

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ksenja MARŠIČ

**PRIMERJAVA DVEH SELEKTIVNIH GOJIŠČ ZA DOKAZOVANJE
IZOLATOV *Staphylococcus aureus* ODPORNIH PROTI METICILINU V
NADZORNIH KUŽNINAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO SELECTIVE AGARS FOR DETECTION OF
METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* FROM
SURVEILLANCE CULTURES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti (BOL), Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Evo Ružič-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recezent: prof. dr. Eva Ružič-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Ksenja Maršič se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ksenja Maršič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.24 + 579.26: 615.33 (043) = 163.6
KG *Staphylococcus*/bolnišnične okužbe/odpornost proti antibiotikom/proti met icilinu
odporni *Staphylococcus aureus*/MRSA/selektivna gojišča/ORSAB/MRSA-
ID/občutljivost gojišč
AV MARŠIČ, Ksenja
SA SEME, Katja (mentorica)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2009
IN PRIMERJAVA DVEH SELEKTIVNIH GOJIŠČ ZA DOKAZOVANJE IZOLATOV
Staphylococcus aureus ODPORNIH PROTI METICILINU V NADZORNIH
KUŽNINAH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 67 str., 11 pregl., 18 sl., 58 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Proti met icilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA) je eden najpogostejših in najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. Za uspešno preprečevanje MRSA v bolnišničnem okolju je zelo pomembna hitra in zanesljiva laboratorijska diagnostika izolatov MRSA v nadzornih kužninah pri bolnikih z dejavniki tveganja za kolonizacijo z MRSA. V zadnjih letih se je močno razširila uporaba kromogenih gojišč. Med najbolj občutljivimi kromogenimi gojišči zasledimo prav MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija), ki smo ga v raziskavi primerjali z že uveljavljenim selektivnim in diferencialnim gojiščem ORSAB (ang. *oxacillin resistance screening agar base*; Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). S kultivacijo nadzornih kužnin na gojišču MRSA-ID smo tako po 24 kot po 48-urni inkubaciji dobili višjo občutljivost in specifičnost. Hkrati smo na novem kromogenem gojišču ugotovili tudi manjše število lažno pozitivnih in negativnih rezultatov. Zato lahko trdimo, da je novo kromogeno gojišče ID zanesljivejše za identifikacijo izolatov MRSA od že uveljavljenega ORSAB gojišča. Zanimalo nas je tudi, ali vrstni red nacepljanja brisov na gojišča vpliva na končne rezultate. Zato smo določeno število nadzornih kužnin nacepili na krvni agar, ORSAB in MRSA-ID gojišče po predhodnem suspendiranju brisov v sterilni fiziološki raztopini in rezultate primerjali z brisi, ki smo jih neposredno nacepili na ista gojišča. Po 48-urni inkubaciji smo po suspendiranju kužnin v sterilni fiziološki raztopini dokazali več MRSA pozitivnih vzorcev kot z neposredno nacepljivjo. Zaradi suspendiranja brisov v sterilni fiziološki raztopini smo po 24 urah ugotovili nekoliko nižjo občutljivost tako na MRSA-ID kot na ORSAB gojiščem. Zato lahko zaključimo, da je uveljavljeni postopek neposrednega nacepljanja kužnin za dokazovanje MRSA dovolj zanesljiv in ustrezen.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.24 + 579.26: 615.33 (043) = 163.6

CX *Staphylococcus*/nosocomial infections/antibiotic resistance/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/MRSA/selective medium/ORSAB/MRSA-ID/sensitivity of the medium

AU MARŠIČ, Ksenja

AA SEME, Katja (supervisor)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TY COMPARISON OF TWO SELECTIVE AGARS FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* FROM SURVEILLANCE CULTURES

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 67 p., 11 tab., 18 fig., 58 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most frequent and important nosocomial pathogens. Recently community-acquired MRSA that differ from nosocomial pathogens in virulent factors and antibiotic resistance, have been repeatedly discovered. Rapid and reliable laboratory diagnostics of MRSA isolates in surveillance cultures is with patients with MRSA colonization risk for successful prevention of MRSA spreading in nosocomial environment essential. In recent years usage of chromogenic medium has widen. Among the most sensitive chromogenic medium MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) has been perceived. In the research this medium is compared with the recognized selective and differential ORSAB (ang. *oxacillin resistance screening agar base*; Oxoid, Basingstoke, Great Britain) medium. After 24 and also 48 hour incubation with cultivating surveillance cultures on MRSA-ID agar, higher sensitivity and specificity has been detected. On the new chromogenic medium fewer false positives and false negatives were detected, which indicates that new chromogenic ID medium is more reliable for MRSA isolates identification than recognized ORSAB agar. We were eager to find out, whether the order of swab inoculation on medium affects the final results. Surveillance cultures were inoculated in ORSAB and MRSA-ID medium and on blood agar, after each swab was emulsified in sterile physiological saline. The results were compared with data from direct inoculation of swabs on ORSAB and MRSA-ID medium and on blood agar. Culture rinsing in sterile physiological solution after 48 hour incubation resulted in more MRSA positives than did the direct inoculation on three mediums. A bit lower sensitivity with MRSA-ID and ORSAB agars was noticed, because dilution of swabs was made in sterile physiological solution. In conclusion, the recognized method of indicating MRSA is proper and reliable.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
SEZNAM OKRAJŠA.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 STAFILOKOKI	4
2.1.1 Morfološke in fiziološke značilnosti stafilokokov	4
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.3 Koagulaza negativni stafilokoki	5
2.2 PROTI METICILINU ODPORNI SEVI BAKTERIJE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (MRSA)	5
2.2.1 Evolucijski razvoj odpornosti <i>S. aureus</i> proti različnim antibiotikom	6
2.2.2 Mehanizmi odpornosti <i>S. aureus</i> proti metcilinu	7
2.2.2.2 Ostale oblike odpornosti proti metcilinu.....	8
2.2.3 MRSA domačega okolja (CA-MRSA)	9
2.3 EPIDEMIOLOGIJA MRSA	10
2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI <i>S. AUREUS</i>	11
2.4.1 Razlika v virulenci med MRSA in MSSA.....	12
2.5 DIAGNOSTIKA MRSA	13
2.5.1 Osamitev MRSA na selektivnem gojišču.....	14
2.5.2 Selektivna in diferencialna kromogena gojišča za istočasno identifikacijo <i>S. aureus</i> in ugotavljanje odpornosti proti metcilinu.....	14
2.5.2.1 MRSA-ID.....	16
2.5.2.2 ORSAB	16
2.5.3 Testi za identifikacijo <i>S. aureus</i>	16
2.5.3.1 Biokemične metode.....	17
2.5.3.2 Aglutinacijski testi za identifikacijo bakterije <i>S. aureus</i>	18
2.5.3.3 Molekularno testiranje.....	19
2.5.4 Določanje odpornosti <i>S. aureus</i> proti metcilinu.....	19
2.5.4.1 Disk difuzijska metoda.....	20
2.5.4.2 Presejalna plošča z oksacilinom.....	20

2.5.4.3 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije oksacilina z E-testom	21
2.5.4.4 Aglutinacijski testi za dokazovanje beljakovine PBP2a	21
2.5.4.5 Molekularni testi za dokazovanje gena <i>mecA</i>	21
2.5.4.6 Molekularne metode za tipizacijo MRSA	22
2.6 NADZOR IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z MRSA	22
2.7 ZDRAVLJE OKUŽB Z MRSA	23
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 MATERIAL	24
3.1.1 Priprava uporabljenih gojišč	24
3.1.1.1 Krvni agar (KA)	24
3.1.1.2 Mueller-Hinton agar (MHA) in MHA z dodatkom 6 µg/mL oksacilina (MHOX).....	25
3.1.1.3 Oxacillin resistance screening agar base (ORSAB)	25
3.1.1.4 Fiziološka raztopina	25
3.1.1.5 Todd-Hewitt bujon suplement (THBS).....	25
3.1.1.6 Cystine lactose electrolyte deficient (CLED).....	26
3.1.1.7 Phenylethyl alcohol agar (FEA).....	26
3.1.1.8 DNazni testni agar	26
3.1.1.9 OF manitol	27
3.1.2 Komercialno pripravljeno gojišče in test za identifikacijo bakterij	27
3.2 METODE	27
3.2.1 Neposredna nacepitev nadzornih brisov na gojišča	27
3.2.2 Nacepitev nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini	29
3.2.3 Klasični testi za identifikacijo <i>S. aureus</i>	30
3.2.3.1 Dokazovanje encima DNaze	30
3.2.3.2 Test koagulaze.....	30
3.2.3.3 Oksidacija manitola.....	30
3.2.3.4 BBL Crystal GP ID	30
3.2.4 Selektivna in diferencialna gojišča za MRSA	31
3.2.4.1 Selektivno in diferencialno gojišče MRSA-ID	31
3.2.4.2 Selektivno in diferencialno gojišče ORSAB	31
3.2.5 Testi za ugotavljanje odpornosti proti oksacilinu	31
3.2.5.1 Disk difuzijska metoda z 1-µg diskom oksacilina	31
3.2.5.2 Oksacilin presejalna plošča s koncentracijo 6 µg/mL oksacilina.....	32
3.2.6 Definicije in podatki analiz	32
4. REZULTATI	34

4.1 RAST STANDARDNIH BAKTERIJSKIH SEVOV NA MRSA-ID IN ORSAB GOJIŠČU	34
4.2 REZULTATI TESTIRANJA KLINIČNIH VZORCEV Z NEPOSREDNO NACEPITVIJO NADZORNIH BRISOV NA GOJIŠČA IN PO PREDHODNEM SUSPENDIRANJU NADZORNIH BRISOV V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI	36
4.2.1 Neposredna nacepitev nadzornih brisov na gojišča	36
4.2.1.1 Rezultati neposredne nacepitve nadzornih brisov glede na vrsto kužnine	38
4.2.1.2 Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost za neposredno nacepivijo nadzornih brisov	39
4.2.2 Nacepitev po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini	41
4.2.2.1 Rezultati nacepitve po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini glede na vrsto kužnine	42
4.2.2.2 Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost za nacepitev po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini	44
4.2.3 Primerjava obeh gojišč z neposredno nacepivijo nadzornih brisov in po nacepivji nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini	46
4.3 LAŽNO POZITIVNE KOLONIJE Z NEPOSREDNO NACEPITVIJO IN PO NACEPITVI NADZORNIH BRISOV PO PREDHODNEM SUSPENDIRANJU V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI	47
4.4 OSTALI MIKROORGANIZMI, KI SMO JIH ZASLEDILI PRI IDENTIFIKACIJI IZOLATOV MRSA	49
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1 RAZPRAVA	50
5.1.1 Primerjava dveh selektivnih diferencialnih gojišč (MRSA-ID in ORSAB)	52
5.1.2 Primerjava neposredne nacepitve brisov z metodo nacepitve nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini	54
5.2 SKLEPI	58
6 POVZETEK	59
7 VIRI	61
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rast standardnih bakterijskih sevov na ORSAB in MRSA-ID gojišču	34
Preglednica 2: Število (oziroma delež) izolatov bakterije <i>S. aureus</i> odpornih proti metilcinu (n = 100) z neposredno nacepitvijo nadzornih brisov po različni inkubaciji na ORSAB in MRSA-ID gojišču	37
Preglednica 3: Število (delež) izolatov bakterije <i>S. aureus</i> odpornih proti metilcinu na ORSAB in MRSA-ID za posamezne nadzorne brise (n = 100)	38
Preglednica 4: Število resnično pozitivnih, lažno negativnih, lažno pozitivnih, resnično negativnih, delež občutljivosti in specifičnosti ter delež pozitivne oz. negativne napovedne vrednosti za neposredno nacepitvijo nadzornih brisov za ORSAB in MRSA-ID gojišče po 24 oz. 48-urni inkubaciji brez obogatitve (n = 100).....	40
Preglednica 5: Število lažno pozitivnih rezultatov na ORSAB in kromogenem MRSA-ID gojišču za neposredno nacepitvijo nadzornih brisov (n = 100)	41
Preglednica 6: Število (oziroma delež) izolatov bakterije <i>S. aureus</i> odpornih proti metilcinu (n = 50) z nacepitvijo nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini in po različni inkubaciji na ORSAB in MRSA-ID gojišču.....	42
Preglednica 7: Število (delež) pozitivnih vzorcev na ORSAB in MRSA-ID gojišču (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini.....	43
Preglednica 8: Primerjava števila resnično pozitivnih, lažno negativnih, lažno pozitivnih, resnično negativnih, delež občutljivosti in specifičnosti ter delež pozitivne oz. negativne napovedne vrednosti za kultivacijo na ORSAB in MRSA-ID gojišču po 24 oz. 48 urni inkubaciji (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini	45
Preglednica 9: Število lažno pozitivnih izolatov na ORSAB in kromogenem MRSA-ID gojišču (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini .	45
Preglednica 10: Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih vzorcev na ORSAB in MRSA-ID gojišču za neposredno nacepitev in za nacepitev vzorcev po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini.....	46
Preglednica 11: Občutljivost in specifičnost ORSAB in MRSA-ID gojišča za neposredno nacepitev in za nacepitev po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Rast proti meticilinu odporni sev bakterije <i>S. aureus</i> na kromogenem gojišču MRSA-ID (levo) in na gojišču ORSAB (desno)	16
Slika 2: Pregled poteka kultivacije z neposredno nacepitvijo nadzornih kužnin	28
Slika 3: Pregled poteka kultivacije z nacepitvijo nadzornih kužnin po predhodnem spiranju v fiziološki raztopini.....	29
Slika 4: <i>Staphylococcus aureus</i> sev (ATCC 43300) odporen proti meticilinu na ORSAB in MRSA-ID gojišču.....	35
Slika 5: <i>Staphylococcus aureus</i> sev (ATCC 25923) občutljiv za meticilin na ORSAB in MRSA-ID gojišču.....	35
Slika 6: <i>Enterococcus faecalis</i> sev ATCC 29212 na ORSAB in MRSA-ID gojišču	35
Slika 7: <i>Escherichia coli</i> sev ATCC 25922 na ORSAB in MRSA-ID gojišču	35
Slika 8: <i>Staphylococcus epidermidis</i> sev (ATCC 14990) občutljiv za meticilin na gojišču ORSAB	36
Slika 9: <i>Staphylococcus epidermidis</i> sev (ATCC 14990) občutljiv za meticilin na gojišču MRSA-ID.....	36
Slika 10: <i>Staphylococcus epidermidis</i> sev (ATCC 51625) odporen proti meticilinu na gojišču ORSAB	36
Slika 11: <i>Staphylococcus epidermidis</i> sev (ATCC 51625) odporen proti meticilinu na gojišču MRSA-ID.....	36
Slika 12: Delež proti meticilinu odporni izolat bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine po neposredni nacepitvi in z različnim načinom inkubacije	39
Slika 13: Delež proti meticilinu odporni izolat bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine po predhodnem suspendiranju in z različnim načinom inkubacije.....	43
Slika 14: Netipične modre kolonije na gojišču ORSAB.....	48
Slika 15: <i>Globicatella sanguis</i>	48

Slika 16: <i>Enterococcus faecalis</i>	48
Slika 17: <i>Micrococcus sedentarius</i>	49
Slika 18: <i>Staphylococcus vitulus</i>	49

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	ang. <i>The American Type Culture Collection</i>
BORSA	ang. <i>borderline oxacillin-resistant S. aureus</i>
CA-MRSA	ang. <i>community acquired-MRSA</i>
CFU	ang. <i>colony forming units</i>
CLSI	ang. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EARSS	ang. <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>
EDTA	etilen diamin tetra acetat
HA-MRSA	ang. <i>hospital acquired-MRSA</i>
HLR	ang. <i>high level resistance</i>
KNS	koagulaza negativni stafilokoki
LLR	ang. <i>low level resistance</i>
McF	McFarland
MODSA	ang. <i>modified normal PBPs of S. aureus</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	ang. <i>multilocus sequence typing</i>
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSA	manitol slani agar
MSSA	za meticilin občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSE	za meticilin občutljiv <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NORSA	ang. <i>nonmultiresistant oxacillin-resistant S. aureus</i>
ORSAB	ang. <i>oxacillin resistance screening agar base</i>
PBP	ang. <i>penicilin binding protein</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PFGE	ang. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
PVL	Panton-Valentine levkocidin
RNA	ribonukleinska kislina
RFLP	ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>
SCC	ang. <i>staphylococcal cassette chromosome</i>
THBS	ang. <i>Todd Hewitt bujon suplement</i>
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> z zmanjšano občutljivost za vankomicin
VRSA	proti vankomicinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	proti vankomicinu odporen enterokok

1 UVOD

Raziskovalec Ogston je leta 1881 v gnojnem človeškem izpljunku opazil okrogle bakterije razporejene v obliki grozda. Zaradi značilnega morfološkega izgleda jih je poimenoval *Staphylococcus*, kar v grščini pomeni grozd (Seme, 2002a). Rosenbach jim je zaradi zlatorumene barve kolonij dodal ime *aureus*. *Staphylococcus aureus* kolonizira kožo in sluznico pri človeku in živalih. Predstavlja tudi pomemben del normalne flore predvsem v nosno-žrelnem predelu (Črnica in sod., 2002).

Skozi zgodovino je *S. aureus* postajal vedno bolj odporen proti številnim antibiotikom. Leta 1961 so v Veliki Britaniji prvič izolirali sev *S. aureus*, ki je bil odporen proti meticilinu (ang. *methicillin resistant S. aureus*; MRSA). Hitro se je razširil po svetu in postal endemičen v številnih zdravstvenih ustanovah. Proti meticilinu odporen *S. aureus* je eden najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb (Črnica in sod., 2002; Rezar in Trampuž, 2002). Širi se predvsem z direktnim stikom preko rok zdravstvenega osebja, redkeje s predmeti in še redkeje po zraku. Zadnja leta se vse bolj pogosto pojavlja tudi v domačem okolju pri zdravih osebah brez značilnih dejavnikov tveganja (ang. *community acquired-MRSA*; CA-MRSA).

Sevi MRSA ne nadomestijo sevov za meticilin občutljive bakterije *S. aureus* (ang. *methicillin-sensitive S. aureus*; MSSA), ampak povečajo celotno stopnjo bolnišničnih okužb z bakterijo *S. aureus* (Tomič, 2005). MRSA sevi so odporni proti vsem betalaktamskim antibiotikom in številnim drugim antibiotikom. Zdravljenje okužb z MRSA je zato zelo problematično. Zdravilo izbora je največkrat antibiotik vankomicin. Zaradi pretirane uporabe v medicini je prav tako postal neučinkovit. Leta 1996 so na Japonskem že izolirali sev stafilokoka z zmanjšano občutljivostjo za vankomicinu (ang. *vancomycin intermediate S. aureus*; VISA) (Boyce in sod., 2005). Sevi VISA so proti meticilinu odporni stafilokoki, ki so spontano in povsem neodvisno od enterokoknih genov postopoma razvili odpornost proti glikopeptidom. Leta 2002 so v Detroitu v ZDA izolirali *S. aureus*, ki je zaradi pridobitve enterokoknega gena *vanA* razvil odpornost proti vankomicinu (ang. *vancomycin resistant S. aureus*; VRSA) (Casey in sod., 2007).

Tudi v Sloveniji predstavljajo MRSA izolati številne probleme. Visoko prevalenco MRSA med vsemi izolati *S. aureus* pripisujemo predvsem posvečanju premajhne pozornosti v preteklosti. Večje bolnišnice in intenzivne enote imajo višji odstotek MRSA kot navadni oddelki in manjše bolnišnice (Črnica in sod., 2002). V zadnjih letih se tej problematiki posveča

vse večje zanimanje, kar se kaže z objavo številčnejših prispevkov v literaturi. Hitro odkrivanje koloniziranih oz. okuženih bolnikov, dekolonizacija bolnikov z MRSA, dosledno upoštevanje higienskih ukrepov in racionalna uporaba antibiotikov že kaže na uspešno zajezitev okužb.

Velik korak v mikrobiološki diagnostiki je bil narejen z razvojem molekularnih metod. Skrajšal se je diagnostični čas in hkrati se je povečala občutljivost in specifičnost identifikacije. Molekularna metoda IDI-MRSA (Infecto Diagnostics, Inc., Sainte-Foy, Quebec, Kanada) predstavlja najbolj občutljivo metodo za identifikacijo MRSA ne glede na vrsto kužnine. Za njegovo izvedbo potrebujemo le 2 do 3 ure. Molekularne metode zahtevajo visoko izobraženo osebje in so drage (van Hal in sod., 2007). V primerjavi s kultivacijo na selektivnih gojiščih so dražje za pet do šestkrat. Zato se še niso razširile v rutinske preiskave MRSA izolatov in se za dokazovanje teh okužb še vedno najpogosteje izvaja kultivacija na krvnem agarju, na selektivnih gojiščih in potrditev sumljivih kolonij z biokemičnimi ali/in serološkimi aglutinacijskimi testi. Rezultate klasične izolacije dobimo šele v roku dveh do štirih dneh in nam onemogočijo hiter pričetek pravega ukrepanja in preprečevanje nadaljnega širjenja MRSA povzročitelja (Perry in sod., 2003).

Želja po čim hitrejšem in čim cenejšem ugotavljanju MRSA v različnih kužninah je vzpodbudila znanstvenike k razvoju številnih kromogenih gojišč. Na kromogenih gojiščih zrastejo določeni izolati v 24 urah ali v kolonijah značilne barve (Diederer in sod., 2006). V naši raziskavi smo želeli primerjati občutljivost novega kromogenega gojišča MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) z že uveljavljenim selektivnim, diferencialnim gojiščem ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija).

1.1 NAMEN DELA

Med najbolj občutljivimi kromogenimi gojišči zasledimo gojišče MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). V raziskavi smo ga primerjali z že uveljavljenim selektivnim in diferencialnim gojiščem ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Zaradi vse večjega števila netipičnih MRSA kolonij na gojišču ORSAB in zanesljivejših rezultatov šele po 48-urni inkubaciji smo na podlagi številnih do sedaj opravljenih raziskav predpostavili, da lahko z uporabo novega kromogenega gojišča MRSA-ID skrajšamo in poenostavimo diagnostični postopek za dokazovanje MRSA v nadzornih kužninah.

