicah dokazali *spa* tip t041 (v sedmih primerih), ki je med najpogostejšimi MRSA *spa* tipi tudi v drugih evropskih državah.

Velika genetska heterogenost MSSA, ki smo jo dobili v tej raziskavi, in podatki iz literature kažejo, da je tipizacija *spa* primerna za lokalno epidemiologijo MSSA v kratkem in daljšem časovnem obdobju in tudi za epidemiologijo MSSA na širšem geografskem področju. Ta metoda namreč omogoča nedvoumno primerjanje in sledenje posameznih *spa* tipov tudi izven naših meja z izolati *S. aureus* v drugih evropskih državah in drugod.

Uporabnosti metode tipizacije *spa* za lokalno epidemiologijo MRSA v kratkem časovnem obdobju pa nismo uspeli preveriti, ker je bil vzorec premajhen.

Literatura

1. Anon. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual Report 2006. Pridobljeno 21.08.2008 s spletne strani: http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/.
2. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 53-9.
3. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Müller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O'Connell B, Short BD, Thomas J, O'Hanlon S, Enright MC. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1830-7.
4. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1574-85.
5. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friederich AW, Bruggeman CA, Stobbering EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222-35.
6. Grmek-Košnik I, Dermota U, Juteršek B. Proti meticilinu odporna bakterija *Staphylococcus aureus* domačega okolja (CA-MRSA) (Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). *Zdrav Vestn* 2005; 74: 159-65.
7. Müller-Premru M, Strommenger B, Alikadic N, Witte W, Friedrich AW, Seme K, Švent Kučina N, Smrke D, Špik V, Gubina M. New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 848-50.
8. Berglund C, Prevost G, Laventie BJ, Keller D, Söderquist B. The genes for Pantone Valentine leukocidin (PVL) are conserved in diverse lines of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 2008; 10: 878-84.
9. Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandembroucke-Grauls CM, Verhoef J et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 1996; 15: 60-4.
10. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3556-63.
11. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgaenger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-8.
12. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 136-44.
13. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1008-15.
14. Enright MC, Robinson DA, Rundle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 7687- 92.
15. Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U, Witte W. *spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. J Clin Microbiol 2008; 46:574-81.
16. Ridom *spa*server Database. Pridobljeno 25.08.2008. s spletne strani: <http://www.ridom.de/spaserver/>.