Da bi ugotovili, ali vrstni red nacepljanja brisov na gojišča vpliva na končne rezultate, smo določeno število nadzornih kužnin nacepili na krvni agar, ORSAB in MRSA-ID gojišče po predhodnem suspendiranju brisov v fiziološki raztopini in rezultate primerjali z brisi, ki smo jih neposredno nacepili na gojišča. Predpostavili smo, da se bomo s kultivacijo brisov po predhodnem suspendiranju v sterilni fiziološki raztopini izognili pristranosti zaradi vrstnega reda nacepitve brisov in da bomo tako dobili na drugem nacepljenem gojišču MRSA-ID bistveno višji občutljivosti kot na prvem nacepljenem gojišču ORSAB. Na osnovi dobljenih rezultatov smo izračunali občutljivost in specifičnost za 24 in 48 urno inkubacijo ter pozitivno in negativno napovedno vrednost obeh gojišč.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STAFILOKOKI

Stafilokoki so zelo razširjeni mikroorganizmi. Poznanih je že več kot 30 različnih vrst rodu *Staphylococcus*, ki jih uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Bacilli* in red *Bacillales* (Turk in Gostinčar, 2007). Imajo debelo celično steno, ki jim omogoča mesece in leta preživeti v različnih nefizioloških razmerah, predvsem v suhem okolju. Zato ne preseneča dejstvo, da je povezan s kolonizacijo in okužbami v bolnišnicah in domačem okolju (Dancer, 2008). Glede na mikrokapsularne polisaharide delimo stafilokoke v 11 različnih serotipov (Fournier in sod., 1987). V klinični mikrobiologiji je najpomembnejša patogena vrsta *Staphylococcus aureus*. Povzroča omejene gnojne okužbe kože, mehkega tkiva, kirurške in druge rane ter vnetje očesne veznice (Seme, 2002a; Madigan in Martinko, 2006; Kocjan in sod., 2004). Okužbe pri človeku povzročajo tudi: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*. Zdrava koža in sluznica sta učinkoviti pregradi proti širjenju stafilokokov v tkiva. V primeru da *S. aureus* vdre v kri, lahko povzroči bakteriemijo in sepso s številnimi zapleti (infekcijki endokarditis, septični artritis, osteomielitis, abscesi jeter, pljuč, možgan) in visoko smrtnostjo (Kocjan in sod., 2004). *S. aureus* in *S. epidermidis* predstavljata del normalne flore respiratornega trakta in kože (Madigan in Martinko, 2006).

2.1.1 Morfološke in fiziološke značilnosti stafilokokov

Stafilokoki so po Gramu pozitivni, fakultativno anaerobni koki s premerom 0,8 do 1 μm in z nizkim deležem (do 40 %) GC baznih parov. Pod mikroskopom jih opazimo v obliki posameznih kokov, v parih, tetradah, kratkih verižicah in v grozdu podobnih gručah. Rastejo na številnih selektivnih in neselektivnih gojiščih. Imajo aktiven metabolizem. Počasi fermentirajo različne ogljikove hidrate in pri tem tvorijo mlečno kislino brez nastanka plina. Izdelujejo bel oz. temno rumen pigment (Brooks in sod., 2001). So negibljivi, imajo encim katalazo in nimajo oksidaze. Določeni sevi izdelujejo tudi encim koagulazo, ki pretvori fibrinogen v fibrin. S tem, ko fibrin obda bakterijo, oteži gostiteljevo obrambo in prepreči fagocitozo. Na podlagi tega encima delimo stafilokoke na dve skupini: koagulaza pozitivne in koagulaza negativne stafilokoke (Madigan in Martinko, 2006).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Med koagulaza pozitivne stafilokoke uvrščamo samo *S. aureus*. Ker na krvnem agarju raste največkrat v obliki gladkih zlatorumenih kolonij, obdanih z ozkim pasom popolne hemolize, ga imenujemo tudi zlati stafilokok. Proti visokim koncentracijam soli so odpornejši kot druge patogene bakterije, torej so halotolerantne. Približno 20 % ljudi je vedno koloniziranih s *S. aureus*, 30 % je občasnih klicenoscev, 50 % ljudi pa ni nikoli koloniziranih s to bakterijo. *S. aureus* kolonizira številne predele telesa (nos, kožne gube, žrelo, pazduha, dimlje, presredek), najpogosteje se nahaja prav v sprednjih nosnicah (Dancer, 2008). Prehodno se nahaja tudi na rokah, od koder ga z umivanjem ali razkuževanjem bolj ali manj uspešno odstranimo. Najpogosteje se prenaša preko rok zdravstvenega osebja, redkeje preko predmetov in površin in še redkeje po zraku (Grundmann in sod., 2006). Pomemben vir okužb v bolnišničnih oddelkih predstavljajo predvsem osebe kolonizirane s *S. aureus*. Zaradi velike razširjenosti okužb s *S. aureus* je pomembno, da obstajajo zanesljivi, hitri, nezahtevni in poceni diagnostični testi (Luijendijk in sod., 1996).

2.1.3 Koagulaza negativni stafilokoki

Med najpomembnejše vrste koagulaza negativnih stafilokokov (ang. *coagulase negative staphylococci*, KNS) uvrščamo: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*. Številni KNS so lahko odporni proti meticilinu. Najbolj poznan je proti meticilinu odporni *Staphylococcus epidermidis* (ang. *methicillin resistant S. epidermidis*; MRSE), ki ima enak mehanizem odpornosti kot *S. aureus*. Večina KNS so del normalne flore. Povzročajo predvsem okužbe pri imunsko oslabljenih osebah in pri osebah z umetnimi vsadki (Kocjan in sod., 2004). Na krvnem agarju rastejo v obliki belih, motnih, izbočenih kolonij. V primerjavi s *S. aureus* ne izdelujejo encima koagulaze in deoksiribonukleaze (Seme, 2002a; Casey in sod., 2007).

2.2 PROTI METICILINU ODPORNI SEVI BAKTERIJE *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Proti meticilinu odporni sevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) predstavljajo eno izmed najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb in okužb pridobljenih zunaj bolnišnice tako pri odraslih kot tudi pri otrocih (Grundmann in sod., 2006). Sevi MRSA so odporni tudi protim ostalim betalaktamskim antibiotikom (EARSS, 2007). Hitra in natančna detekcija MRSA je ključni element za preprečevanje širjenja okužb in zgodnje zdravljenje (Nahimana in

sod., 2006). Okužbe z MRSA podaljšajo bivanje bolnikov v bolnišnici in povečajo stroške zdravljenja ter smrtnost bolnikov (Flayhart in sod., 2005).

2.2.1 Evolucijski razvoj odpornosti *S. aureus* proti različnim antibiotikom

Alexander Fleming je leta 1928 po naključju odkril prvi antibiotik penicilin. Zaradi vsestranske uporabe penicilina so se že leta 1945 (kmalu po začetku široke uporabe) pojavili prvi, proti penicilinu odporni sevi *S. aureus*. Odpornost proti penicilinu se prenaša s plazmidi, ki imajo zapis za encim penicilinaza, kateri povzroči hidrolizo penicilina. Z izgubo učinkovitosti penicilina je smrtnost stafilokoknih seps ponovno narasla in pojavila se je potreba po razvoju novih učinkovitih antibiotikov (Chambers, 1997).

Leta 1959 so uvedli prvi polysintetski antibiotik meticilin, ki deluje na penicilin odporne penicilinaze. Sintetizirali so še druge, manj toksične, na penicilinazo stabilne peniciline (oksacilin, kloksacilin, dikloksacilin, flukloksacilin). Meticilin je bil zelo učinkovit pri zdravljenju stafilokoknih okužb. Leta 1961 so izolirali prvi proti meticilinu odporen sev *S. aureus*. Najprej se je razširil po Evropi in kasneje tudi po vsem svetu. Sevi *S. aureus*, ki so odporni proti meticilinu, so odporni tudi proti vsem betalaktamskim antibiotikom (vsem protistafilokoknim penicilinom, kombinaciji amoksicilina s klavulansko kislino in ampicilina s sulbaktamom, cefalosporinom, monobaktanom ter karbapenemom) (Kocjan in sod., 2004). Ti sevi izdelujejo poseben penicilin vezoči protein (ang. *penicilin binding protein 2a*; PBP2a ali PBP2'), ki ga kodira kromosomski gen *mecA*. Meticilin pri takšnih sevih zavira vse normalne, nespremenjene penicilin vezoče proteine. Ker PBP2a nadomesti njihovo aktivnost, se sinteza peptidoglikana kljub temu nadaljuje (Seme, 2002b).

V zadnjem času se povečuje delež sevov MRSA, ki imajo zmanjšano občutljivost za vankomicin (ang. *minimum inhibitory concentrations*, MIK; od 8 – 16 mg/mL) (Boyce in sod., 2005). To so tako imenovani sevi VISA (ang. *vancomycin intermediate S. aureus*), ki so se prvič pojavili maja 1996 na Japonskem in kmalu zatem še v Ameriki in Franciji. Od takrat so poročali o približno 100 izolaih VISA izoliranih po celem svetu (Chambers, 1997; Casey in sod., 2007). So proti meticilinu odporni stafilokokni sevi, ki sami, spontano in povsem neodvisno od enterokoknih genov postopoma razvijejo odpornost proti glikopeptidom. Sevi MRSA so v primerjavi s sevi VISA, še vedno občutljivi za vankomicin in imajo MIK od 1 – 4 mg/mL (Boyce in sod., 2005). Leta 2002 so v Detroitu že izolirali *S. aureus*, ki je zaradi pridobitve enterokoknega gena *vanA*, pridobil odpornost proti vankomicinu (VRSA) (Casey in

sod., 2007). Stafilokokni sevi odporni proti glikopeptidom, predstavljajo grozečo nevarnost, ki bi jo z do sedaj razpoložljivimi antibiotiki težko obvladali (Seme, 2002b). Tako se medicina na področju okužb z odpornimi mikroorganizmi vrača v obdobje pred odkritjem penicilina. V zadnjem času se za zdravljenje okužb uporablja nove antibiotike, in sicer: tigeceklin, oksazolidinon linezolid, streptogramin daptomicin in ciklični lipopeptid kvinupristindalfopristin, ki pa ne dosejajo tako učinkovitega delovanja. Zaskrbljujoč je podatek, da je večina novih antibiotikov odkritih od 1975 do 1999, malo pripomoglo k izboljšanju zdravljenja stafilokoknih okužb (Kocjan in sod., 2004).

2.2.2 Mehanizmi odpornosti *S. aureus* proti meticilinu

Meticilin je polsintetični betalaktamski antibiotik. Odporen proti penicilinzam in ima baktericidni učinek. Kot vsi betalaktamski antibiotiki se tudi meticilin veže na karboksipeptidazo in transpeptidazo, ki jih imenujemo tudi penicilin vezoče beljakovine in encim PBP. Z njegovo vezavo prepreči zamreževanje peptidoglikana. Nakopičijo se osnovne sestavine celične stene, ki sprožijo bakterijski avtolitični sistem in razkroj celice. Sevi *S. aureus*, odporni proti meticilinu, so pridobili nov kromosomski gen *mecA*, ki nosi zapis za alternativni penicilin vezoči protein; PBP2a. *S. aureus* ima 4 skupine PBP beljakovin (PBPs 1, 2, 3 in 4). PBP2a ima za razliko pred ostalimi PBP-ji nizko afiniteto vezave za betalaktame in je sposoben učinkovite sinteze celične stene tudi takrat, ko ostali PBP ne delujejo (Kocjan in sod., 2004; Seme, 2002b). Na stopnjo odpornosti meticilina vpliva količina PBP2a produktov (EARSS, 2007).

Genetski kompleks *mecA* je sestavljen iz insercijskih sekvenc (IS), iz genov za uravnavanje izražanja *mecA* (*mecI*, *mecR1*) in iz zapisa za beljakovino PBP2a. Glede na kombinacijo teh sestavin se deli genetski kompleks *mecA* v štiri osnovne razrede. Gen *mecA* ima zelo zapleteno izražanje. Transkripcijski regulator gena *mecA* je represor *mecI* in čezmembranska beljakovina MecR1, ki zazna betalaktame. Pri uravnavanju izražanja betalaktamaz in mutacij (delecije) samega gena za represor *mecI* sodelujeta še beljakovini BlaI in BlaR1 (BlaI beljakovina prepreči transkripcijo betalaktamaznih genov in BlaR1 beljakovina vodi transkripcijo betalaktamaznih genov). Pri izražanju betalaktamaz sodelujejo še geni *fem* (*femA* – *femF*), ki kodirajo peptidoglikan modificirajoče encime (Chambers, 1997). Kadar v okolju ni prisotnih betalaktamov *mecI* zavira prepisovanje *mecA*. V prisotnosti betalaktamov postane *mecR1* aktiven, le ta razgradi represor *mecI*, pride do prepisovanja *mecA* in nastane PBP2a (Kocjan in sod., 2004; Chambers, 1997).

Kompleks *mecA* najdemo na 21 do 60 kbp velikem mobilnem genetskem elementu SCC*mec* (ang. *staphylococcal cassette chromosome*). SCC*mec* je sestavljen iz dveh neodvisnih delov. Iz genetskega kompleksa *mecA* in iz rekombinaz *ccrA* in *ccrB* (ang. *cassette chromosome recombinases*), ki sta odgovorni za ekscizijo ter za vključitev v gostiteljski kromosom (Kocjan in sod., 2004). Kasete se nahaja na mestu attB_{SCC} pri 3' koncu *orfX* (Malhotra-Kumar in sod., 2008). Ker *orfX* leži blizu *ori* mesta, se SCC*mec* lahko zelo hitro prepíše (Grundmann in sod., 2006). Na podlagi kombinacije alelnih različic genov *ccr* (tip 1, 2, 3) in strukturnih razredov kompleksa *mecA* (od A do D) delimo SCC*mec* na pet tipov. SCC*mec* tip I, IV in V kodirajo samo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom. Tipa II in III nosita še gene za odpornost proti drugim antibiotikom. SCC genetsko gibljivi element je tako namenjen tudi izmenjavi ostalih genetskih informacij in ni omejen le na prenos gena *mecA* (Kocjan in sod., 2004; Kuwahara in sod., 2007, cit po Malhotra-Kumar in sod., 2008).

Večina bolnišničnih sevov MRSA (ang. *hospital acquired-MRSA*; HA-MRSA) ima genetsko kaseto SCC*mec* tipa I, II, ali III. V domačem okolju pridobljeni sevi MRSA (ang. *community acquired-MRSA*; CA-MRSA) pa imajo tip IV in redkeje V oziroma njegovo različico V_T (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

S pomočjo analize stafilokoknih sevov so dokazali, da poteka prenos gena *mecA* iz KNS na seve *S. aureus* s pomočjo genetske kasete SCC*mec*. Predvidevajo, da se je prvi proti meticilinu odporen *S. aureus* razvil iz epidemične linije MSSA. *S. aureus* je verjetno sprejel genetsko kaseto SCC*mec* tip I od neznanega KNS. Tako KNS predstavljajo rezervoar gena *mecA*, ki se preko horizontalnih genskih prenosov širi na seve *S. aureus*. Enega izmed možnih donorjev gena *mecA* omenjajo *S. epidermidis*, ki je hkrati tudi eden najpogostejših proti meticilinu odporen KNS (Kocjan in sod., 2004).

Sevi MRSA imajo lahko homogeno ali raznovrstno oz. heterogeno odpornost. Večina heterogenih sevov je občutljivih na nizke koncentracije betalaktamskih antibiotikov (od 1 do 5 µg/mL meticilina). Prav to obliko odpornosti ima večina kliničnih izolatov. Homogena populacija celic pa je sposobna rasti pri visoki koncentraciji meticilina (od 50 do 100 µg/mL) (Chambers, 1997).

2.2.2.2 Ostale oblike odpornosti proti meticilin

Visoko stopnjo odpornosti proti meticilinu in večini betalaktamov dosežejo le stafilokoki, ki izražajo zapis za gen *mecA*. Nizko stopnjo odpornosti lahko povzročijo tudi sevi bakterije *S.*

aureus, ki nimajo gena *mecA*. Te oblike odpornosti so posledica prekomernega izražanja betalaktamaz (ang. *borderline oxacillin-resistant S. aureus*, sevi BORSA), povečanja količine obstoječih PBP ali zmanjšanja afinitete PBP (ang. *modified normal PBPs of S. aureus*, sevi MODSA) (Kocjan in sod., 2004; Jaffe in sod., 2000). Sevi BORSA imajo MIK oksacilina (od 2 do 8 µg/mL) blizu interpretacijske meje in običajno niso odporni proti drugim razredom antibiotikov. Na oksacilin presajalni plošči večinoma ne rastejo in z molekularnimi metodami ne zaznamo gena *mecA*. Okužbe z BORSA se zdravi s kombinacijo betalaktamov in z inhibitorjem betalaktamaz (Chambers, 1997).

Znani so tudi sevi NORSA (ang. *nonmultiresistant oxacillin-resistant S. aureus*). Ti so občutljivi za dva ali več ne-betalaktamska antibiotika (ciprofloksacin, eritromicin, tetraciklin in trimetoprim-sulfamethoksazol) (van Hal in sod., 2008; Louie in sod., 2000).

2.2.3 MRSA domačega okolja (CA-MRSA)

Dolgo časa so menili, da povzročajo sevi MRSA le bolnišnične okužbe. V zadnjih letih se pojavlja nova oblika okužbe z MRSA v domačem okolju pri zdravih osebah brez značilnih dejavnikov tveganja. Povzroča jo v domačem okolju pridobljeni *S. aureus*, odporen proti meticilinu (Lu in sod., 2005). CA-MRSA se v zadnjih letih vse bolj širi med ljudmi. V ZDA je poznana že od leta 1990 in ponekod že dosega epidemično razsežnost (Wijaya in sod., 2006; Boyce in sod., 2005). V primerjavi z bolnišničnimi izolati lažje kolonizira človeka. CA-MRSA povzroča zelo raznolike okužbe. Lahko povzroča okužbo kože, podkožja, pljučnico, sepsa in okužbo oči (Boyle-Vavra in Daum, 2007). V Ameriki, Kanadi in Evropi najpogosteje povzroča te oblike okužb klon USA300 (An Diep in sod, 2006).

CA-MRSA prizadene predvsem majhne otroke in ljudi, ki živijo v tesnem stiku (zaporniki, ekipe športnikov, vojaki,...). Najpogostejši dejavniki tveganja za okužbo s to bakterijo pri športnikih in otrocih so kožne lezije in zdravljenje s sistematskimi antibiotiki. V porodnišnici so za novorojence najpogostejši dejavniki tveganja: prezgodnji porod, dolgotrajen porod, nizka porodna teža, podaljšano bivanje v bolnišnici, invazivni in kirurški posegi, prisotnost katetrov, podaljšana uporaba antimikrobnih snovi in prenos od koloniziranih bolnišničnih delavcev oz. od matere (porodnišnične oz. pediatrične okužbe s CA-MRSA) (Regev-Yochay in sod., 2005).

CA-MRSA ima drugačno genetsko sestavo kot bolnišnični sevi. Razlikuje se po kromosomski kaseti. Ta je manjša in nima zapisov za odpornost proti ne-betalaktamskim antibiotikom. Ti

sevi so občutljivi za eritromicin, klindamicin, rimfampicin, gentamicin, trimetoprim-sulfametoksazol in ofloksacin (Regev-Yochay in sod., 2005). CA-MRSA nosi na IV kromosomski kaseti (redkeje na V oziroma V_T) zapis za eksotoksin Panton-Valentine levkocidin (PVL) (Malhotra-Kumar in sod., 2008; Shukla, 2005). Gen *pvl* sestavljata dva konstrukcijska gena *lukS-PV* in *lukF-PV*. PVL je dvokomponentni citolitični toksin z visoko specifičnostjo za humane polimorfonuklearne celice in za makrofage (Shukla, 2005). Zato je PVL tkivni nekrotizirajoči faktor in povzroča hudo nekrotizirajočo pljučnico, celulitis, absces in furunkulozo. Poleg genov PVL ima CA-MRSA tudi zapis za stafilokokne enterotoksine (SEB, SEC), ki delujejo tudi kot superantigeni in sprožijo v gostitelju čezmerni imunski odziv (Shukla, 2005).

V začetku so menili, da se je CA-MRSA razvila iz HA-MRSA. Vendar občutljivost sevov CA-MRSA na ne-betalaktamske antibiotike in klinična slika podobna za MSSA, kaže na to, da sta se seva CA-MRSA in HA-MRSA razvila ločeno. Predvideva se, da je prišlo do vključitve SCC*mec* elementa v tiste MSSA seve, ki so že vsebovali *pvl* gene (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA MRSA

MRSA je najpogosteje izoliran proti antibiotikom odporen patogen. Z naraščajočo incidenco MRSA okužb se soočajo v številnih delih sveta, vključno z Evropo, Ameriko, Severno Afriko, Daljnim in Bližnim vzhodom (EARSS, 2007). K porastu okužb v zadnjih sedmih letih je prispeval pojav odkritja CA-MRSA pri zdravih ljudeh, ki niso bili izpostavljeni rizičnim faktorjem (An Diep in sod., 2006; Gould, 2005).

Delež MRSA okužb varira od 0 % na severu Evrope in čez 50 % v južnih evropskih državah (EARSS, 2007). Slabše higienske razmere in nižji standard ljudi povečujejo delež MRSA okužb (Kluytmans in van Belkum, 1997). Nihanja v prevalenci MRSA zasledimo tudi znotraj samih držav (Gould, 2005). Trinajst evropskih držav ima delež okužb enak ali večji kot 25 %. V to skupino spadajo vse sredozemske države, Romunija, Velika Britanija in Irska. Manj kot 3 % okužb z MRSA zasledimo v severnih evropskih državah, kjer so že zgodaj začeli s programom za kontrolo bolnišničnih okužb. V Franciji (en sev), Islandiji (en sev) in na Nizozemskem (dva seva) poročajo o odkritju izolatov MRSA, ki imajo zmanjšano občutljivost na vankomicin (VISA) (EARSS, 2007). O vseh šestih do sedaj odkritih VRSA poročajo iz ZDA (Casey in sod., 2007).

V zadnjih letih so v številnih evropskih državah (Franciji, Turčiji, Italiji, Avstriji, Bolgariji) zaznali upadanje okužb. Med njimi je tudi Slovenija. V Sloveniji se od leta 2005 v vseh bolnišnicah ugotavlja rahlo upadanje MRSA okužb. K temu je pripomogel večletni trud za zajezitev okužb. Potrebno se je zavedati, da se okužb ne da popolnoma odpraviti in da nobena država na svetu ni popolnoma brez okužb (EARSS, 2007).

Bolnišnice predstavljajo ogromen okoliški rezervoar MRSA (Gould, 2005). V bolnišnicah se te pogosteje izolira iz pacientov v intenzivnih enotah. To potrjuje tudi podatek objavljen na EARSS straneh, kjer poročajo, da so v 22 od 30 evropskih državah (tudi v Sloveniji) dokazali večji delež sevov MRSA v intenzivnih oddelkih bolnišnic kot v ostalih različnih bolnišničnih enotah (EARSS, 2007). Okužbe z MSSA so v upadanju. Povečuje pa se delež okužb z MRSA. To ne velja za bakteriemije, saj se njihov delež povečuje tako z MSSA kot z MRSA (Gould, 2005).

Visoko tveganje za kolonizacijo z MRSA zasledimo predvsem pri bolnikih z diabetesom, bolnikih izpostavljenih kirurškemu posegom in pri intravenskih uživalcih drog ter okuženih s HIV (Kluytmans in sod., 1997). Bolniki starejši od 65 let imajo v primerjavi z mladimi pacienti petkrat večje relativno tveganje za okužbo z MRSA. K temu pripisujemo spremembe imunskega sistema, nedohranjenost in socialno ekonomske dejavnike. Do 9 % se jih okuži oz. kolonizira ob sprejemu v bolnišnico. Tacconelli in sodelavci (2006) so s primer-kontrolno študijo dokazali, da ima bakteriemija s *S. aureus* višjo smrtnost pri starejši populaciji (Tacconelli in sod., 2006).

2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI *S. aureus*

Na patogenost mikroorganizma vpliva tako bolnikov imunski odgovor kakor tudi bakterijski virulentni dejavniki (Rozgonyi in sod., 2007). *S. aureus* pogosto kolonizira gostitelje asimptomatsko in živi kot komenzal v nosnicah. Bakterija *S. aureus* ima številne virulentne dejavnike. Najbolj proučena sta peptidoglikan z endotoksinsko aktivnostjo in lipoteihoična kislina, ki izzoveta naravni imunski odziv s sproščanjem citokinov iz makrofagov in kemoatraktantov (TNF- α , interleukin-1 β , interleukin-8) (Fournier in Philpott, 2005). Imajo specifične toksine z glavno nalogo inhibirati gostiteljev imunski odgovor na *S. aureus*:

- α , β , γ , δ hemolizin – delujejo hemolitično in citotoksično na eritrocite, levkocite, trombocite in fibroblaste,

- eksofoliativni toksin – povzroči razpad povezav med celicami, ki se kaže kot luščenje zgornjih plasti kože,
- levkocidin sestavljata dve beljakovinski komponenti, ki sinergistično ubijata nevtrofilce in makrofage,
- enterotoksini od A do F povzročijo zastrupitve s hrano (drisko in bruhanje),
- toksin toksičnega šoka – povzroči značilno povišano telesno temperaturo, izpuščaj, luščenje kože in prizadene številne organe.

Stafilokoki tvorijo številne encime: koagulaza (povzroči pretvorbo fibrinogena v fibrin in tvorbo fibrinskega strdka), hialuronidaza (cepi hialuronsko kislino v vezivnem tkivu), deoksi- in ribonukleaza (razgradnja DNA oziroma RNA), katalaza (pretvori peroksid v vodo in kisik), proteinaza, fosfolipaza in betalaktamaze (razgradijo betalaktamski obroč in onesposobijo betalaktamske antibiotike). Nekaj sevov *S. aureus* ima kapsulo (najpogosteje kapsularni tip 5), s katero se zaščitijo pred fagocitno aktivnostjo makrofagov (Fournier in sod., 1987; Brooks in sod., 2001; Seme, 2002a). Zaščitno vlogo pred makrofagi ima tudi beljakovina A. S površinskimi beljakovinami adhezini se bakterije *S. aureus* uspešno vežejo na zunajcelične molekule in sodelujejo pri kolonizaciji gostiteljevih tkiv. Noben virulentni dejavnik ni sposoben sam povzročiti stafilokokne okužbe. Vsi se podpirajo in delujejo usklajeno s povezavo celične stene in s sekretornimi bakterijskimi proteini. Virulentni dejavniki so regulirani s številnimi regulatornimi sistemi: Agr, SarA in Arl (Fournier in Philpott, 2005).

2.4.1 Razlika v virulenci med MRSA in MSSA

Kljub temu da bolnišnični sevi MRSA niso bolj virulentni od sevov MSSA, povzročajo bolnišnično pridobljene MRSA bakteriemije višjo smrtnost. To je verjetno posledica slabšega delovanja drugih antibiotikov (npr. vankomicina) v primerjavi z drugimi proti-stafilokoknimi antibiotiki (Haddadin in sod., 2002; Rozgonyi in sod., 2007).

MRSA in MSSA sevi imajo podobno velikost in zgradbo celične stene. Razlikujejo se v količini izdelanih enterotoksinov. Izdelujejo pa podobno količino citotoksinov. Najpomembnejša razlika med njima je občutljivost za antibiotike. Sevi MRSA so odporne proti vsem betalaktamskim antibiotikom in z lahkoto lahko pridobijo odpornost tudi proti ostalim antibiotikom. Večkratna odpornost indirektno vpliva na patogenost bakterije. Sevi MSSA imajo krajši generacijski čas kot sevi MRSA. Logaritemska faza MRSA sevov je zaradi zakasnitve pri delitvi celic za 5 ur daljša od MSSA, zato se sevi MRSA lahko hitreje

prilagodijo na različne antibiotike. Zato se predvideva, da bujna rast MSSA lahko vpliva na nastale razlike pri virulenci. Vendar do sedaj še ni trdnih dokazov. Zato še vedno drži, da sevi HA-MRSA niso bolj virulentni od sevov MSSA (Rozgonyi in sod., 2007). CA-MRSA pa je lahko zaradi dodatnega virulentnega dejavnika PVL bolj virulenten od MSSA sevov (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

2.5 DIAGNOSTIKA MRSA

Pravočasna in učinkovita identifikacija in izolacija nosilcev MRSA prispeva k zmanjšanju širjenja bolnišničnih in izven bolnišničnih okužb (Philippe in sod., 2008). Za dokazovanje okužbe s *S. aureus* se najpogosteje izvaja kultivacija na neselektivnih in selektivnih gojiščih ter potrditev sumljivih kolonij z biokemičnimi ali/in serološkimi aglutinacijskimi testi (Perry in sod., 2003). Razvija se veliko različnih metod identifikacije MRSA sevov (Perry in sod., 2004). Vsak klinični laboratorij ima oblikovano različno pot dokazovanja omenjenih izolatov. Vsi strmiijo k osamitvi bakterije na selektivnem gojišču, identifikaciji *S. aureus* in določitvi občutljivosti za antibiotike (Regev-Yochay in sod., 2005).

Identifikacija temelji na pozitivni katalazni reakciji, na pozitivnem koagulaznem testu, detekciji deoksiribonukleaze, na aglutinacijskem testu za površinske stafilokokne antigene in na sposobnosti rasti na oksacilinski presajalni plošči (Colakoglu in sod., 2007). Osamitev MRSA v kliničnem vzorcu pomeni, da je bolnik koloniziran oz. okužen z MRSA. Da bi čim hitreje ustrezno ukrepali in preprečili nadaljnje širjenje MRSA, si prizadevajo razviti hitre identifikacijske teste, s katerimi bi istočasno identificirali *S. aureus* in odpornost proti meticilinu (Warren in sod., 2004). Testi morajo biti tudi visoko občutljivi, specifični, tehnološko dostopni vsem laboratorijem in cenovno sprejemljivi (Diederer in sod., 2006). Pomembni napredek v presajalnem testiranju nosilcev MRSA predstavlja verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (ang. *real-time polymerase chain reaction*; RT-PCR) in uporaba različnih selektivnih kromogenih gojišč. Obe metodi sta primerni za dokaz MRSA neposredno v kužnini in imata primerljivo ali večjo občutljivost in specifičnost od tradicionalnih gojitvenih metod na manitol slanem agarju (MSA) z oksacilinom in gojišču ORSAB (ang. *oxacillin resistance screening agar base*; Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) (Philippe in sod., 2008; Perry in sod., 2004; Casey in sod., 2007).

2.5.1 Osamitev MRSA na selektivnem gojišču

Za diagnostiko okužbe z MRSA lahko brise kužnin kultiviramo na neselektivnem krvnem agarju (KA; Merck, Darmstadt, Nemčija). Izolirane sumljive bele kolonije je potrebno nadaljnje identificirati in določiti njihovo občutljivost za meticilin. Zaradi pomanjkljive specifičnosti na krvnem agarju so v široki uporabi tudi različna selektivna gojišča z dodanim suplementom in/ali antibiotiki. Zaradi nizkih stroškov in enostavnosti se množično uporabljajo v rutinskih preiskavah (Krishna in sod., 2008). Eno takšnih selektivnih gojišč predstavlja Mueller-Hinton agar z dodatkom 6 mg/L oksacilina. Problem predstavljajo izolati z nizko odpornostjo proti oksacilinu (BORSA). S pomočjo selektivnih gojišč ne moremo ločiti med BORSA in prave MRSA seve (Arbique in sod., 2001). V primeru da na selektivnem gojišču ne zaznamo rasti za gojišče značilne barve kolonij, ni potrebno izvajati nadaljnjih testov (Perry in sod., 2004).

Med selektivna gojišča uvrščamo tudi obogatitveno gojišče THBS (Todd Hewitt bujon suplement; Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Vsebuje selektivni suplement nalidiksične kisline in sulfat kolistina, ki pospešita rast stafilokokov in streptokokov iz mešanih kultur. Obogatitev je skoraj nujna pri dekoloniziranih pacientih in pri pacientih z visokim tveganjem za kolonizacijo, s tem pa se podaljša čas dokazovanja MRSA izolatov (Grmek-Košnik in sod., 2005).

2.5.2 Selektivna in diferencialna kromogena gojišča za istočasno identifikacijo *S. aureus* in ugotavljanje odpornosti proti meticilinu

Da bi se izognili zamudni osamitvi in izolaciji sumljivih kolonij, so razvili kromogena gojišča, ki omogočajo hitro dokazovanje MRSA neposredno po nacepitvi. Na kromogenih gojiščih zrastejo določeni izolati v kolonijah značilne barve (Diederer in sod., 2006). Prednost kromogenih gojišč je, da dobimo rezultate že v 24 urah. Za višjo občutljivost je potrebno inkubirati gojišča še nadaljnjih 24 ur. Kultivacija na teh gojiščih ne zahteva dodatne laboratorijske opreme in niti strokovnega znanja. Vsebujejo barvne kromogene substrate (kromogen), ki so kemično podobni substratu za specifične bakterijske encime. Ob razmnoževanju mikroorganizma v prisotnosti tega substrata pride zaradi aktivnosti encima do značilne obarvanosti kolonij. Za različne bakterijske vrste se uporablja ustrezne kromogene substrate. Na selektivnost kromogenih gojišč v veliki meri vplivajo vključeni antibiotiki, ki uspešno inhibirajo rast bakterijske normalne flore (Philippe in sod., 2008). Omenjena gojišča

so učinkovita tudi pri podpori bakterijske rasti, še posebej pri majhnih inokulih (Malhotra-Kumar in sod., 2008).

Kromogena gojišča, ki se splošno uporabljajo pri diagnostiki MRSA so: MRSA-ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija), MRSA Select (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francija), CHROMagar MRSA (CHROMagar Microbiology, Pariz, Francija) oz. BBL CHROMagar MRSA (Becton Dickinson, Sparks, ZDA), Chromogenic MRSA/Denim Blue agar (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija), MRSA Ident agar (Heipha GmbH, Heidelberg, Nemčija) in Chromogen oxacillin *S. aureus* (Axon Labs AG, Täfernstrasse, Nemčija) (Malhotra-Kumar in sod., 2008). Čas, ki je potreben za detekcijo direktno iz kulture, je najmanjši pri MRSA Select (1,35 dni), MRSA-ID (1,65 dni), CHROMagar (1,72 dni) in 2,31 dni je potrebnih na ORSAB gojišču. Po obogatitvi pride do manjših sprememb v časih. Za detekcijo na MRSA-ID sta potrebna 2 dni, na CHROMagar 2,25 dni, za ORSAB pa 3 dni (Malhotra-Kumar in sod., 2008).

Sprednji nosnici sta prevladujoči mesti kolonizacije MRSA in vzorci odvzeti iz te lege uspešno rastejo na vseh kromogenih gojiščih. Občutljivost detekcije MRSA za druge vzorce je nižja, predvsem zaradi večje količine kompetitivne flore (Malhotra-Kumar in sod., 2008).

Nekaj študij opozarja na lažno pozitivne rezultate, ki jih dobimo na kromogenih gojiščih. Zato priporočajo izvajanje hitrih potrdilnih testov (npr. lateksna aglutinacija). Lažno pozitivne kolonije, ki jih običajno dobimo na kromogenem gojišču MRSA-ID, so v glavnem KNS, *Enterobacter* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Ti sevi imajo tako kot *S. aureus* α -glukozidazni encim, ki je tarča kromogenu. MRSA-ID prav tako ne zavira rasti vseh po Gramu negativnih bakterij. Zaradi nižje koncentracije cefoksitina lahko zrastejo manjše spremenjene kolonije, ki pa ne ovirajo detekcije MRSA (Malhotra-Kumar in sod., 2008). Leta 2008 je Malhotra-Kumar s sodelavci ugotovil, da je na ORSAB gojišču zelo veliko lažno pozitivnih kolonij (31,6 %). Predvideva, da je to povezano z nizko koncentracijo oksacilina v gojišču. Zato to gojišče zahteva 48 urno inkubacijo in izvedbo koagulaznega testa z visoko specifičnostjo in občutljivostjo (Malhotra-Kumar in sod., 2008).

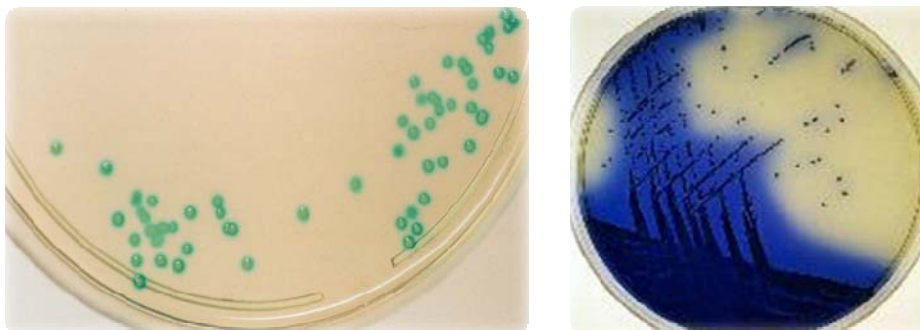
Največjo oviro pri uporabi kromogenih gojišč v rutini predstavlja njihova cena. V primerjavi z običajnimi gojišči so precej dražja. Zaradi manjše potrebe po izvajanju dodatnih potrditvenih testov se pa končna cena celotne preiskave na MRSA bistveno ne spremeni (Malhotra-Kumar in sod., 2008).

2.5.2.1 MRSA-ID

Pred kratkim razvito kromogeno gojišče MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) ima visoko občutljivost in specifičnost (Perry in sod., 2004). MRSA na tem gojišču zasledimo v značilnih zelenih kolonijah s tankim zelenim kolobarjem okrog kolonij kot prikazuje Slika 1. Ostali stafilokoki zrastejo v obliki belih kolonij (Malhotra-Kumar in sod., 2008). Kromogen v MRSA-ID gojišču ima za tarčo *S. aureus* α -glukozidazni encim. V gojišču vključen cefoksitin (4 mg/L) inhibira ostalo kompetitivno floro (Diederer in sod., 2006).

2.5.2.2 ORSAB

Gojišče ORSAB je različica manitol slanega agarja. Dodatek 2 mg/L oksacilina zavira rast MSSA sevom. Vsebuje tudi antibiotik polimiksin B, ki zavira rast po Gramu negativnih bakterij. S pomočjo pH indikatorja anilinskega modrila detektira manitol fermentirajoče stafilokoke in daje MRSA sevom značilno modro obarvanost kolonij in okolice. Seve MRSA, ki zrastejo na gojišču ORSAB po 24 ur inkubacije, je priporočljivo potrditi z lateksno aglutinacijo.



Slika 1: Rast proti meticilinu odporni sev bakterije *S. aureus* na kromogenem gojišču MRSA-ID (levo) in na gojišču ORSAB (desno)

2.5.3 Testi za identifikacijo *S. aureus*

Poznanih je že veliko diagnostičnih testov za identifikacijo *S. aureus*. Glede na princip delovanja jih lahko razdelimo na biokemične metode, aglutinacijske teste in molekularne metode (Jaffe in sod., 2000).

2.5.3.1 Biokemične metode

Vse biokemične metode temeljijo na značilnih fenotipskih lastnostih izolata *S. aureus*. Opazuje se predvsem prisotnost encima katalaze, DNaze, koagulaze, sposobnost fermentacije manitola. Pomembno fenotipsko lastnost predstavlja morfologija celic, morfologija kolonij na neselektivnem krvnem agarju, prisotnost tipa hemolize in sposobnost rasti na selektivnih gojiščih. Biokemične teste lahko večinoma izvajamo le iz kolonij, ki so zrastle na nediferencialnih oz. neselektivnih gojiščih. Omenjene metode so preproste za izvedbo in so cenovno ugodne. Njihova pomanjkljivost je predvsem pojavljanje tako lažno negativnih kot lažno pozitivnih rezultatov (Brooks in sod., 2001).

Dokazovanje encima DNaza

Bakterija *S. aureus* izdeluje encim DNazo in termostabilno endonukleazo. Oba encima sta sposobna hidrolizirati DNA in RNA molekulo predvsem v mono- in dinukleotidne fragmente. Stafilokokna DNaza se od drugih DNaz loči po tem, da optimalno deluje pri višjem pH (8,6 – 9,0). Za aktivacijo potrebuje Ca^{2+} in je zelo termostabilna, saj zdrži 15 minut na 100 °C. Tvorbo DNaze se zazna tudi pri sevih *S. schleiferi*, *S. intermedius* in *S. hyicus*. Za dokazovanje encima se uporabi DNazni agar, ki vsebuje DNA (Tomič, 2005).

Test tvorbe koagulaze

Neznačilne kolonije *S. aureus* se s težavo ločijo od KNS. Za takšne izolate se uporablja koagulazni test, ki loči bakterije na koagulaza pozitivne in negativne (Perry in sod., 2003). Test temelji na sposobnosti tvorbe strdka (koaguluma) v plazmi. Poznana je na celično steno vezana koagulaza in prosta koagulaza, ki se izloča v okolico in so jo sposobne izdelovati številne vrste iz rodu *Staphylococcus*. Prosta koagulaza je zunajcelična beljakovina, ki reagira s protrombinom. Ta se pretvori v stafilotrombin, ki povzroči sproščanje fibrinopeptidov iz fibrinogena in s tem tvori strdek. S testom koagulaze v epruveti se testira tako vezano kot prosto koagulazo. Vezana koagulaza adsorbira fibrinogen plazme in povzroči njegovo precipitacijo na površini stafilokoka. Vezano koagulazo tvori večinoma le vrsta *S. aureus*. Za ugotavljanje vezane koagulaze se uporablja test koagulaze na plošči. Ta test je od testa koagulaze v epruveti hitrejši in bolj ekonomičen. Do 15 % izolatov bakterije *S. aureus* lahko na omenjenem testu kaže lažno negativne rezultate. Predolga inkubacija pri 35 °C lahko pri testu koagulaze v epruveti povzroči lizo strdka (Tomič, 2005; Luijendijk in sod., 1996).

Fermentacija manitola

Za ugotavljanje oksidativne in fermentativne razgradnje ogljikovega hidrata manitola se uporabi selektivno gojišče OF manitol. Da se omogoči anaerobne razmere in s tem fermentacijo manitola se gojišče prelije s parafinom. Zaradi vsebnosti NaCl uspešno rastejo stafilokoki, zavira pa rast ostalim bakterijam, še zlasti enterokokov. Na gojišču prepoznamo *S. aureus* po značilnem rumenem obarvanju. To je pokazatelj tvorbe kisline iz manitola (Brooks in sod., 2001).

Test BBL Crystal GP ID za identifikacijo bakterij

BBL Crystal GP ID (Becton Dickinson, Sparks, ZDA) je miniaturiziran sistem za identifikacijo medicinsko pomembnih aerobnih po Gramu pozitivnih bakterij. Sestavljen je iz 29 testov s fluorogenimi in kromogenimi substrati in s kontrolo fluorescence. Razgradnjo kromogenih substratov zazna kot spremembo barve v vidnem spektru svetlobe. Razgradnjo fluorogenih substratov zazna s fluorescenco pod UV lučjo. S pomočjo tabel se rezultatom pripiše pluse in minuse in te se pretvori v 10 mestno identifikacijsko kodo. S pomočjo računalniškega programa s podatkovno bazo se pretvori koda izolata v ime izolata. Za izvedbo BBL Crystal GP ID testa se lahko uporabi le 24 ur staro kulturo zraslo na neselektivnih gojišč krvnega agarja, TSA (ang. *trypticase soy agar*), PEA (ang. *phenylethyl alcohol agar*). Pomanjkljivost metode je, da zazna omejeno število medicinsko pomembnih po Gramu pozitivnih bakterij (Louie in sod., 2000).

2.5.3.2 Aglutinacijski testi za identifikacijo bakterije *S. aureus*

Poznanih je že veliko komercialnih aglutinacijskih testov za površinske stafilokokne antigene. Rezultate dobimo v roku ene minute. Večina testov uporablja za nosilce antigena lateksne delce z vezanimi antigensko specifičnimi protitelesi. Vsi pa so prekriti s fibrinogenom za odkrivanje prisotnosti vezane koagulaze. Ob dodatku izolata se protitelesa vežejo na različne antigene mikroorganizma, kar privede do nastanka aglutinacije. Sevi bakterij, ki izločajo sluz, prekrijejo površinske antigene in z aglutinacijskim testom dobimo lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate. Teste so izboljšali tako, da so lateksne delce dodatno prekrili s protitelesi proti kapsularnim antigenom tipa 5 in 8, proti specifičnim površinskim antigenom ali beljakovini A. Vse te antigene zasledimo pri 90 % sevov bakterije *S. aureus* (van Griethuysen in sod., 2001; Tomič, 2005). Aglutinacijske teste se lahko uporablja tudi za dokazovanje posameznih sevov *S. aureus*, ki izdelujejo enterotoksine in toksin toksičnega šoka (Seme,

2002a). V mikrobioloških laboratorijih se najpogosteje uporablja: Slidex Staph Plus (bioMérieux, Marcy l' Etoile, Francija), Pastorex Staph Plus (Bio Rad, Marnes la Coquette, Francija), Staphaurex Plus (Murex Diagnostics, Dartford, Velika Britanija) in Dry Spot Staphylect Plus (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) (Tomič, 2005).

2.5.3.3 Molekularno testiranje

Z verižno reakcijo s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*; PCR) se lahko direktno v kužnini dokazuje MRSA. V različnih raziskavah so uporabili različne za bakterijo *S. aureus* značilne odseke DNA (gen *coa* – koagulazni gen značilen za *S. aureus*, gen *nuc* – kodira termostabilno endonukleazo, geni *fem* – kodirajo peptidoglikan modificirajoče encime, gen *TSST1* – povzroči tvorbo toksina pri sindromu toksičnega šoka, gen *pvl* – kodira zapis za Panton-Valentine levkocidin in s katerim ločimo MRSA od MSSA izolatov) (Casey in sod., 2007; Luijendijk in sod., 1996). Te metode zahtevajo drage substrate, opremo, posebej usposobljeno laboratorijsko osebje. Zaradi naštetih vzrokov se PCR le redko uporablja v rutinskih preiskavah (Colakoglu in sod., 2007).

Objavljenih je veliko člankov, v katerih opisujejo različne hitre molekularne teste. Številni avtorji se poslužujejo predhodne obogatitve. S tem se bistveno podaljša čas inkubacije, vendar je v primerjavi s klasičnimi metodami omenjena metoda še vedno hitrejša. Z njimi dobimo rezultate že v roku 4 do 6 ur po odvzemu kužnin (Brown in sod., 2005). Razvili so tudi PCR, ki omogoči identifikacijo stafilokokov direktno iz hemokultur (Louie in sod., 2002). Opisanih je nekaj molekularnih metod, ki temeljijo na hibridizacijski metodi. Lahko jih uporabljamo v kombinaciji s PCR ali samostojno (Kaplan in sod., 2005).

2.5.4 Določanje odpornosti *S. aureus* proti meticilinu

Za učinkovito preprečevanje širjenja MRSA okužb je zelo pomembno hitro in zanesljivo odkrivanje vseh odpornih izolatov. Za določanje odpornosti MRSA izolatov je razvitih več mikrobioloških metod. Delimo jih na fenotipske in genotipske. V rutinskem, kliničnem laboratoriju so najpogosteje v uporabi fenotipske metode, kot je disk difuzijska metoda po Kirby-Bauerju in oksacilin presajalna plošča. Slabost obeh metod je ta, da podajo rezultate šele po 24 ur (Louie in sod., 2000).

2.5.4.1 Disk difuzijska metoda

Standardizirana disk difuzijska metoda nam omogoča določanje občutljivosti proti antibiotikom in se jo zaradi enostavnosti in cenovno ugodnejše metode najpogosteje uporablja v kliničnem mikrobiološkem laboratoriju. Ima tudi nekaj pomanjkljivosti: ni avtomatizirana, uporabna je predvsem za hitro rastoče bakterije in ima manjšo občutljivost za določene antibiotike pri določeni bakterijski vrsti, kar velja tudi za MRSA seve. Občutljivost za določene antibiotike se poveča z uporabo posebnih gojišč z dodatkom NaCl (Chambers, 1997; Brown in sod., 2005).

Koncentracija, izbor antibiotičnih diskov, postopki in interpretacija rezultatov primernih za testiranje bakterije *S. aureus* so opredeljeni v mednarodnih standardih. Države, ki lastnih standardov nimajo izoblikovanih, največkrat upoštevajo priporočila Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Med njimi je tudi Slovenija (Gubina, 2003). Nekoč množično uporabljen metilicinski antibiotični disk so nadomestili z učinkovitejšim oksacilinom oz. sedaj s cefoksitinom (Brown in sod., 2005; Perry in sod., 2004).

Za izvedbo disk difuzijske metode se uporablja papirnate diske impregnirane z natančno določeno količino antibiotika. Disk antibiotika ob stiku z vlažno površino agarja absorbira vodo in antibiotik difundira v gojišče. Premer inhibicijske cone okoli antibiotičnega diska je sorazmeren občutljivosti bakterijskega izolata in obratno sorazmeren MIK antibiotika. Stopnjo občutljivosti bakterijskega seva se izrazi kot občutljiv (senzitiven - S; kar pomeni, da običajni odmerek antibiotika doseže uspešno zdravljenje okužbe, ki jo povzroči testirani bakterijski izolat), zmerno občutljiv (intermediaren - I; kar pomeni, da odmerek zdravila se določi glede na mesto infekcije in MIK) in odporen (rezistenten - R; kar pomeni, da zdravljenje okužbe s tem antibiotikom ne bo uspešno). Kadar inhibicijska cona ni jasna oz. je rast znotraj cone, lahko pomeni mešano kulturo ali prisotnost heterorezistence znotraj testiranega bakterijskega seva.

2.5.4.2 Presejalna plošča z oksacilinom

Oksacilin presajalna plošča je agar dilucijska metoda, s katero se ugotavlja odpornost stafilokokov proti oksacilinu. V osnovi gre za fenotipsko metodo ugotavljanja mehanizma rezistence in se jo uporablja le kot dopolnilno metodo za detekcijo MRSA izolatov. Za gojišče se uporabi Mueller-Hinton agar z 6 µg/mL oksacilina in 4 % NaCl. Interpretacija rezultatov temelji na rasti oz. odsotnosti rasti inokuliranih izolatov. Našli so že nekaj sevov koagulaza

negativnih stafilkokokov, ki ne vsebuje gen *mecA* in imajo mejno odpornost proti oksacilinu. Ti sevi v primerjavi s *S. aureus* zrastejo na oksacilin presajalni plošči šele po 48-urni inkubaciji pri 35 °C in ne po 24 ur, kot so sposobni sevi *S. aureus* (Louie in sod., 2000; Tomič, 2005).

2.5.4.3 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije oksacilina z E-testom

Minimalno inhibitorno koncentracijo lahko določimo z uporabo E-testov. Predstavlja metodo difuzije antibiotičnega gradienta, ki so ga izdelali na Švedskem (Tomič, 2005). E-testi so zelo tanke membrane (trakovi) impregnirane s padajočimi koncentracijami antibiotika. Položi se jih na površino inokuliranih gojišč in se po inkubaciji odčita vrednost MIK na tistem mestu, kjer zaviralna elipsa seka trak (Gubina, 2003).

2.5.4.4 Aglutinacijski testi za dokazovanje beljakovine PBP2a

Leta 1999 je van Leeuwen s sodelavci razvil komercialni aglutinacijski test za dokazovanje PBP2a beljakovine. Metoda je v primerjavi s fenotipskimi metodami zelo zanesljiva in občutljiva. Ker imajo penicilin vezočo beljakovino tudi KNS, ki so prav tako odporni proti meticilinu, je potrebno pred uporabo omenjene metode pravilno in zanesljivo identificirati izolat. Aglutinacijski test ne zazna sevov, ki prekomerno tvorijo encim betalaktamazo in sevov, ki imajo spremenjene PBP beljakovine. Test uporablja lateksne delce, prekrte z monoklonskimi protitelesi proti PBP2a beljakovinom (Veerle in sod, 2007; Louie in sod., 2000).

2.5.4.5 Molekularni testi za dokazovanje gena *mecA*

Molekularne metode določanja odpornosti bakterije *S. aureus* proti meticilinu temeljijo na dokazu gena *mecA*, ki je vzrok za njeno odpornost. Prav dokaz gena *mecA* s PCR velja za zlati standard dokazovanja odpornosti proti meticilinu (Kocjan in sod., 2004). Pomanjkljivost PCR metod je, da zazna *mecA* gen tudi pri sevih kjer se ta ne izraža in tako dobimo lažno pozitivne rezultate. Z zaznavo gena *mecA* prav tako ne moremo ločiti ali gre za MRSA ali KNS. Zato so razvili bolj specifično metodo od PCR, in sicer večkratni PCR. V večkratni PCR se namesto enega samega para doda dva ali več parov oligonukleotidnih začetnikov in s tem se omogoči pomnoževanje različnih tarč (npr. sočasna detekcija *mecA* in *nucA* gena) (Casey in sod., 2007; Louie in sod., 2000). V diagnostiki se je uveljavil tudi RT-PCR, ki omogoča hkratno pomnoževanje in zaznavanje pridelkov in tako skrajša diagnostični čas. Z uporabo PCR metod lahko ločimo med sevi BORSA in MRSA. Za dokazovanje gena *mecA* je poznan tudi

Velogene Rapid MRSA test (IB Biomedical Corporation, Vancouver, Canada) s katerim dobimo rezultate testa že v dobri uri (Kocjan in sod., 2004; Louie in sod., 2000).

2.5.4.6 Molekularne metode za tipizacijo MRSA

Tipizacijske metode temeljijo na določanju fenotipskih in genotipskih lastnosti sevov. Tipizacijo uporabljamo pri iskanju vira in načina širjenja epidemičnih okužb. Danes se za tipizacijo uporablja predvsem genotipske metode, ki imajo v primerjavi s fenotipskimi metodami boljšo ločljivost in medlaboratorijsko primerljivost (Faria in sod., 2008). Vse pogosteje se uporablja analize plazmidnih profilov, polimorfizem dolžin restrikcijskih odsekov (ang. *restriction fragment length polymorphism*; RFLP), makrorestrikcijsko analizo s PFGE (ang. *pulsed-field gel electrophoresis*) in tehnike, ki vključujejo PCR in MLST (ang. *multilocus sequence typing*) (Seme, 2002a; Kocjan in sod., 2004).

2.6 NADZOR IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z MRSA

V današnjih dneh je MRSA endemična v večini bolnišnicah v razvitem svetu. Vsaka država je razvila različne programe za nadzor teh okužb (Haddadin in sod., 2002). MRSA okužbe predstavljajo pomemben klinični in javno zdravstveni problem (Boyce in sod., 2005). Zgodnje odkrivanje MRSA nosilcev je pomemben sestavni del MRSA kontrolnega programa. Ker se številni bolniki, ki so bili okuženi ali kolonizirani vračajo v bolnišnice, se rezervoar MRSA povečuje. Tako je izkoreninjenje MRSA iz nekega oddelka skoraj nemogoče. V zadnjem času se pojavlja vprašanje, ali je nadzor MRSA sploh smiseln in v kakšnem obsegu se ga sploh splača izvajati. Učinkovite strategije nadzora kužnin so povezane z visokimi stroški, ki jih marsikatera bolnišnica ne zmore poravnati (Rubinovitch in Pittet, 2001).

Preprečevanje stafilokoknih okužb je problematično zaradi asimptomatskih nosilcev. Do danes so oblikovali že veliko različnih strategij za zaustavitev širjenja bolnišničnih okužb. Pomembno je izvajanje presajalnega testiranja (kultivacija nadzornih brisov) in uporaba hitrih zanesljivih mikrobioloških testov ter hitro obveščanje zdravstvenega osebja. Zelo pomembno je, da okužene oz. kolonizirane bolnike namestimo v enoposteljno sobo ali v skupno sobo, kjer so bolniki okuženi z isto bakterijo. Pri obravnavi koloniziranih bolnikov je treba upoštevati vse varnostne ukrepe: uporaba rokavic in zaščitne halje, umivanje in razkuževanje rok in učinkovito čiščenje bolnišničnih sob. Pri koloniziranih bolnikih se lahko izvaja dekolonizacija. S tem postopkom poskušamo odstraniti MRSA s telesa ali vsaj zmanjšati njegovo gostoto na sluznicah in koži. Dekolonizacijo se izvaja 5 dni. Bolnika umivamo vključno z lasiščem enkrat

dnevno z antiseptičnim milom (4,5 % klorheksidin). Dvakrat dnevno je potrebno nanesti mupirocin v obe nosnici in trikrat dnevno izvajati ustno nego z 0,2 % klorheksidinom. Z zmanjšano uporabo vsestranskih široko spektrarnih antibiotikov učinkovito prispevamo h kontroli okužb z MRSA (Boyce, 2001). Ne smemo pozabiti na izobraževanje osebja, bolnikov in njihovih svojcev (Rezar in Trampuž, 2002).

2.7 ZDRAVLJE OKUŽB Z MRSA

Zaradi odpornosti MRSA sevov proti betalaktamskim antibiotikom in sorodnim antibiotikom je onemogočeno zdravljenje s temi antibiotiki in se močno zmanjša izbor učinkovitih antibiotikov. Veliko truda vlagajo zdravniki predvsem na preprečevanje prenosa in na izboljšanje zdravstvene oskrbe (Boyce, 2001). Sevi MRSA so odporni proti meticilinu in tudi proti vsem betalaktamskim antibiotikom, vključno s cefalosporini in karbapenemi (Seme, 2002b). Zaradi razvite odpornosti proti številnim antibiotikom je zdravljenje pogosto zelo težavno. Zdravljenje poteka s pomočjo različnih antibiotikov. Na splošno je vankomicin ostal antibiotik prve izbire za resne okužbe z MRSA. Teikoplanin je alternativna izbira za nekatere države. Po zgradbi je zelo podoben vankomicinu in je v primerjavi z vankomicinom manj uspešen pri zdravljenju. V določenih primerih se lahko tudi uporabi antibiotike, kot so rifampicin, minociklin, trimetoprim-sulfametoksazol, fluorokinolon in linezolid (Boyce, 2001; Chambers, 1997).

Mupirocin je najučinkovitejše sredstvo za odpravljanje nosilstva MRSA v nosnicah (Kluytmans in van Belkum, 1997). Nekritična in predolga uporaba mupirocina hitro privede do razvoja odpornosti (Haddadin in sod., 2002; Safdar in sod., 2003). Nizka raven odpornosti proti mupirocinu (ang. *low level resistance*, LLR), če MIK znaša manj kot 256 mg/mL, ne vpliva na zdravljenje z 2 % preparatom mupirocina. Če MIK za mupirocin znaša več kot 256 mg/mL, tako imenovana visoka raven odpornosti (ang. *high level resistance*, HLR), pa je zdravljenje z mupirocinom neučinkovito (Žohar-Čretnik, 1999).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V prvi del raziskave, ko smo neposredno nacepili nadzorne brise na gojišča, smo vključili vse klinične vzorce bolnikov hospitaliziranih pretežno v Kliničnem centru Ljubljana in v Onkološkem inštitutu Ljubljana, ki so bili v obdobju od 10. 12. 2007 do 21. 1. 2008 poslani na preiskavo na MRSA. Za drugo metodo nacepovitve brisa po predhodnem suspendiranju brisa v fiziološki raztopini smo izbrali le vzorce hospitaliziranih bolnikov, pri katerih smo v preteklih štirinajstih dneh dokazali, da so kolonizirani ali okuženi z MRSA in so jih po dekolonizaciji oziroma po zdravljenju z antibiotiki v obdobju od 8. 8. 2008 do 13. 10. 2008 ponovno poslali na preiskavo na MRSA. Pri obeh delih naloge smo se osredotočili le na nadzorne kužnine, in sicer na brise nosu, kožnih gub in žrel.

Vzorce smo testirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti.

Za kontrolo kvalitete gojišč smo upoštevali navodila proizvajalca in pred samim začetkom uporabe MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) in ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) gojišča testirali rast in morfološki izgled kolonij *Staphylococcus aureus* ATCC (ang. *The American Type Culture Collection*) 43300 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (MSSE) in *Staphylococcus epidermidis* ATCC 51625 (MRSE).

3.1.1 Priprava uporabljenih gojišč

3.1.1.1 Krvni agar (KA)

Za pripravo krvnega agarja smo v 1 L čiste vode dodali 40,0 g že pripravljene mešanice Blood Agar Base (Merck, Darmstadt, Nemčija). Nastalo zmes smo avtoklavirali (121 °C 15 min) in nato aseptično dodali 50,0 mL citrirano govejo kri. Merck mešanica vsebuje:

20,0 g srčnega ekstrakta,
5,0 g natrijev klorid in
15,0 g agarja.

3.1.1.2 Mueller-Hinton agar (MHA) in MHA z dodatkom 6 µg/mL oksacilina (MHOX)

MHA gojišče smo pripravili tako, da smo v 1 L čiste vode dodali 38,0 g pripravljene mešanice Mueller Hinton II Agar (Becton Dickinson, Sparks, ZDA). Mešanica vsebuje:

2,0 g govejega ekstrakta,
17,5 g kislega hidrolizata kazeina,
1,5 g škroba in
17,0 g agarja.

Gojišče MHOX pa smo pripravili tako, da smo v 1 L čiste vode dodali 38,0 g pripravljene mešanice Mueller Hinton II Agar, avtoklavirali in po ohladitvi gojišča na 50 °C dodali 0,006 g oksacilina (Becton Dickinson, Sparks, ZDA).

3.1.1.3 Oxacillin resistance screening agar base (ORSAB)

Za ORSAB gojišče smo v 500 mL čiste vode raztopili 51,75 g Oxoid mešanice (Basingstoke, Velika Britanija). Po sterilizaciji smo aseptično dodali eno stekleničko ORSAB selektivnega suplementa, ki vsebuje polimiksin B in 1,0 mg oksacilina. Oxoid mešanica vsebuje:

11,8 g peptona,
9,0 g kvasnega ekstrakta,
10,0 g anitola,
55,0 g natrijev klorid,
5,0 g litijev klorid,
0,2 g anilinsko modrilo in
12,5 g agarja.

3.1.1.4 Fiziološka raztopina

Za pripravo fiziološke raztopine smo raztopili 9,0 g NaCl (Merck, Darmstad, Nemčija) v 1 L čiste vode. Raztopino smo nato razpipetirali v steklene epruvete in jih sterilizirali z avtoklavom.

3.1.1.5 Todd-Hewitt bujon suplement (THBS)

Za pripravo THBS gojišča smo 36,4 g Todd-Hewitt bujon (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) raztopili v 1 L čiste vode. Po sterilizaciji z avtoklavom smo aseptično dodali stafilokokni/streptokokni Oxoid suplement (nalidiksična kislina in sulfat kolistina). Todd-Hewitt bujon vsebuje:

10,0 g mastnega mesa,
20,0 g triptona,
2,0 g glukoze,
2,0 g natrijevega bikarbonata,
2,0 g natrijevega klorida in
0,4 g dinatrijevega fosfata.

3.1.1.6 Cystine lactose electrolyte deficient (CLED)

Za pripravo CLED gojišča smo 36,2 g CLED mešanice (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) raztopili v 1 L čiste vode. CLED mešanica vsebuje:

4,0 g peptona,
3,0 g Lemco prah,
4,0 g triptona,
10,0 g laktoze,
0,128 g L-cisteina,
0,02 g bromtimol modro in
15,0 g agarja.

3.1.1.7 Phenylethyl alcohol agar (FEA)

Za pripravo FEA smo k 1 L čiste vode dodali 42,5 g že pripravljene mešanice Phenylethyl alcohol agar (Becton Dickinson, Sparks, ZDA). Nastalo zmes smo avtoklavirali (121 °C 15 min) in nato aseptično dodali 50 mL goveje krvi. Že pripravljena mešanica vsebuje:

15,0 g pankreaznega izvlečka kazeina,
5,0 g Papaic izvlečka,
5,0 g natrijevega klorida,
2,5 g feniletil alkohol in
15,0 g agarja.

3.1.1.8 DNazni testni agar

Za pripravo DNaznega agarja smo v 1 L čiste vode dodali 42 g DNaznega testnega agarja (Becton Dickinson, Sparks, ZDA).

20,0 g triptona,
2,0 g deoksiribonukleinske kisline,
5,0 g natrijevega klorida in
15,0 g agarja.

3.1.1.9 OF manitol

Za pripravo gojišča OF manit smo v 1 L čiste vode dodali 9,4 g mešanice OF osnovnega gojišča (Difco, Detroit, ZDA) in 10 g manita (Merck, Darmstad, Nemčija). OF mešanica vsebuje:

2 g tripton,
5 g natrijevega klorida,
0,3 g K_2HPO_4 ,
0,08 g brom timol modro in
2,0 agarja.

3.1.2 Komercialno pripravljeno gojišče in test za identifikacijo bakterij

Pri izvedbi raziskave smo uporabili tudi komercialno izdelano gojišče MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) in za identifikacijo po Gramu pozitivne bakterije komercialno izdelan BBL Crystal GP ID (Becton Dickinson, Sparks, ZDA).

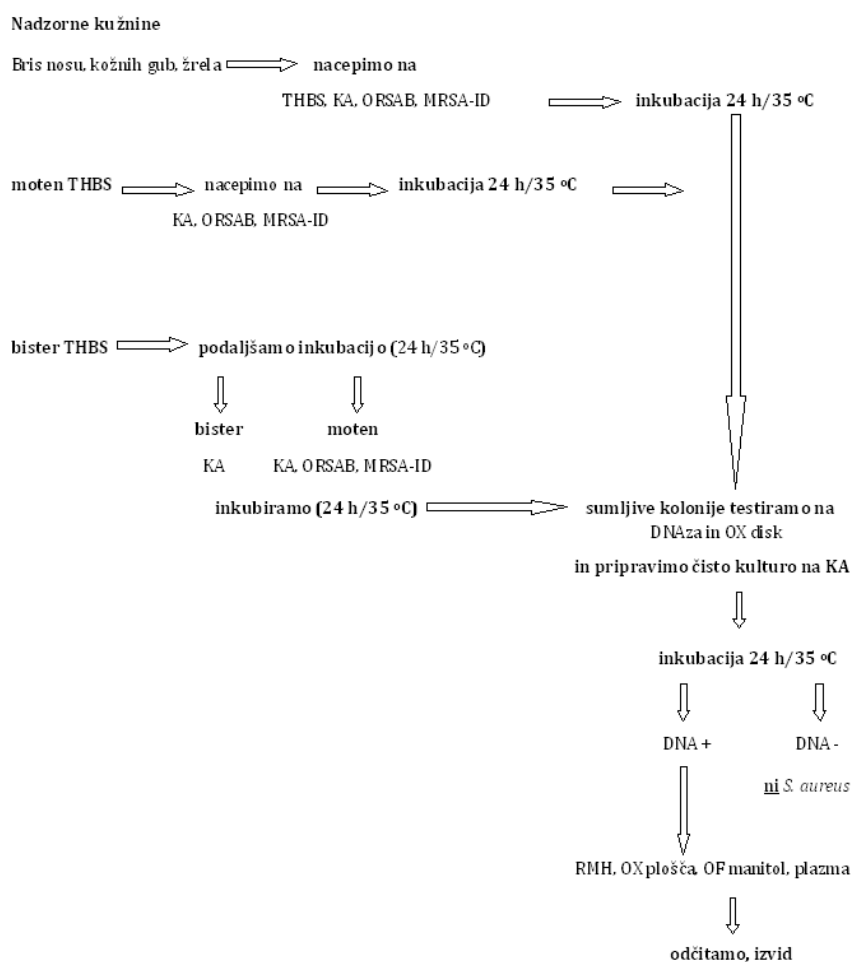
3.2 METODE

3.2.1 Neposredna nacepitev nadzornih brisov na gojišča

V prvi del raziskave smo vključili 200 kliničnih vzorcev – nadzornih kužnin (briso nosu, kožnih gub in žrel), ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti na preiskavo na MRSA. Uveljavljenemu postopku dokazovanja MRSA smo dodali še novo kromogeno gojišče MRSA-ID. Vse kužnine smo najprej nacepili v tekoče obogatitveno gojišče THBS, nato na selektivni gojišči ORSAB in MRSA-ID, ki zavirata rast ostalih bakterij in selekcionirata rast MRSA ter na neselektivni krvni agar. Po končani 24-urni inkubaciji pri 35 °C smo pregledali vse vzorce in v odsotnosti sumljivih kolonij (značilno belo sive kolonije na krvnem agarju, temno modre kolonije z modro obarvano okolico okoli kolonij na ORSAB in tipično velike zelene kolonije na MRSA-ID gojišču) smo kulture inkubirali še nadaljnjih 24 ur pri 35 °C in jih ponovno pregledali po pretekli inkubaciji. Motno obogatitveno THBS gojišče smo z brisom (~ 10 µL) nacepili na MRSA-ID, ORSAB in KA ter inkubirali 24 ur pri 35 °C. Bistrim THBS gojiščem smo podaljšali inkubacijo do 48 ur in jih naslednji dan nacepili na vsa tri gojišča. V primeru, da je bil THBS tudi po 48 ur bister, smo ga nacepili samo na KA. Tako smo v raziskovalni nalogi spremljali rast po 24 in 48 urah na MRSA-ID in ORSAB gojišču brez predhodne obogatitve in rast na omenjenih gojiščih po predhodni 24-urni obogatitvi v gojišču THBS.

Po inkubaciji v ustreznih pogojih smo morfološko sumljive kolonije osamili in identificirali *S. aureus* ter testirali občutljivost na antibiotike. Za identifikacijo MRSA smo uporabili test DNaza, test koagulaze v epruveti, fermentacijo manitola in testiranje občutljivosti za oksacilin (disk difuzijska metoda; RMH in oksacilin presajalna plošča; OX plošča). Celoten postopek določanja MRSA z neposredno nacepitvijo na gojišča je prikazan na Sliki 2.

Na neselektivnem krvnem gojišču zrastejo številni mikroorganizmi, od različnih bakterij do gliv. Največ težav povzročijo roječi sevi *Proteus* spp. Zato smo v tem primeru precepili THBS še na FEA (ang. *phenylethyl alcohol agar*; Becton Dickinson, Sparks, ZDA) in CLED (ang. *cystine lactose electrolyte deficient*; Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) gojišče, ki zavirata njegovo rast in omogočita rast stafilokokov (Perry in sod., 2003).



Slika 2: Pregled poteka kultivacije z neposredno nacepitvijo nadzorih kužnin

3.2.2 Nacepitev nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini

V drugi del raziskave smo vključili 125 nadzornih kužnin bolnikov (briso nosu, kožnih gub in žrel), pri katerih smo predhodno (v obdobju največ štirinajstih dni) dokazali MRSA povzročitelja. Te brise smo vorteksirali 10 sekund v 600 μ L sterilne fiziološke raztopine. Dobljeno suspenzijo smo s pomočjo 50 μ L pipete inokulirali na THBS, ORSAB, MRSA-ID, KA ter se tako izognili vplivu vrstnega reda nacepljanja brisov. Nadaljnji postopek je enak kot v prvem delu raziskave in prav tako smo spremljali rast po 24 in 48 urah na MRSA-ID in ORSAB gojišču brez predhodne obogatitve in rast na omenjenih gojiščih po predhodni 24-urni obogatitvi v gojišču THBS. Postopek je prikazan na Sliki 3.



Slika 3: Pregled poteka kulture z nacepitvijo nadzornih kužnin po predhodnem spiranju v fiziološki raztopini

3.2.3 Klasični testi za identifikacijo *S. aureus*

3.2.3.1 Dokazovanje encima DNaze

Na ploščo DNaza testnega agarja smo s sterilno cepilno zanko (Roll s.a.s, Plove di Saccio, Italija) nacepili testno kulturo stafilokoka v obliki kratke poteze (v premeru 5 do 10 mm). Nacepljeno ploščo smo inkubirali 24 ur v aerobnih pogojih pri 35 °C. Pred odčitavanjem rezultatov smo prelili ploščo z 1 M HCl, ki precipitira nehidrolizirano DNA v gojišču. Počakali smo nekaj minut, odlili odvečno HCl in odčitali rezultat. Pozitiven rezultat je pomenil zbititev agarja ob koloniji, za negativen rezultat pa smo označili, kadar je bilo celotno gojišče motno in je prišlo do precipitacije DNA v kislini. Inokulirali smo tudi pozitivno (*S. aureus* ATCC 25923) in negativno kontrolo (*S. epidermidis* ATCC 12228).

3.2.3.2 Test koagulaze

S testom koagulaza ločimo stafilokoke na koagulaza pozitivne in negativne. V laboratoriju smo uporabili test koagulaze v epruveti z 0,5 mL zajčje plazme (Becton Dickinson, Sparks, ZDA) in z dodatkom etilen diamin tetra acetata (EDTA). V plazmo smo dodali eno cepilno zanko 24-urne čiste bakterijske kulture in inkubirali 4 ure pri 35 °C. V primeru da je po inkubacijskem času nastal strdek, smo označili, da je testirani sev koagulaza pozitiven. Če po 4 ur test ni bil pozitiven, smo podaljšali inkubacijo do 24 ur. Za negativno reakcijo smo označili epruvete v katerih ni nastal strdek po ustreznih inkubacijah. Pri vsakem testiranju koagulaze smo testirali še pozitivno (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) in negativno kontrolo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990).

3.2.3.3 Oksidacija manitola

Za test oksidacije manitola smo v gojišče OF manitol dodali eno cepilno zanko 24-urne čiste bakterijske kulture in inkubirali 24 ur pri 35 °C. Za pozitiven rezultat je pomenila porumenitev agarja, pri negativnem rezultatu pa ni prišlo do spremembe barve gojišča. Pozitivno kontrolo smo naredili s sevom *S. aureus* ATCC 29213, za negativno kontrolo pa smo uporabili *S. haemolyticus*.

3.2.3.4 BBL Crystal GP ID

BBL Crystal GP ID (Becton Dickinson, Sparks, ZDA) je komercialni sistem za identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. S sterilnim brisom

smo pripravili homogeno suspenzijo testiranega seva z gostoto 0,5 McF. Pripravljeno suspenzijo smo vlili v vdolbinice testnega sistema in nanj položili pokrovček s testi. S pokrovom obrnjenim navzdol smo inkubirali 24 ur pri 35 °C. Rezultate smo odčitali pod UV svetlobo in s pomočjo barvne kartice z barvnimi reakcijami za pozitivne in negativne rezultate. Pozitivne vrstice so različno točkovane (4, 2, 1 točka). Vdolbini, v kateri je negativen rezultat, smo pripisali nič točk. 10-mestno kodo izolata smo dobili s seštevanjem točk v stolpcih. Ob vsaki novi serijski številki komercialnega testa testiramo tudi kontrolne vzorce.

3.2.4 Selektivna in diferencialna gojišča za MRSA

3.2.4.1 Selektivno in diferencialno gojišče MRSA-ID

Vse nadzorne kužnine smo najprej nacepili na selektivno in diferencialno gojišče MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Po 24 in 48 ur inkubacije pri 35 °C smo odčitali rast in barvo kolonij. Značilna zelena barva kolonij in tanek zelen kolobar okoli kolonij sta nakazovala, da je testirani izolat MRSA. Domnevo smo potrdil z izvedbo standardnih identifikacijskih testov za MRSA. Svetlo zelene, temno zelene in bele kolonije pomenijo, da testirani izolat ni MRSA.

3.2.4.2 Selektivno in diferencialno gojišče ORSAB

Nadzorne kužnine smo s cepilno zanko nacepili tudi na selektivno in diferencialno gojišče ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Po 24 in 48-urni inkubaciji pri 35 °C smo odčitali rast in barvo kolonij. Značilno temno modre kolonije in temno modro obarvan agar v okolici kolonij sta nakazovala, da je testirani izolat MRSA. To smo potrdili z izvedbo standardnih identifikacijskih testov za MRSA. Svetlo modre, bele in rumene kolonije pomenijo, da testirani izolat ni MRSA.

3.2.5 Testi za ugotavljanje odpornosti proti oksacilinu

3.2.5.1 Disk difuzijska metoda z 1- μ g diskom oksacilina

Pri izvajanju testa smo upoštevali priporočila CLSI. Iz čiste 24 ur stare kulture na krvnem agarju smo v ampuli z 2 mL 0,85 % raztopine NaCl z nefelometrom pripravili bakterijsko suspenzijo z gostoto 0,5 McF. S pomočjo rotorja (AES Laboratorie, Combourg, Francija) in sterilnega brisa smo pripravljeno suspenzijo konfluentno nanесли na MHA (Mueller Hinton

agar) in položili 1- μ g oksacilinski disk (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Nemčija). Po 24-urni inkubaciji pri

35 °C smo izmerili premer inhibicijske cone in s pomočjo kriterijev CLSI interpretirali rezultat.

Oksacilin S (občutljiv) $\geq 12,5$ mm

Oksacilin I (zmerno občutljiv) do 12,5 mm

Oksacilin R (odporen) $\leq 10,5$ mm

3.2.5.2 Oksacilin presejalna plošča s koncentracijo 6 μ g/mL oksacilina

Oksacilin presajalna plošča je agar dilucijska metoda, s katero ugotavljamo občutljivost stafilokokov za oksacilin. Iz čiste 24 ur stare sumljive kulture na krvnem agarju smo pripravili suspenzijo z gostoto 0,5 McF in jo točkovno inokulirali (10 μ L) na gojišče. Po 24-urni inkubaciji na gojišču zrastejo sevi, ki so odporni proti oksacilin. Vsako oksacilin presajalno ploščo smo sočasno inokulirali tudi s pozitivno (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300) in negativno kontrolo (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213). V primeru da je na gojišču zrastle ena ali več kolonij, smo interpretirali, da je testni izolat odporen proti oksacilinu. Izolati, ki na gojišču niso zrastle, so bili občutljivi za oksacilin.

3.2.6 Definicije in podatki analiz

- Pri izračunu občutljivosti in specifičnosti testa smo predpostavili, da so rezultati, ki smo jih dobili po obogatitvi na MRSA-ID gojišču, v skladu z dejanskim MRSA statusom bolnika (pozitivna kontrola). Kot *resnično pozitivne rezultate* smo upoštevali seve, ki so po 24-urni oz. 48-urni inkubaciji tvorili tipične MRSA kolonije na ORSAB oziroma na gojišču MRSA-ID. Kot *lažno negativne rezultate na gojišču ORSAB* smo definirali tiste seve, ki smo jih na MRSA-ID po obogatitvi prepoznali kot MRSA pozitivne in na gojišču ORSAB jih nismo zaznali kot tipične modre kolonije (npr. bele, rumene, svetlo modre kolonije). V primeru ko smo zasledili tipične modre kolonije na ORSAB in netipične zelene kolonije (sluzaste, temno zelene kolonije) na MRSA-ID, smo definirali kot *lažno negativne rezultate na MRSA-ID*. Vsem preštetim lažno negativnim rezultatom smo odšteli število sevov MRSA, ki smo jih identificirali šele po predhodni obogatitvi. Kolonije, ki so na gojišču ORSAB zrasle v netipični modri barvi (različni odtenki modre barve), predstavljajo *lažno pozitivne rezultate na gojišču ORSAB*. Prav tako predstavljajo

lažno pozitivne rezultate na gojišču MRSA-ID sevi z netipičnimi zelenimi kolonijami (svetlo sluzaste, temno zelene kolonije). Lažno pozitivne rezultate smo v nalogi identificirali s kombinacijo katalazne in koagulazne reakcije, z občutljivostjo za oksacilin in s testom BBL Crystal GP ID (Veerle in sod., 2007). Za resnično negativne rezultate smo označili seve, ki na posameznem gojišču po 24-urni oz. 48-urni inkubaciji niso tvorili tipičnih MRSA kolonij (tako MRSA pozitivni kot MRSA negativni vzorci). Občutljivost in specifičnost smo izračunali po sledečih formulah (Gordis, 2004).

$$\text{Občutljivost} = \frac{\text{št. resnično pozitivnih}}{\text{št. resnično pozitivnih} + \text{št. lažno negativnih}} \times 100 \quad \dots (1)$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{št. resnično negativnih}}{\text{št. resnično negativnih} + \text{št. lažno pozitivnih}} \times 100 \quad \dots (2)$$

- Napovedna vrednost testa nam pokaže verjetnost, s katero bo test pravilno določil prisotnost ali odsotnost okužbe oz. kolonizacije z MRSA. *Pozitivna napovedna vrednost* je razmerje med številom resnično pozitivnih z vsoto resnično pozitivnih in številom lažno pozitivnih. *Negativna napovedna vrednost* pa je razmerje med resnično negativnimi z vsoto resnično negativnih in lažno negativnih rezultatov (Gordis, 2004).
- Pri interpretaciji lažno pozitivnih kolonij smo si pomagali z naslednjimi predpostavkami. Izolati, ki so na krvnem agarju zrastle v obliki belih kolonij z β hemolizo, imeli pozitiven DNazni test in bili občutljivi za oksacilin, smo uvrstili med MSSA izolate. Med KNS izolate smo uvrstili vse, ki so imeli na krvnem agarju značilne bele kolonije za KNS in negativen DNazni test. Med ostale izolate smo uvrstili vse vzorce, ki so se po morfoloških značilnostih na krvnem agarju, ORSAB in MRSA-ID gojišču, ločili od KNS in MSSA sevov. Dodatnih identifikacijskih testov za te izolate nismo izvedli.

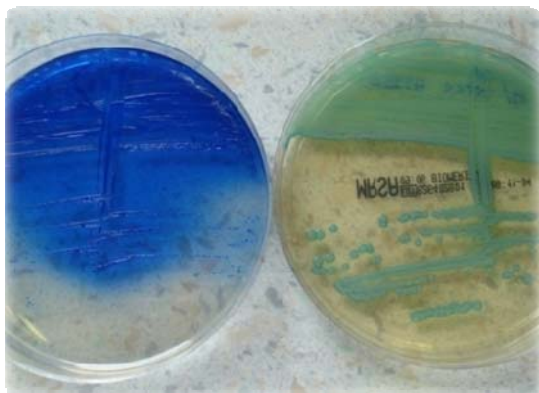
4. REZULTATI

4.1 RAST STANDARDNIH BAKTERIJSKIH SEVOV NA MRSA-ID IN ORSAB GOJIŠČU

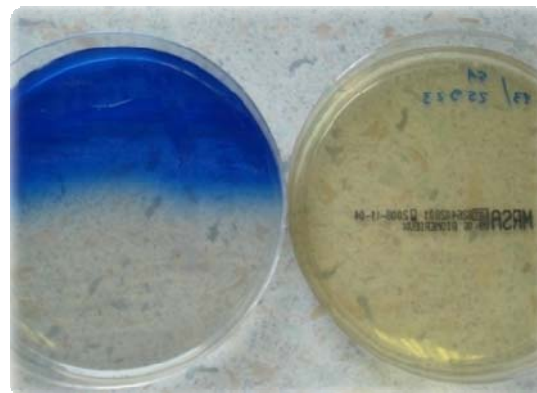
Pred pričetkom uporabe novega gojišča je pomembno, da ga testiramo na določene ATCC seve. Ti sevi so točno določeni in jih izdelovalec gojišč navaja v certifikatu. Tako smo v naši nalogi najprej testirali podane ATCC seve in ugotovili njihovo rast in morfološki izgled na MRSA-ID in ORSAB gojišču. Značilnosti rasti standardnih sevov na MRSA-ID in ORSAB gojišču so prikazani v Preglednici 1 in na Slikah 4-11. Glede na rezultate analiz kontrolnih sevov smo primerjali rast in barvo kolonij naših kliničnih izolatov.

Preglednica 1: Rast standardnih bakterijskih sevov na ORSAB in MRSA-ID gojišču

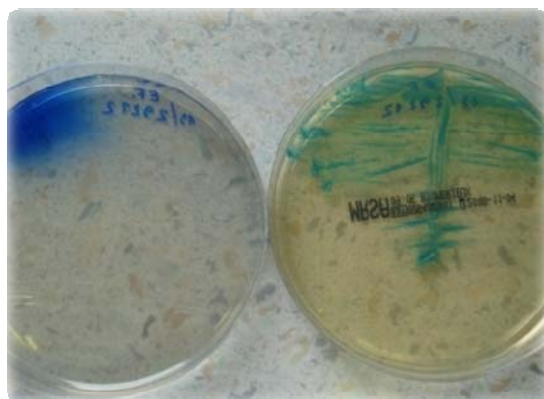
Sev	ORSAB	MRSA-ID
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	temno modre kolonije z modro obarvano okolico okoli kolonij	zelene kolonije s tankim zelenim kolobarjem okrog kolonij
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (MSSA)	netipične modre kolonije za MRSA	ni rasti
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ni rasti	zelena plast
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ni rasti	ni rasti
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 (MSSE)	bela plast	ni rasti
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 51625 (MRSE)	bela plast	bela plast



Slika 4: *Staphylococcus aureus* sev (ATCC 43300) odporen proti meticilinu na ORSAB in MRSA-ID gojišču



Slika 5: *Staphylococcus aureus* sev (ATCC 25923) občutljiv za meticilin na ORSAB in MRSA-ID gojišču



Slika 6: *Enterococcus faecalis* sev ATCC 29212 na ORSAB in MRSA-ID gojišču



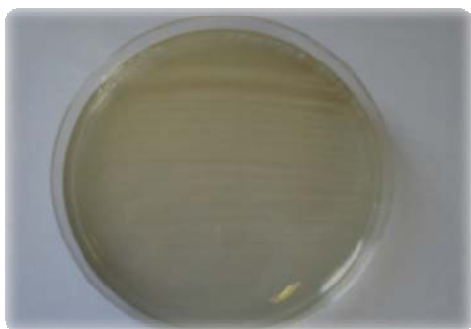
Slika 7: *Escherichia coli* sev ATCC 25922 na ORSAB in MRSA-ID gojišču



Slika 8: *Staphylococcus epidermidis* sev (ATCC 14990) občutljiv za meticilin na gojišču ORSAB



Slika 9: *Staphylococcus epidermidis* sev (ATCC 14990) občutljiv za meticilin na gojišču MRSA-ID



Slika 10: *Staphylococcus epidermidis* sev (ATCC 51625) odporen proti meticilinu na gojišču ORSAB



Slika 11: *Staphylococcus epidermidis* sev (ATCC 51625) odporen proti meticilinu na gojišču MRSA-ID

4.2 REZULTATI TESTIRANJA KLINIČNIH VZORCEV Z NEPOSREDNO NACEPITVIJO NADZORNIH BRISOV NA GOJIŠČA IN PO PREDHODNEM SUSPENDIRANJU NADZORNIH BRISOV V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI

4.2.1 Neposredna nacepitev nadzornih brisov na gojišča

Pri neposrednem načinu kultivacije smo analizirali 200 nadzornih kužnin (100 MRSA pozitivnih in 100 MRSA negativnih vzorcev). Od 137 izoliranih sevov *S. aureus* je bilo identificiranih 100 izolatov MRSA in 37 izolatov MSSA. Na preiskavo na MRSA smo testirali 74 brisov nosu, 70 brisov kožnih gub in 56 brisov žrel. Iz brisov nosu smo izolirali 37 izolatov MRSA, 35 iz brisov kožnih gub in 28 izolatov MRSA iz brisov žrel.

Pri vsakem MRSA pozitivnem vzorcu smo prešteli število pozitivnih kolonij in okvirno ocenili količino MRSA v vzorcu. Dobili smo 14 pozitivnih vzorcev pri katerih smo izolirali na gojišču manj kot 10 kolonij. Pri kar 63 vzorcih smo izolirali *Staphylococcus aureus* – MRSA, ki je na gojišču predstavljal večji del vseh poraslih kolonij. Iz 23 vzorcev je porastel MRSA samo po obogatitvi.

Primerjava detekcije MRSA izolatov na ORSAB in MRSA-ID gojišču je bil glavni cilj naše raziskave. Tako na ORSAB kot na MRSA-ID gojišču smo izolirali 89 MRSA sevov, 2 samo na ORSAB in 9 samo na MRSA-ID gojišču. Na gojišču ORSAB smo od 100 MRSA pozitivnih sevov osamili le 91 (91,0 %). Kar pomeni, da 9 MRSA sevov ORSAB gojišče ni prepoznalo. Z novim kromogenim gojiščem MRSA-ID smo dobili le dva lažno negativna rezultata, torej smo zasledili 98,0 % MRSA vzorcev.

Preglednica 2: Število (oziroma delež) izolatov bakterije *S. aureus* odpornih proti metilicinu (n = 100) z neposredno nacepivitvijo nadzornih brisov po različni inkubaciji na ORSAB in MRSA-ID gojišču

Gojišče	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24-urni inkubaciji brez obogatitve	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 48-urni inkubaciji brez obogatitve	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24-urni inkubaciji z obogatitvijo	Skupno število (delež) vseh MRSA pozitivnih vzorcev
ORSAB	24 (24,0)	33 (33,0)	34 (34,0)	91 (91,0)
MRSA-ID	27 (27,0)	41 (41,0)	30 (30,0)	98 (98,0)

Število oz. deleži MRSA pozitivnih vzorcev po 48-urni inkubaciji in po obogatitvi so v Preglednici 2 prikazani brez upoštevanja že predhodno izoliranih MRSA pozitivnih vzorcev. Tako po 24 kot po 48-urni inkubaciji brez 24 urne predhodne obogatitve smo z gojiščem MRSA-ID identificirali več MRSA pozitivnih vzorcev kot z gojiščem ORSAB. Po 48-urni inkubaciji na gojišču MRSA-ID smo dodatno izolirali še 41,0 % izolatov MRSA, na gojišču ORSAB pa le 33,0 %. Po 24-urni inkubaciji v obogatitvenem gojišču THBS smo na gojišču ORSAB dodatno izolirali še 34,0 % novih izolatov MRSA. Delež na novo odkritih pozitivnih vzorcev se je na novem kromogenem MRSA-ID gojišču zmanjšal. Iz Preglednice 2 razberemo, da znaša le 30,0 %. Za 16 nadzornih kužnin smo imeli podatek za gojišča, ki smo jih nacepili po obogatitvi in jih inkubirali 24 in 48 ur. Po 48 urah smo na gojišču MRSA-ID dokazali še en pozitiven izolat več kot po 24 urah. Najverjetneje je do tega prišlo zaradi

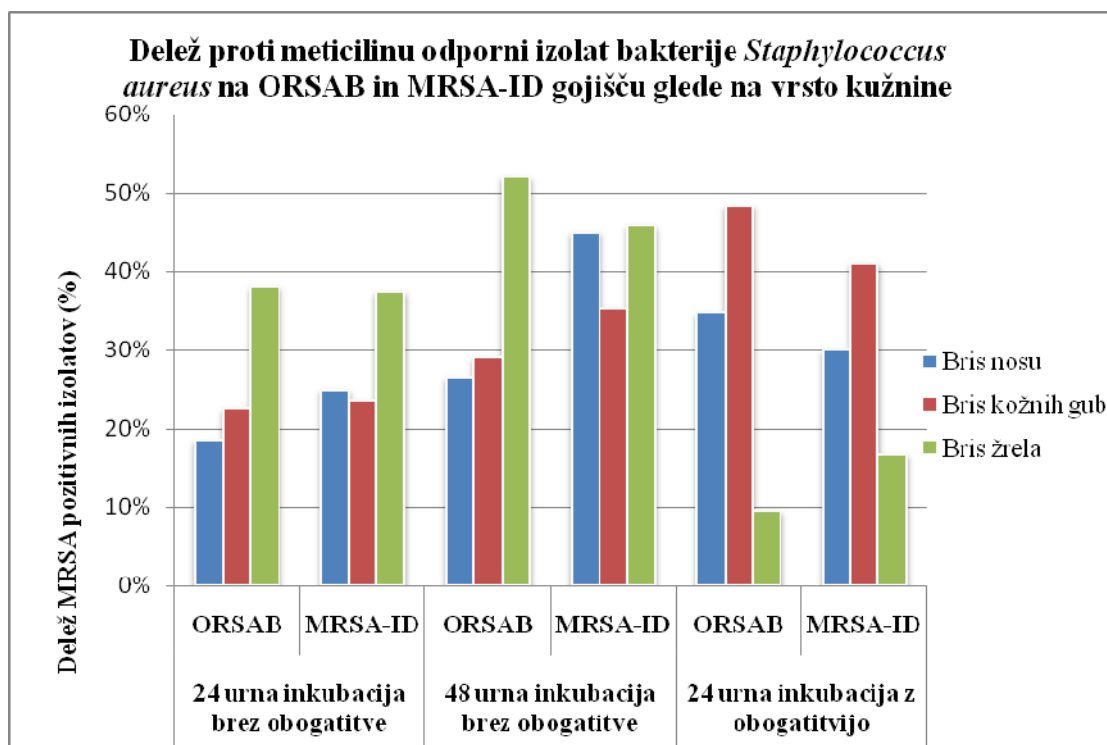
neopredeljene kolonije zrasle na MRSA-ID po 24-urni obogatitvi, ki smo jo označili za negativno, po dodatnem 24-urnem inkubiranju smo pa kolonijo označili za MRSA pozitivno.

4.2.1.1 Rezultati neposredne nacepitve nadzornih brisov glede na vrsto kužnine

V Preglednici 3 smo predstavili rezultate MRSA pozitivnih vzorcev za posamezne nadzorne kužnine. Največ 40 izolatov MRSA smo izolirali na novem kromogenem MRSA-ID gojišču iz brisov nosu. Na gojišču ORSAB smo v primerjavi z MRSA-ID gojiščem iz brisov nosu izolirali en izolat manj, iz brisov kožnih gub in žrela pa 3 MRSA izolate manj. Rezultati kultivacije na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine so grafično prikazani na Sliki 12.

Preglednica 3: Število (delež) izolatov bakterije *S. aureus* odpornih proti meticilinu na ORSAB in MRSA-ID za posamezne nadzorne brise (n = 100)

	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24 urah brez obogatitve	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 48 urah brez obogatitve	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24 urni obogatitvi	Skupno št. vseh MRSA pozitivnih vzorcev
ORSAB				
Bris nosu	9 (18,4)	13 (26,5)	17 (34,7)	39
Bris kožnih gub	7 (22,5)	9 (29,0)	15 (48,4)	31
Bris žrela	8 (38,1)	11 (52,0)	2(9,5)	21
MRSA-ID				
Bris nosu	10 (25,0)	18 (45,0)	12 (30,0)	40
Bris kožnih gub	8 (23,5)	12 (35,3)	14 (41,0)	34
Bris žrela	9 (37,5)	11 (45,8)	4 (16,7)	24



Slika 12: Delež proti metilicinu odporni izolat bakterije *Staphylococcus aureus* na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine po neposredni nacepiti in z različnim načinom inkubacije

4.2.1.2 Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost za neposredno nacepiti nadzornih brisov

Občutljivost po 24-urni inkubaciji brez obogatitve za ORSAB smo dobili 36,4 % in 42,2 % za gojišče MRSA-ID. Občutljivost se je po 48-urni inkubaciji zvišala tako za ORSAB kot za MRSA-ID (86,4 in 97,1 %). Največ lažno negativnih rezultatov (kar 21,0 %) smo dobili na gojišču ORSAB po 24-urni inkubaciji brez obogatitve in le 4,5 % na gojišču MRSA-ID po 48-urni inkubaciji prav tako brez obogatitve. Od vseh lažno negativnih rezultatov, ki smo jih dobili na gojišču ORSAB, je en sev MRSA tvoril rumene kolonije. Kar 11 sevov je bilo takšnih, ki so na gojišču ORSAB zrasli v obliki belih kolonij, na kromogenem ID gojišču pa v tipični zeleni barvi značilni za MRSA.

Z obema gojiščema smo dobili specifičnost nad 91 %. Specifičnost po 24-urni inkubaciji brez obogatitve za gojišče MRSA-ID smo dobili 98,9 %, po 48-urni inkubaciji pa 98,5 %. V obeh časovnih intervalih inkubacije smo zasledili dve lažno pozitivni kulturi. Po 24 urah brez

obogatitve smo na gojišču ORSAB zasledili 5 lažno pozitivnih kultur oz. 13 lažno pozitivnih kultur po 48-urni inkubaciji. Posledično je v tem primeru nižja specifičnost (97,2 oz. 91,5 %). Izračunane vrednosti za število resnično pozitivnih, resnično negativnih, lažno negativnih, lažno pozitivnih, delež občutljivosti in specifičnosti ter delež pozitivne oz. negativne napovedne vrednosti za neposredno nacepitvijo nadzornih brisov so prikazane v Preglednici 4.

Preglednica 4: Število resnično pozitivnih, lažno negativnih, lažno pozitivnih, resnično negativnih, delež občutljivosti in specifičnosti ter delež pozitivne oz. negativne napovedne vrednosti za neposredno nacepitvijo nadzornih brisov za ORSAB in MRSA-ID gojišče po 24 oz. 48-urni inkubaciji brez obogatitve (n = 100)

	Čas	ORSAB	MRSA-ID
Št. (delež) resnično pozitivno	24 ur	24 (12,0)	27 (13,5)
	48 ur	57 (28,5)	68 (34,0)
Št. (delež) lažno negativno	24 ur	42 (21,0)	37 (18,5)
	48 ur	9 (4,5)	2 (1,0)
Št. (delež) lažno pozitivno	24 ur	5 (2,5)	2 (1,0)
	48 ur	13 (6,5)	2 (1,0)
Št. (delež) resnično negativno	24 ur	176 (88,0)	173 (86,5)
	48 ur	140 (70,0)	132 (66,0)
Občutljivost (%)	24 ur	36,4	42,2
	48 ur	86,4	97,1
Specifičnost (%)	24 ur	97,2	98,9
	48 ur	91,5	98,5
Pozitivna napovedna vrednost (%)	24 ur	82,7	93,1
	48 ur	80,9	97,1
Negativna napovedna vrednost (%)	24 ur	80,7	82,4
	48 ur	59,1	50,0

Število lažno pozitivnih rezultatov, ki smo jih dokazali na ORSAB in na kromogenem MRSA-ID gojišču so prikazani v Preglednici 5. Lažno pozitivne rezultate smo ločili na *Staphylococcus aureus* občutljivega za metilicilin (MSSA), koagulaza negativne stafilokoke (KNS) in na ostale izolate, ki smo jih opisali v poglavju 4.3. Že na prvi pogled opazimo, da smo dobili v primerjavi s kromogenim gojiščem MRSA-ID, bistveno več lažno pozitivnih rezultatov na ORSAB gojišču.

Preglednica 5: Število lažno pozitivnih rezultatov na ORSAB in kromogenem MRSA-ID gojišču za neposredno nacepivijo nadzornih brisov (n = 100)

Izolat	Gojišče	Izgled kolonij	Št. izoliranih rodov
<i>Staphylococcus aureus</i> občutljiv za meticilin	ORSAB	netipične modre kolonije	10
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	3
Koagulaza negativni stafilokoki	ORSAB	netipične modre kolonije	12
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	2
Ostali izolati	ORSAB	netipične modre kolonije	3
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	1
Skupno št. vseh bakterij			31

4.2.2 Nacepitev po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini

V drugem delu diplomske naloge smo analizirali 125 brisov od 64 predhodno dekoloniziranih pacientov, ki so bili v preteklih štirinajstih dneh okuženi oz. kolonizirani z MRSA. Vzorce smo zbirali od 8. avgusta do 13. oktobra 2008. Iz 125 brisov smo izolirali 50 sevov MRSA in iz 75 vzorcev nismo izolirali MRSA. Na preiskavo na MRSA po predhodnem suspendiranju smo testirali 43 brisov nosu, 46 brisov kožnih gub in 36 brisov žrel. Iz brisov nosu smo izolirali 16 sevov MRSA, 19 iz kožnih gub in 15 sevov MRSA iz brisov žrel.

V primerjavi z neposredno nacepivijo smo po predhodnem suspendiranju brisov dokazali več gojišč na katerih je poraslo več kot 10 MRSA pozitivnih kolonij. S pomočjo obogatitve smo izolirali 9 sevov MRSA.

Na gojišču ORSAB smo od 50 MRSA pozitivnih vzorcev izolirali 46. Torej smo z ORSAB gojiščem dobili 4 lažno negativne rezultate. Z novim kromogenim gojiščem MRSA-ID nismo zasledili nobenega lažno negativnega rezultata. Izolirali smo vseh 50 MRSA izolatov. V Preglednici 6 so podani rezultati MRSA pozitivnih vzorcev po različni inkubaciji na ORSAB in MRSA-ID gojišču.

Preglednica 6: Število (oziroma delež) izolatov bakterije *S. aureus* odpornih proti metilicinu (n = 50) z nacepivijo nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini in po različni inkubaciji na ORSAB in MRSA-ID gojišču

Gojišče	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24-urni inkubaciji brez obogatitve	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 48-urni inkubaciji brez obogatitve	Število (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24-urni inkubaciji z obogatitvijo	Skupno število (delež) vseh MRSA pozitivnih vzorcev
ORSAB	9 (18,0)	25 (50,0)	12 (24,0)	46 (92,0)
MRSA-ID	16 (32,0)	22 (44,0)	12 (24,0)	50 (100,0)

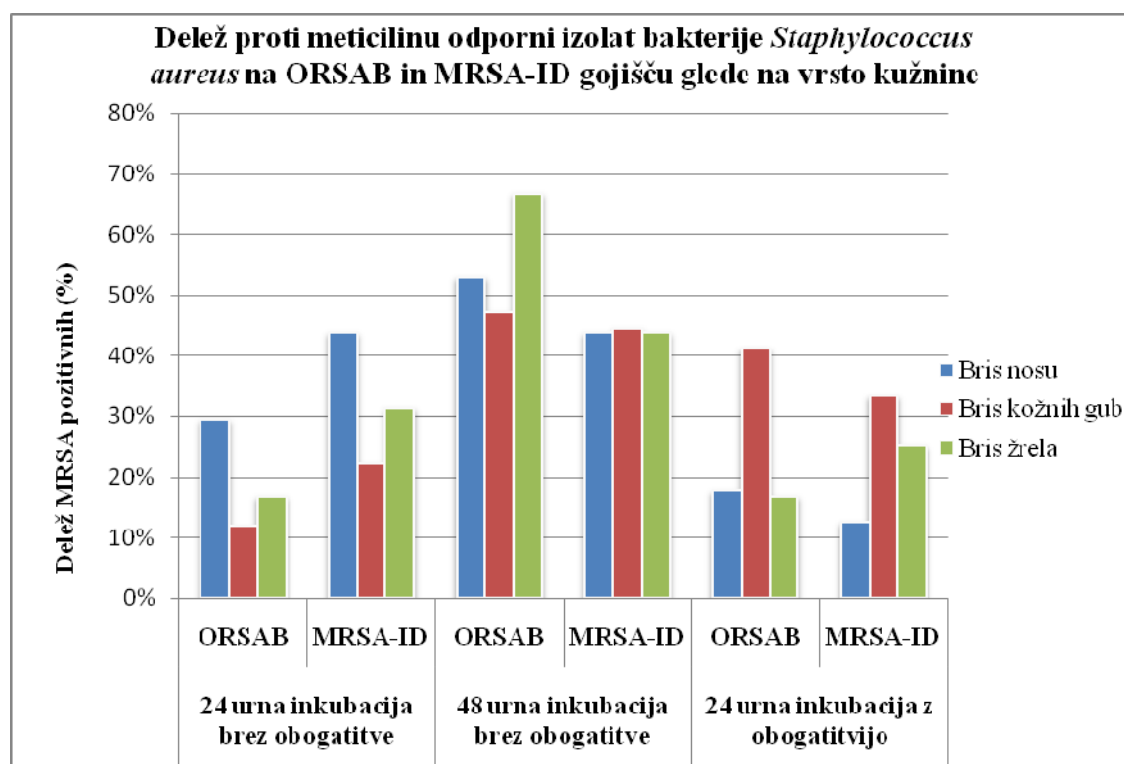
S predhodnim suspendiranjem nadzornih kužnin v fiziološki raztopini smo po 24-urni inkubaciji brez predhodne 24 urne obogatitve izolirali 7 pozitivnih vzorcev več na MRSA-ID kakor na gojišču ORSAB. V primerjavi z neposrednim načinom kultivacije smo dobili s kultivacijo brisov po predhodnem suspendiranju večjo razliko med gojiščema (predvsem po 24-urni inkubaciji). Po 24-urni inkubaciji brez obogatitve smo izolirali 18,0 % pozitivnih izolatov na ORSAB in 32,0 % izolatov MRSA na kromogenem gojišču ID. Po 48-urni inkubaciji brez obogatitve smo identificirali še 50,0 % izolatov MRSA na ORSAB in 44,0 % pozitivnih izolatov na gojišču MRSA-ID. S pomočjo obogatitve na gojišču THBS smo izolirali tako na ORSAB kot na MRSA-ID gojišču še 24,0 % pozitivnih vzorcev.

4.2.2.1 Rezultati nacepitve po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini glede na vrsto kužnine

Največ 18 MRSA pozitivnih vzorcev smo dobili z brisi kožnih gub na gojišču MRSA-ID. Iz brisov nosu smo na gojišču ORSAB izolirali 17, na MRSA-ID pa 16 MRSA pozitivnih vzorcev. Na gojišču ORSAB smo v primerjavi z MRSA-ID gojiščem iz brisov nosu izolirali en izolat več. Največjo razliko smo dobili pri brisih žrel, kjer smo z gojiščem MRSA-ID izolirali 4 izolate MRSA več kot z ORSAB. Rezultati so podani v Preglednici 7. Grafični prikaz deleža MRSA pozitivnih vzorcev na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine prikazuje Slika 13.

Preglednica 7: Število (delež) pozitivnih vzorcev na ORSAB in MRSA-ID gojišču (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini

	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24 urah brez obogatitve	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev le po 48 urah brez obogatitve	Št. (delež) MRSA pozitivnih vzorcev po 24 urah z obogatitvijo	Skupno št. vseh MRSA pozitivnih vzorcev
ORSAB				
Bris nosu	5 (29,4)	9 (52,9)	3 (17,6)	17
Bris kožnih gub	2 (11,8)	8 (47,1)	7 (41,2)	17
Bris žrela	2 (16,7)	8 (66,7)	2 (16,7)	12
MRSA-ID				
Bris nosu	7 (43,8)	7 (43,8)	2 (12,5)	16
Bris kožnih gub	4 (22,2)	8 (44,4)	6 (33,3)	18
Bris žrela	5 (31,3)	7 (43,8)	4 (25,0)	16



Slika 13: Delež proti meticilinu odporni izolat bakterije *Staphylococcus aureus* na ORSAB in MRSA-ID gojišču glede na vrsto nadzorne kužnine po predhodnem suspendiranju in z različnim načinom inkubacije

4.2.2.2 Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost za nacepitev po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini

Občutljivost smo po 24-urni inkubaciji brez obogatitve za ORSAB dobili 23,7 %, za MRSA-ID pa 42,1 %. Občutljivost se je po 48-urni inkubaciji zvišala tako za ORSAB kot za MRSA-ID (89,5 in 100,0 %). Kot pri neposredni nacepiti kultivacije smo največ lažno negativnih rezultatov (29) dobili na ORSAB gojišču po 24-urni inkubaciji in nobenega na MRSA-ID gojišču po 48-urni inkubaciji. Od vseh lažno negativnih rezultatov, ki smo jih dobili na gojišču ORSAB, so bili trije sevi takšni, ki so na ORSAB zrasli v obliki belih kolonij, na kromogenem ID gojišču pa v tipični zeleni barvi značilni za MRSA.

Po 24-urni inkubaciji smo z MRSA-ID dobili specifičnost 99,1 %, po 48-urni inkubaciji pa 96,7 %. Po 24-urni inkubaciji smo izolirali en lažno pozitiven rezultat, po 48 urah pa tri. Dve oz. sedem lažno pozitivnih kultur smo izolirali na gojišču ORSAB po 24 oz. 48-urni inkubaciji. Zato smo dobili nižjo specifičnost (98,3 oz. 94,3 %). Ti rezultati so prikazani v Preglednici 8.

Preglednica 8: Primerjava števila resnično pozitivnih, lažno negativnih, lažno pozitivnih, resnično negativnih, delež občutljivosti in specifičnosti ter delež pozitivne oz. negativne napovedne vrednosti za kultivacijo na ORSAB in MRSA-ID gojišču po 24 oz. 48 urni inkubaciji (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini

	Čas	ORSAB	MRSA-ID
Št. (delež) resnično pozitivno	24 ur	9 (7,2)	16 (12,8)
	48 ur	34 (27,2)	38 (30,4)
Št. (delež) lažno negativno	24 ur	29 (23,2)	22 (17,6)
	48 ur	4 (3,2)	0 (0,0)
Št. (delež) lažno pozitivno	24 ur	2 (1,6)	1 (0,8)
	48 ur	7 (5,6)	3 (2,4)
Št. (delež) resnično negativno	24 ur	116 (92,8)	109 (87,2)
	48 ur	91 (72,8)	87 (69,6)
Občutljivost (%)	24 ur	23,7	42,1
	48 ur	89,5	100,0
Specifičnost (%)	24 ur	98,3	99,1
	48 ur	94,3	96,7
Pozitivna napovedna vrednost (%)	24 ur	81,8	94,1
	48 ur	82,9	92,7
Negativna napovedna vrednost (%)	24 ur	80,0	83,2
	48 ur	95,8	100,0

V Preglednici 9 smo podali število lažno pozitivnih rezultatov, ki smo jih dokazali z ORSAB in z MRSA-ID gojiščem. Kot pri neposredni nacepitvi nadzornih brisov smo tudi po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov dobili največ lažno pozitivnih rezultatov na ORSAB gojišču. Ostali izolati so opisani v poglavju 4.3

Preglednica 9: Število lažno pozitivnih izolatov na ORSAB in kromogenem MRSA-ID gojišču (n = 50) po predhodnem suspendiranju nadzornih brisov v fiziološki raztopini

Izolat	Gojišče	Izgled kolonij	Št. izoliranih rodov
<i>Staphylococcus aureus</i> občutljiv za meticilin	ORSAB	netipične modre kolonije	4
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	3
Koagulaza negativni stafilokoki	ORSAB	netipične modre kolonije	1
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	0
Ostali izolati	ORSAB	netipične modre kolonije	3
	MRSA-ID	netipične zelene kolonije	0
Skupno št. vseh bakterij			11

4.2.3 Primerjava obeh gojišč z neposredno nacepitvijo nadzornih brisov in po nacepiti nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini

Iz Preglednice 10 razberemo, da smo dobili največji delež lažno negativnih rezultatov (23,2 %) na gojišču ORSAB po 24-urni inkubaciji brez obogatitve in z inokulacijo kužnin s predhodnim suspendiranjem v sterilni fiziološki raztopini. Nobenega lažno negativnega rezultata nismo dobili po 48-urni inkubaciji na MRSA-ID. Največji delež lažno pozitivnih rezultatov (6,5 %) smo dobili z neposredno kultivacijo po 48-urni inkubaciji na ORSAB gojišču. Najmanjši delež lažno pozitivnih rezultatov (2,4 %) smo prav tako dobili po 48-urni inkubaciji, vendar na novem kromogenem MRSA-ID gojišču.

Preglednica 10: Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih vzorcev na ORSAB in MRSA-ID gojišču za neposredno nacepitev in za nacepitev vzorcev po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini

	Lažno negativni rezultati (%)		Lažno pozitivni rezultati (%)	
	po 24 ur	po 48 ur	po 24 ur	po 48 ur
1. Neposredna nacepitev				
ORSAB	21,0	4,5	2,5	6,5
MRSA-ID	18,5	1,0	1,0	1,0
2. Nacepitev po predhodnem homogeniziranju v fiziološki raztopini				
ORSAB	23,2	3,2	1,6	5,6
MRSA-ID	17,6	0,0	0,8	2,4

Z nacepitvijo nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini smo dobili na MRSA-ID gojišču po 48-urni inkubaciji najboljšo občutljivost testa (100,0 %). Kot po pričakovanjih smo z neposredno kultivacijo na ORSAB gojišču po 24-urni inkubaciji brez obogatitve dobili najmanjšo občutljivost (36,4 %). Rezultati občutljivosti in specifičnosti ORSAB in MRSA-ID gojišča z obema metodama kultivacije so prikazani v Preglednici 11.

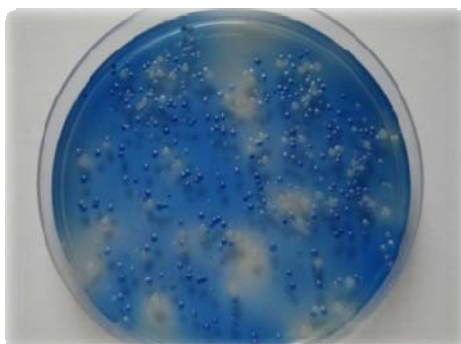
Preglednica 11: Občutljivost in specifičnost ORSAB in MRSA-ID gojišča za neposredno nacepitev in za nacepitev po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini

	Občutljivost (%)		Specifičnost (%)	
	po 24 ur	po 48 ur	po 24 ur	po 48 ur
1. Neposredna nacepitev				
ORSAB	36,4	86,4	97,2	91,5
MRSA-ID	42,2	97,1	98,9	98,5
2. Nacepitev po predhodnem homogeniziranju v fiziološki raztopini				
ORSAB	23,7	89,5	98,3	94,3
MRSA-ID	42,1	100,0	99,1	96,7

4.3 LAŽNO POZITIVNE KOLONIJE Z NEPOSREDNO NACEPITVIJO IN PO NACEPITVI NADZORNIH BRISOV PO PREDHODNEM SUSPENDIRANJU V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI

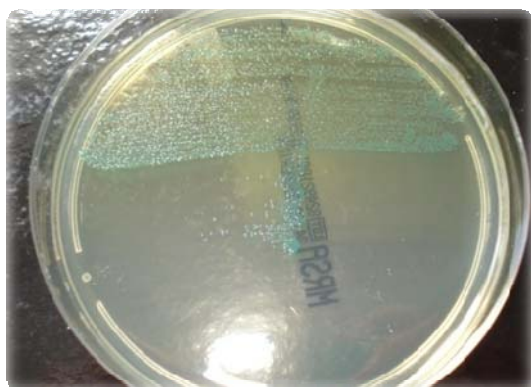
Pri izvedbi raziskave smo bili pozorni tudi na lažno pozitivne kolonije na ORSAB in MRSA-ID gojišču. Tako lažno zelene kolonije na MRSA-ID kot lažno modre kolonije na ORSAB gojišču lahko ob natančnem in pozornem opazovanju opazimo, da so morfološko drugačne od kolonij MRSA.

Na gojišču ORSAB smo kot lažno pozitivne kolonije najpogosteje izolirali *Staphylococcus aureus* občutljivega na metilinu (netipične modre kolonije), *Staphylococcus capitis* (svetlo modre kolonije) in *Staphylococcus cohnii* (netipične modre kolonije). Predvsem pri brisih kožnih gub smo na omenjenem gojišču zasledili modre kolonije, ki predstavljajo *Staphylococcus haemolyticus*. Netipične modre oz. svetlo modre kolonije so prikazane na Sliki 14.



Slika 14: Netipične modre kolonije na gojišču ORSAB

Kot lažno pozitivne kolonije izolirane na gojišču MRSA-ID smo dobili: *Globicatella sanguis* (svetle zelene sluzaste kolonije na Sliki 15), *Enterococcus faecalis* (rast v značilni zeleni plasti na Sliki 16), *Micrococcus sedentarius* (konveksno dvignjene kolonije na Sliki 17) in *Staphylococcus vitulus* (temno zelene kolonije na Sliki 18).



Slika 15: *Globicatella sanguis*



Slika 16: *Enterococcus faecalis*



Slika 17: *Micrococcus sedentarius*



Slika 18: *Staphylococcus vitulus*

4.4 OSTALI MIKROORGANIZMI, KI SMO JIH ZASLEDILI PRI IDENTIFIKACIJI IZOLATOV MRSA

Po neposredni nacepitvi nadzornih kužnin smo pri 100 MRSA negativnih vzorcih izolirali predvsem KNS (pri 58 vzorcih), pri 33 vzorcih alfa hemolitične streptokoke in 27 brisov kužnin je vsebovalo enterokoke. Na gojiščih s pozitivnimi vzorci smo poleg MRSA izolirali še pri 26 vzorcih KNS, pri 22 vzorcih MSSA in pri 21 vzorcih enterokoke. S predhodnjim suspendiranjem nadzornih brisov v fiziološki raztopini smo pri MRSA negativnih vzorcih izolirali pri 35 vzorcih KNS, pri 13 vzorcih MSSA in pri 10 kužninah alfa hemolitične streptokoke. Pri MRSA pozitivnih vzorcih pa smo izolirali še pri 17 vzorcih KNS, pri 10 kužninah enterobakterije ter pri 9 vzorcih MSSA in enterokoke. Na tem mestu bi rada poudarila, da smo mikroorganizme uvrstili v skupine le glede morfološkega izgleda kolonij na gojiščih (KA, ORSAB, MRSA-ID) in nismo izvajali nadaljnjih identifikacijskih testov, ker nam ni bilo potrebno.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

MRSA je danes najpogosteje izolirana bakterija odporna proti številnim antibiotikom in je močno razširjena na številnih delih sveta. Tudi v slovenskih bolnišnicah predstavlja povprečno 60 % prevalenco med vsemi osamljenimi izolati bakterije *S. aureus* (EARSS, 2007). Mikrobiološki laboratorij predstavlja prvo obrambno črto proti širjenju MRSA povzročitelja v bolnišnicah. Zato je pomembno, da je identifikacija MRSA hitra in pravilna, kar odločilno vpliva na izbiro ustreznega antibiotičnega zdravljenja. Napačna diagnostika bakterijskega seva in/ali napačna opredelitev odpornosti proti antibiotikom lahko povzroči hude klinične, epidemiološke in ekonomske posledice. Hkrati terapevtski in negovalni ukrepi pri bolnikih okuženih oz. koloniziranih z MRSA obremenjujejo zdravstveno osebje in povečajo stroške oskrbe bolnika (Haddadin in sod., 2002).

Ena od najcenejših metod za ugotavljanje prisotnosti MRSA predstavlja kultivacija kužnin na selektivnih in diferencialnih gojiščih. Želja po čim hitrejšem in čim bolj cenovno ugodnem dokazovanju MRSA v različnih kužninah je vzpodbudila k razvoju kromogenih gojišč na katerih zrastejo določeni izolati znotraj 24 ur v značilnih barvah kolonij (Diederer in sod., 2006). V naši raziskavi smo želeli primerjati občutljivost in specifičnost novega kromogenega gojišča MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) z že uveljavljenim selektivnim in prav tako diferencialnim gojiščem ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Želeli smo tudi ugotoviti, ali vrstni red nacepljanja brisov na gojišča vpliva na končne rezultate. Zato smo določeno število nadzornih kužnin nacepili na krvni agar, ORSAB in MRSA-ID gojišče po predhodnem suspendiranju brisov v 600 μ L sterilne fiziološke raztopine in rezultate primerjali z brisi, ki smo jih neposredno nacepili na gojišča.

Pri neposrednem načinu kultivacije smo analizirali 200 nadzornih kužnin. Od 137 izoliranih sevov *S. aureus* smo identificirali 100 izolatov MRSA in 37 izolatov MSSA. Na preiskavo na MRSA smo testirali 74 brisov nosu, 70 brisov kožnih gub in 56 brisov žrel. Iz brisov nosu smo izolirali 37 sevov MRSA, 35 sevov iz brisov kožnih gub in 28 sevov MRSA iz brisov žrel. Rezultati so podani v Preglednici 3.

S kultivacijo nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju brisov smo analizirali 125 brisov od 64 predhodno dekoloniziranih pacientov, ki so bili v preteklih štirinajstih dneh okuženi oz. kolonizirani z MRSA. Iz 125 brisov smo izolirali 50 sevov MRSA in pri 75 vzorcih nismo

izolirali MRSA. Testirali smo 43 brisov nosu, 46 brisov kožnih gub in 36 brisov žrel. Iz brisov nosu smo izolirali 16 izolatov MRSA, 19 pozitivnih vzorcev iz brisov kožnih gub in 15 izolatov MRSA iz brisov žrel (Preglednica 7).

V raziskavi smo odvzeli kužnine iz delov telesa, ki so močno naseljene z bakterijsko normalno floro. Zato smo na krvnem agarju in na selektivnem in diferencialnem gojišču MRSA-ID in ORSAB zasledili še številne ne-stafilokokne mikroorganizme (alfa hemolitične streptokoke, enterokoke in enterobakterije). Na število izoliranih ne-stafilokoknih mikroorganizmov vpliva predvsem vrsta kužnine, saj kot vemo, se na določenih delih telesa nahaja določena populacija mikroorganizmov.

Za kontrolo kvalitete gojišč smo pred samim začetkom uporabe MRSA-ID in ORSAB gojišča testirali rast in morfološki izgled kolonij sevov *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Escherichia coli* ATCC 25922. Rezultate kultivacije smo dobili v pričakovanju kot jih navajajo proizvajalci agarjev.

Na kromogenih gojiščih zrastejo določeni izolati v kolonijah značilne barve (Diederer in sod., 2006). Seve MRSA na MRSA-ID gojišču zasledimo v obliki zelenih kolonij s tankim zelenim kolobarjem okrog kolonij. Na gojišču ORSAB pa zrastejo v obliki značilnih drobnih modrih kolonij z modro obarvano okolico. Prednost selektivnih diferencialnih kromogenih gojišč MRSA-ID in ORSAB je v tem, da nam že v enem koraku (po nacepiti kužnin) nakažejo identifikacijo bakterij in njeno odpornost. MRSA-ID in ORSAB vsebujeta različna antibiotika, ki selekcionirata rast večkratno odpornim sevom MRSA in VRSA ter inhibirata rast ostali kompetitivni flori. MRSA-ID vsebuje 4 mg/L cefoksitina, medtem ko ORSAB vsebuje nekoliko manj učinkovit oksacilin (2 mg/L). Da cefoksitin predstavlja boljši selektivni agens kot oksacilin, si predstavljajo s tem, da poveča indukcijo PBP2a beljakovine in omogoči rast sevom MRSA (Perry in sod., 2004). Izurjen mikrobiolog lahko že po 24-urni inkubaciji kulture na krvnem agarju in gojišču ORSAB postavi zanesljivo diagnozo o prisotnosti MRSA. Z izvedbo lateksnega aglutinacijskega testa iz sumljivih modrih kolonij zraslih na ORSAB gojišču ne dobimo zanesljivih rezultatov, s katerim bi potrdili MRSA seve.

Krvni agar nam omogoča sočasno izolacijo številnih patogenih mikroorganizmov. Njegova pomanjkljivost je, da za identifikacijo *S. aureus* potrebujemo izvajanje številnih identifikacijskih testov, kar je časovno zamudno. MRSA kolonije rastejo na krvnem agarju v

obliki večjih, rahlo sivkastih kolonij, večinoma brez hemolize. Le redki sevi tvorijo močno β -hemolizo. Z uporabo kromogenih gojišč se je število potrebnih identifikacijskih testov zmanjšalo in s tem se je skrajšal tudi identifikacijski čas, saj ob enem pridobimo informacijo o občutljivosti za oksacilin (Perry in sod., 2003).

5.1.1 Primerjava dveh selektivnih diferencialnih gojišč (MRSA-ID in ORSAB)

Tako pri neposredni nacepiti brisov kot pri nacepiti brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini smo uporabili nadzorne kužnine brisov nosu, kožnih gub in žrel. Pri vsakem bolniku so bile običajno odvzete vse tri vrste nadzornih kužnin, kar omogoča zanesljivejšo identifikacijo kolonizacije z MRSA. Za identifikacijo smo dobili tudi nekaj posameznih brisov nosu in kožnih gub. Med vsemi kužninami so tako prevladovali brisi nosu, najmanj pa je bilo brisov žrel.

S kombinacijo uporabe MRSA-ID gojišča in s potrditvenimi MRSA identifikacijskimi testi (dokazovanje gena *mecA*) dosežemo optimalno identifikacijo MRSA povzročitelja. Za izvedbo potrditvenih testov potrebujemo še nadaljnjih 48 ur. Zato je skupno za identifikacijo MRSA izolatov potrebnih 4 do 5 dni. To strategijo identifikacije se rutinsko uporablja tudi v Laboratoriju za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti, Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani in smo jo uporabili tudi v naši raziskavi. Le v primerih, ko je pomembno status bolnika glede MRSA opredeliti v nekaj ur se poslužujejo hitrih molekularnih testov (Cherkaoui in sod., 2007).

S pomočjo Preglednice 3 in 7 opazimo, da smo največji delež MRSA izolatov izolirali iz brisov nosu in kožnih gub, ki smo jih nacepili na MRSA-ID gojišče. Z gojiščem ORSAB smo v primerjavi z MRSA-ID dokazali nekoliko manj pozitivnih nadzornih kužnin. Iz Preglednice 2 in 6 razberemo, da smo po 24-urni inkubaciji brez predhodne obogatitve na gojišču MRSA-ID identificirali več sevov MRSA. Medtem ko smo z že uveljavljenim gojiščem ORSAB identificirali malo več pozitivnih vzorcev po 48-urni inkubaciji z metodo predhodnega suspendiranja brisov. Po predhodni obogatitvi sta se gojišči uravnali in smo z obema gojiščema identificirali primerljivo število pozitivnih izolatov. Če primerjamo neposredno nacepitev različnih nadzornih kužnin po časovni identifikaciji (Preglednica 3 in Slika 12), opazimo, da smo z MRSA-ID hitreje identificirali pozitivne vzorce nosu in kožnih gub, medtem ko smo z ORSAB gojiščem hitreje identificirali pozitivne brise žrela. To ne drži za kultivacijo kužnin po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini (Preglednica 7). O

kakršnem koli zanesljivem zaključku o učinkovitejši zaznavi določene vrste kužnin na posameznem gojišču ne moremo govoriti. Za takšno analizo nismo imeli ustreznih vzorcev, saj bi morali imeti za natančno analizo enako število pozitivnih brisov nosu, kožnih gub in žrel. Cherkaoui in sodelavci (2007) so dokazali, da imajo selektivna kromogena gojišča (MRSA-ID, MRSA Select in CHROMagar) najboljšo občutljivost za brise nosu, za ostale nadzorne kužnine pa se občutljivost zaznave zniža. Na pomanjkljivo selektivnost gojišč pomembno vpliva tudi količina inokuluma, zato je še toliko bolj pomembno, da so kužnine pravilno odvzete, transportirane v transportnem gojišču in čim hitreje nacepljene na gojišča (Cherkaoui in sod., 2007).

Narejenih je bilo že veliko študij primerjave kromogenega gojišča MRSA-ID in ORSAB. Občutljivost, ki nam pravilno pokaže tiste, ki so kolonizirani oz. okuženi z MRSA, se za MRSA-ID gojišče v do sedaj opravljenih študijah giblje med 62 % in 96 %. Za ORSAB gojišče pa med 38 % in 98 %. Zavedati se moramo, da občutljivosti obeh gojišč ne moremo primerjati med seboj, kljub temu da je sama metodologija zelo podobna. Na občutljivost vplivajo lažno negativni rezultati, ki so odvisni predvsem od metod, ki jih uporabimo pri detekciji oz. izolaciji vseh MRSA izolatov (Nahimana in sod., 2006). Na občutljivost vpliva tudi populacija bakterije *S. aureus*, saj so opazili že precejšnjo razliko v stopnji odpornosti med posameznimi celicami iste populacije. Zato prihaja med raziskavami do različnih nasprotujočih rezultatov. Kljub temu so s številnimi raziskavami dokazali, da dobimo z uporabo kromogenega gojišča MRSA Select najvišjo občutljivost po 24-urni inkubaciji, sledi mu CHROMagar, MRSA-ID in ORSAB gojišče. Vrstni red najbolj občutljivih kromogenih gojišč se po 48-urni inkubaciji nekoliko spremeni. Po tej inkubaciji imata MRSA-ID in MRSA Select primerljivi občutljivosti, sledita pa mu še CHROMagar in ORSAB gojišče (Nahimana in sod., 2006; Cherkaoui in sod., 2007). Kljub temu da so s številnimi študijami dokazali visoko občutljivost in specifičnost MRSA Select in MRSA-ID gojišča, je še vedno potrebno izvajati potrditvene teste (Cherkaoui in sod., 2007).

Naše ugotovitve so prav tako potrdile njihove rezultate. V Preglednici 11 opazimo, da smo z MRSA-ID tako po 24 kot tudi po 48-urni inkubaciji brez obogatitve dosegli višjo občutljivost kot z ORSAB. V primerjavi s preteklimi študijami smo na obeh gojiščih dokazali nižjo občutljivost. Do tega je prišlo najverjetneje zaradi številnih neopredeljenih rezultatov, ki smo jih po dodatni 24-urni izolaciji dokazali kot pozitivne rezultate, in zaradi velikega deleža lažno negativnih rezultatov (skoraj 20 % pri MRSA-ID in več kot 20 % pri uporabi ORSAB

gojišča). Ne glede na vse lahko uporabimo tako eno kot drugo gojišče za hitro identifikacijo MRSA iz kužnin. Zaradi hitrejšje identifikacije pa bi prednost dali novemu kromogenemu gojišču MRSA-ID.

5.1.2 Primerjava neposredne nacepitve brisov z metodo nacepitve nadzornih brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini

Da bi ugotovili, ali vrstni red nacepljanja brisov na gojišča vpliva na končne rezultate, smo določeno število nadzornih kužnin nacepili na krvni agar, ORSAB in MRSA-ID gojišče po predhodnem suspendiranju brisov v fiziološki raztopini in rezultate primerjali z brisi, ki smo jih neposredno nacepili na gojišča. Pri obeh metodah nacepitve smo uporabili iste vrste nadzornih kužnin različnih bolnikov. Izvedba obeh metod je bila časovno ločena. Kultivacijo nadzornih kužnin hospitaliziranih bolnikov smo izvajali v obdobju od 10. 12. 2007 do 21. 1. 2008. Za nacepitve brisov po predhodnem suspendiranju brisa v fiziološki raztopini smo izbrali le vzorce hospitaliziranih bolnikov, ki so jim v preteklih štirinajstih dneh dokazali, da so okuženi ali kolonizirani z MRSA in so jih po dekolonizaciji oz. po zdravljenju z antibiotiki v obdobju od 8. 8. 2008 do 13. 10. 2008 ponovno poslali na preiskavo na MRSA. S tem ko smo metode izvedli v različnem časovnem obdobju, smo morda s pridobljenimi izkušnjami neposredno vplivali na rezultate.

Z drugo metodo nacepitve nadzornih brisov, s predhodno pripravljeno suspenzijo brisov v 600 μ L sterilne fiziološke raztopine, smo se z ekvivalentnim nanosom 50 μ L inokuluma na vsa gojišča izognili vplivu vrstnega reda nacepljanja brisov. S tem ko smo nadzorne kužnine suspendirali, smo nekoliko zmanjšali občutljivost vseh gojišč (Perry in sod., 2004). V našem primeru smo zasledili zmanjšanje občutljivosti le za ORSAB gojišča po 24-urni inkubaciji. Tudi Nahimana je s sodelavci (2006) v pretekli raziskavi poročal o višji občutljivosti po neposredni nacepiti tako za MRSA-ID kakor za ORSAB gojišče (Nahimana in sod., 2006).

S suspendiranjem kužnin v sterilni fiziološki raztopini smo ugotovili, da je na številnih gojiščih zraslo manj kot 10 MRSA pozitivnih kolonij. K temu lahko pripišemo, da so bili vzorci odvzeti bolnikom po zdravljenju z antibiotiki in je zato bilo pričakovano manjše število MRSA pozitivnih vzorcev.

Delež identificiranih MRSA pozitivnih vzorcev se poveča s podaljšanjem inkubacijskega časa in z obogatitvijo (Preglednica 2). S primerjavo rezultatov prikazanih v Preglednici 2 in 6 smo prišli tudi do naslednjih zaključkov. Z obema metodama kultivacije in s hkratno uporabo obeh

gojišč smo po 24 urah brez predhodne obogatitve dokazali enak delež MRSA pozitivnih vzorcev (25 %; povprečje z obema gojiščema). Razliko smo dobili predvsem po 48-urni inkubaciji brez obogatitve, ko smo po suspendiranju kužnin v sterilni fiziološki raztopini izolirali več MRSA pozitivnih vzorcev kot z neposredno kultivacijo. Po obogatitvi smo z metodo suspendiranja kužnin ugotovili manj MRSA pozitivnih vzorcev kot z neposredno nacepitvijo s katero smo izolirali še dodatnih 36 % MRSA izolatov (povprečje z obema gojiščema). Torej uporaba obogatitvenega gojišča THBS pozitivno vpliva na identifikacijo MRSA pozitivnih vzorcev. S tem pa se podaljša čas identifikacije in poviša cena preiskave (Cherkaoui in sod., 2007; Nahimana in sod., 2006).

Občutljivost MRSA-ID je bila po 24 urah z neposredno nacepitvijo nadzornih brisov brez predhodne obogatitve 42,2 % in 97,1 % po 48 urah, medtem ko je bila za ORSAB 36,4 % po 24 urah in 86,4 % po 48 urah. Po kultivaciji suspendiranih vzorcev v 600 μ L sterilne fiziološke raztopine smo za ORSAB gojišče po 24 urah dobili 23,7 % in 89,5 % občutljivost po 48 urah inkubacije ter 42,1 % in 100,0 % občutljivost za MRSA-ID. Compennolle in sodelavci (2007) so prav tako primerjali karakteristični učinek ORSAB in MRSA-ID gojišča z obdelavo vzorcev po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini. V primerjavi z našo ugotovitvijo so za ORSAB gojišče poročali o višji občutljivosti po 24 urah (57 %) in o nižji občutljivosti po 48 urah (77 %). Višjo občutljivost so po 24 urah dokazali tudi za MRSA-ID (60 %). Da smo v primerjavi s Compennollovi študijo dobili bistveno višjo občutljivost po 48 urah lahko pripišemo neizvajanju molekularnih testov, s katerimi bi lahko odkrili tudi tiste seve MRSA, ki jih morda kromogeno MRSA-ID gojišče ni zaznalo. Nizko občutljivost po 24-urni inkubaciji smo dobili na račun številnih lažno negativnih rezultatov, neopredeljenih izolatov in zaradi predhodnega suspendiranja vzorcev v sterilni fiziološki raztopini.

Tako na MRSA-ID kot na ORSAB gojišču smo glede na barvo in morfologijo kolonij dosegli visoko specifičnost in tako z visoko verjetnostjo pokazali tiste bolnike, ki niso okuženi ali kolonizirani z MRSA. S 24-urno inkubacijo smo z obema metodama kultivacije dosegli več kot 95 % specifičnost. Po 48-urni inkubaciji se je z obema metodama specifičnost znižala na obeh gojiščih. Če se specifičnost zniža pod 95 %, se priporoča izvajanje dodatnih potrditvenih testov. To velja predvsem za značilne MRSA kolonije, ki se pojavijo šele po 48-urni inkubaciji (Cherkaoui in sod., 2007). V našem primeru smo specifičnost manj kot 95 % dobili po 48-urni inkubaciji na ORSAB gojišču po neposredni nacepitvi (Preglednica 11). S kultivacijo kužnin po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini smo na gojišču MRSA-

ID dobili specifičnost po 24 urah 99,1 % oz. 96,7 % po 48-urni inkubaciji. Naši rezultati so bili tako skladni s študijo, ki jo je izvedel Compennolle s sodelavci (2007). Specifičnost na MRSA-ID so dobili 98 % po 24 urah in 94 % po 48 urah. Z našo raziskavo smo dobili višjo specifičnost gojišča ORSAB po 24 in 48-urni inkubaciji. Njihove vrednosti pa so bile 92 % oz. 83 %. Tako naša kot Compennollova študija sta pokazali, da ima MRSA-ID gojišče višjo občutljivost in specifičnost od ORSAB tako po 24 kot 48 urah inkubacije brez predhodne obogatitve.

Ker določeni MRSA izolati s fenotipskimi metodami ne kažejo lastnosti izražanja *mecA* gena dokler ne pridejo pod selektivnim pritiskom antibiotičnega zdravljenja (lažno negativni rezultati), predstavlja PCR zlati standard detekcija gena *mecA*.

V naši raziskavi je imelo večina MRSA vzorcev na kromogenih gojiščih značilno barvo in morfologijo kolonij, ki jih opisuje izdelovalec gojišč. Dokazali smo tudi določeno število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Na gojišču MRSA-ID smo zasledili v primerjavi z ORSAB gojiščem manjše število za MRSA neopredeljene kolonije (lažno pozitivne) (Preglednica 10). V Preglednici 5 in 9 smo prikazali katere bakterije povzročajo največ lažno pozitivnih rezultatov. Tako smo na kromogenem MRSA-ID in ORSAB gojišču najpogosteje izolirali MSSA, na gojišču ORSAB pa smo prav tako pogosto izolirali KNS. Raziskovalno nalogo bi lahko izpopolnili z natančno identifikacijo vseh lažno pozitivnih rezultatov.

Zaradi večje občutljivosti kromogenih gojišč smo po 48-urni inkubaciji izolirali manj lažno negativnih rezultatov na ORSAB in MRSA-ID gojišču in hkrati smo dobili več lažno pozitivnih rezultatov. K temu je morda prispevalo dejstvo, da so se določene bakterije prilagodile na selektivnost gojišč ali so kromogena gojišča izgubila selektivnost.

Pričakovali smo, da se bomo s kultivacijo brisov po predhodnem suspendiranju v fiziološki raztopini izognili pristranosti zaradi vrstnega reda nacepiti brisov in da bomo tako dobili na drugem nacepljenem gojišču MRSA-ID bistveno višji občutljivosti kot na ORSAB. Napovedi so se deloma uresničile, saj smo po 48-urni inkubaciji zares dobili višjo občutljivost MRSA-ID gojišča (Preglednica 11). K temu bi lahko pripisali tudi vsebnost bolj učinkovitega antibiotičnega agensa, ki ga vsebuje MRSA-ID. Smo pa zaradi suspendiranja brisov v sterilni fiziološki raztopini po 24-urah dobili nekoliko nižjo občutljivost tako na MRSA-ID kot ORSAB gojišču. Temu bi se morda lahko izognili s suspendiranjem brisov v manjšem

volumnu od 600 μL sterilne fiziološke raztopine oz. z nanosom večjega inokula suspenzije na gojišča. Lahko pa zaključimo, da je uveljavljeni postopek neposrednega nacepljanja kužnin in dokazovanja MRSA dovolj zanesljiv in mikrobiološko ustrezen.

Naša študija je imela nekaj omejitev. Študijsko populacijo so predstavljali predvsem starejši hospitalizirani bolniki, ki so imeli visoko tveganje za kolonizacijo ali okužbo z MRSA. Zato ne poznamo rezultatov testov pri nizko rizični populaciji.

Raziskovalno delo bi lahko še izboljšali z ugotavljanjem prisotnosti gena *mecA* s PCR. S tem bi lahko ugotovili še kakšen sev MRSA, ki smo ga morda izpustili. Molekularne rezultate bi lahko primerjali z dobljenimi rezultati, in sicer s potrditvenimi testi (presajalna plošča z oksacilinom, disk difuzijsko metodo, OF manitol, koagulacija plazme).

5.2 SKLEPI

- Tako z neposredno nacepivijo brisov kot po predhodnem suspendiranju brisa v fiziološki raztopini je bila na MRSA-ID gojišču po 24 ur in 48-urni inkubaciji občutljivost dokazovanja MRSA izolatov višja kot na gojišču ORSAB. (Z neposredno nacepivijo brisov smo po 24 urah dobili občutljivost na MRSA-ID 42,2 %, po 48 urah pa 97,1 %. Na ORSAB gojišču pa smo po 24 urah dobili 36,4 % in po 48 urah 86,4 % občutljivost. S kultivacijo suspendiranih vzorcev v sterilni fiziološki raztopini smo na MRSA-ID po 24 urah dobili 42,1 % in 100 % občutljivost po 48 urah. Z gojiščem ORSAB smo po 24 urah dobili 23,7 % in 89,5 % občutljivost po 48 urah inkubacije.)
- Po 24-urni inkubaciji smo z obema metodama kultivacije dosegli več kot 95 % specifičnost. S podaljšanjem inkubacije do 48 ur se je specifičnost z obema metodama znižala tako na ORSAB kot na MRSA-ID gojišču. Nižjo specifičnost kot 95 % smo dobili le na ORSAB po 48-urni inkubaciji z neposredno nacepivijo nadzornih brisov.
- Na MRSA-ID gojišču smo zasledili v primerjavi z ORSAB gojiščem manjše število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov.
- Po obogatitvi smo več MRSA pozitivnih vzorcev dokazali z neposredno nacepivijo brisov. Predhodna obogatitev pomembno poveča občutljivost dokazovanja MRSA v nadzornih kužninah na identifikacijo MRSA pozitivnih vzorcev.
- Za identifikacijo MRSA iz kužnin lahko uporabimo tako ORSAB kot MRSA-ID gojišče, prednost bi pa dali novemu kromogenemu MRSA-ID gojišču.
- Z obema metodama kultivacije smo po 24 urah dokazali enak delež MRSA pozitivnih vzorcev. Razliko smo dobili predvsem po 48-urni inkubaciji, ko smo po suspendiranju brisov v sterilni fiziološki raztopini dokazali več MRSA pozitivnih vzorcev.
- Uveljavljeni postopek neposrednega nacepljanja kužnin in dokazovanja MRSA je dovolj zanesljiv in ustrezen ter ga ni potrebno nadomestiti s predhodnim suspendiranjem brisov v fiziološki raztopini.

6 POVZETEK

Proti metilcinu odporni sevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) predstavljajo ene izmed najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb in okužb pridobljenih zunaj bolnišnice tako pri odraslih kot tudi pri otroški populaciji. Z naraščajočo incidenco MRSA okužb se soočajo v številnih delih sveta, vključno z Evropo, Ameriko, Severno Afriko in na Daljnem in Bližnjem vzhodu. MRSA je pogosto odporen tudi na druge antibiotike. Pri veliki večini ljudi kolonizira površino telesa in sluznic in pri tem ne povzroča okužbe. Nevarnost gnojnih okužb kože, mehkega tkiva in ran obstaja pri pacientih, ki imajo oslABLJENE obrambne sposobnosti. V primeru da *S. aureus* vdre v kri, lahko povzroči bakteriemijo in sepso s številnimi zapleti in visoko smrtnost. Okužbe, ki jih povzroča omenjeni patogen, uspešno zdravijo predvsem z vankomicinom. Leta 2002 so pa že izolirali *S. aureus*, ki je zaradi pridobitve enterokoknega gena *vanA* pridobil popolno odpornost proti vankomicinu. Upanja o uspešnem zdravljenju nam dajejo številni novo odkriti antibiotiki (tigeciklin, oksazolidinon linezolid, streptogramin daptomicin in ciklični lipopeptid kvinupristin-dalfopristin), ki pa ne dosegajo tako učinkovitega delovanja. Upamo lahko, da zaradi človekovega malomarnega ravnanja in neustrezne ter nespametne uporabe antibiotikov bakterije ne bodo razvile odpornosti tudi nanje.

Pri preprečevanju širjenja bolnišničnih okužb je pomembna predvsem higiena bolnišničnega osebja in obiskovalcev v bolnišnici. Le ti so običajno slabo poučeni o pomembnosti razkuževanja rok pred in po vstopu v bolnikovo sobo. Pomemben del preprečevanja širjenja okužb predstavlja tudi pravočasna in učinkovita identifikacija in izolacija MRSA nosilcev. Za ugotavljanje odpornosti proti metilcinu večina laboratorijev uporablja različne fenotipske metode, ki so enostavne, cenovno ugodne, so pa relativno počasne in na rezultate lahko vplivajo različni fizikalni in kemični faktorji (temperatura, pH, koncentracija soli,...). Veliko primernejša bi bila uporaba molekularnih metod, ki pa se zaradi uporabe dragih substratov, opreme, strokovnega sodelavca in neprimernosti za obdelavo velikega števila vzorcev niso uveljavile v rutinskih preiskavah. Zato so začeli razvijati nova kromogena gojišča z visoko občutljivostjo že po 24-urni inkubacij.

Med najbolj občutljivimi kromogenimi gojišči zasledimo MRSA-ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) gojišče, ki smo ga v raziskavi primerjali z že uveljavljenim selektivnim in diferencialnim gojiščem ORSAB (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). S kultivacijo nadzornih kužnin na MRSA-ID gojišču smo tako po 24 kot po 48-urni inkubaciji dobili višjo

občutljivost in specifičnost in hkrati smo na novem kromogenem gojišču zasledili manjše število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Zato lahko trdimo, da je novo kromogeno gojišče MRSA-ID zanesljivejše za identifikacijo MRSA izolatov od že uveljavljenega ORSAB gojišča.

Zanimalo nas je tudi, ali vrstni red nacepljanja brisov na gojišča vpliva na končne rezultate. Zato smo določeno število nadzornih kužnin nacepili na krvni agar, ORSAB in MRSA-ID gojišče po predhodnem suspendiranju brisov v sterilni fiziološki raztopini in rezultate primerjali z brisi, ki smo jih neposredno nacepili na gojišča. Po 48-urni inkubaciji smo po suspendiranju brisov v sterilni fiziološki raztopini izolirali več MRSA pozitivnih vzorcev kot z neposredno nacepitvijo. S kultivacijo kužnin po predhodnem suspendiranju smo pričakovali, da se bomo izognili pristranosti zaradi vrstnega reda nacepitve brisov in da bomo tako dobili bistveno višjo občutljivost drugega nacepljenega gojišča MRSA-ID. Napovedi so se deloma uresničile, saj smo po 48-urni inkubaciji zares dobili višjo občutljivost MRSA-ID gojišča. Smo pa zaradi suspendiranja brisov v sterilni fiziološki raztopini po 24-urah dokazali nekoliko nižjo občutljivost tako na MRSA-ID kot z ORSAB gojiščem. Zato lahko zaključimo, da je uveljavljeni postopek neposrednega nacepljanja kužnin in dokazovanja MRSA dovolj zanesljiv in ustrezen.

7 VIRI

- An Diep B., Gill R.S., Chang F.R., HaiVan P.T., Chen H.J., Davison G.M., Lin F., Lin J., Carleton A.H., Mongadin F.E., Sensabaugh F.G., Perdreau-Remington F. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 367: 731-739
- Arbique J., Forward K., Haldane D., Davidson R. 2001. Comparison of the Velogene rapid MRSA identification assay, Denka MRSA-Screen assay, and BBL Crystal MRSA ID system for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40: 5-10
- Boyce J.M. 2001. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. *Journal of Hospital Infection*, 48: 9-14
- Boyce J.M., Cookson B., Christiansen K., Hori S., Vuopio-Varkila J., Kocagöz S., Öztop Y., Vandembroucke-Grauls C., Harbarth S., Pittet D. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 5: 653-663
- Boyle-Vavra S., Daum R.S. 2007. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87: 3-9
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2001. The staphylococci. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 22nd ed. Foltin J., Ransom J., Lebowitz H., Holton B. (eds.). New York, The McGraw Hill Companies: 197-202
- Brown D.F.J., Edwards D.I., Hawkey P.M., Morrison D., Ridgway G.L., Towner K.J., Wren M.W.D. 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 1000-1018
- Casey A.L., Lambert P.A., Elliott T.S.J. 2007. Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 3: 23-32
- Chambers. 1997. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 4: 781-791

- Cherkaoui A., Renzi G., Francois P., Schrenzel J. 2007. Comparison of four chromogenic media for culture-based screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 500-503
- Colakoglu S., Aliskan H., Senger S.S., Turunc T., Ziya Demiroglu Y., Arslan H. 2007. Performance of MRSA-ID chromogenic medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures and clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59: 319-323
- Compernelle V., Verschraegen G., Claeys G. 2007. Combined use of Pastorex Stph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA-ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1: 154-158
- Črnica T., Habjanič A., Novak N. 2002. Vloga medicinske sestre pri preprečevanju bolnišničnih okužb. *Zdravstveni vestnik*, 36: 105-108
- Dancer J.S. 2008. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet*, 8: 101-113
- Diederens B.M.W., Leest van C.M., Duijn van I., Willemse P., Keulen van P.H.J., Kluytmans J.A.J.W. 2006. Evaluation of *S.aureus* ID, a chromogenic agar medium for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Infection*, 34, 2: 95-97
- EARSS. 2007. EARSS Annual Report 2007. V: Antimicrobial resistance in Europe, *Staphylococcus aureus*. Bilthoven: 48-53
http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/Annual_reports.jsp (16. dec. 2008)
- Faria N.A., Carrico J.A., Oliveira D.C., Ramirez M., de Lencastre H. 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 136-44
- Flayhart D., Hindler J.F., Bruckner D.A., Hall G., Shrestha R.K., Vogel S.A., Richter S.S., Howard W., Walther R., Carroll C.K. 2005. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 11: 5536-5540

- Fournier B., Philpott J.D. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 3: 521-540
- Fournier J.M., Bouvet A., Boutonnier A., Audurier A., Goldstein F., Pierre J. 1987. Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 1932-1933
- Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 73-73
- Gould I.M. 2005. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 61: 277-282
- Grmek-Košnik I., Ihan A., Dermota U., Rems M., Kosnik M., Jorn Kolmos H. 2005. Evaluation of separate vs pooled swab cultures, different media, broth enrichment and anatomical sites of screening for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* for clinical specimens. *Journal of Hospital Infection*, 61: 155-161
- van Griethuysen A., Bes M., Etienne J., Zbinden R., Kluytmans J. 2001. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1: 86-89
- Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health terea. *Lancet*, 368: 874-885
- Gubina M. 2003. Priročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije: za študente medicine. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 99-103
- Haddadin A.S., Fappiano S.A., Lipsett P.A., 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal*, 78: 385-392
- van Hal J.S., Jennings Z., Stark D., Marriott D., Harkness J. 2008. MRSA detection: comparison of two molecular methods (BD GeneOhm PCR assay and Easy-Plex) with two selective MRSA agars (MRSA-ID and Oxoid MRSA) for nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 1: 47-53
- van Hal J.S., Stark D., Lockwood B., Marriott D., Harkness J. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and Geno Type MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA

- agars (MRSA ID, MRSAS-elect and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2486-2490
- Jaffe I.R., Lane D.J., Albury V.S., Niemeyer M.D. 2000. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant *Staphylococci* using the PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 9: 3407-3412
- Kaplan S., Marlowe E.M., Hogan J.J., Doymaz M., Bruckner D.A., Simor A.E. 2005. Sensitivity and specificity of a rapid rRNA gene probe assay for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of *mecA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7: 3438-3442
- Kluytmans J., van Belkum A. 1997. Nasal carriage of: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Journal of Clinical Microbiology*, 10: 505-520
- Kocjan B., Seme K., Poljak M. 2004. Genetska osnova odpornosti *Staphylococcus aureus* proti meticilinu. *Medicinski razgledi*, 43: 411-418
- Krishna B.V.S., Smith M., McIndeor A., Gibb A., Dave J. 2008. Evaluation of chromogenic MRSA medium, MRSASelect and oxacillin resistance screening agar for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Pathology*, 61: 841-843
- Louie L., Matsumura S.O., Choi E., Louie M., Simor E.A. 2000. Evaluation of tree rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 6: 2170-2173
- Lu P.L., Chin L.C., Peng C.F., Chiang Y.H., Chen T.P., Ma L., Siu L.K. 2005. Risk factor and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1: 132-139
- Luijendijk A.D., Belkum A., Verbrugh H., Kluytmans J. 1996. Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 9: 2267-2269
- Madigan T.M., Martinko M.J. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International, 374: 864-866

- Malhotra-Kumar S., Haccuria K., Michiels M., Ieven M., Poyart C., Hryniewicz W., Goossens H. 2008. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 5: 1577-1587
- Nahimana I., Francioli P., Blanc D.S. 2006. Evaluation of tree chromogenic media (MRSA-ID, MRSASelect and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Infectious*, 12: 1168-1174
- Perry D.J., Davies A., Butterworth L.A., Hopley A.L.J., Nicholson A., Gould K.F. 2004. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 10: 4519-4523
- Perry D.J., Rennison C., Butterworth L.A., Hopley A.L.J., Gould F.K. 2003. Evaluation of S. aureus ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 12: 5695-5698
- Regev-Yochay G., Rubinstein E., Barzilai A., Carmeli Y., Kuint J., Etienne J. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 453-456
- Rezar L., Trampuž A. 2002. Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* kot nevarna bolnišnična klica. *Zdravstveni vestnik*, 71: 543-7
- Philippe R.S., Lagacé-Wiens, Michelle J., Kanchana M., Godfrey K.M.H. 2008. Reduction in workload and reporting time by use of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening with MRSASelect medium compared to mannitol-salt medium supplemented with oxacillin. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 4: 1174-1177
- Rozgonyi F., Kocsis E., Kristof K., Nagy K. 2007. Is MRSA more virulent than MSSA. *European Society of Clinical Microbiology Infectious*, 10, 1111: 1469-0691
- Rubinovitch B., Pittet D. 2001. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the edemic hospital: what have we learned? *Journal of Hospital Infection*, 47: 9-18

- Safdar N., Narans L., Gordon B., Maki D. G. 2003. Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 7: 3163-3166
- Seme K. 2002a. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145
- Seme K. 2002b. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 442-444
- Shukla S.K. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its emerging virulence. *Clinical Medicine & Research*, 3, 2: 57-60
- Tacconelli E., Pop-Vicas A.E., D'Agata E.M.C. 2006. Increased mortality among elderly patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Hospital Infection*, 64: 251-25
- Tomič V. 2005. Primerjava metod za dokazovanje bakterij *Staphylococcus aureus* odpornih proti meticilinu (MRSA). Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 13-20
- Turk M., Gostinčar C. 2007. Taksonomija in identifikacija bakterij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: VI-VI
- Veerle C., Gerda V., Geert C. 2007. Combined use of Pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agar, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1: 154-158
- Warren D.K., Liao R.S., Merz L.R., Eveland M., Dunne W.M., Jr. 2004. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 12: 5578-5581
- Wijaya L., Hsu L-Y., Kurup A. 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 35: 479-486

Žohar-Čretnik T. 1999. Problem širjenja proti meticilinu odpornega *Staphylococcus aureus*.
V: Bolnišnične okužbe, Zbornik predavanj, Maribor, 21-22 maj. 1999. Maribor, Splošna
bolnišnica Maribor, Center za mikrobiologijo ZZV Maribor: 165-172

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med. za pomoč, nasvete, usmerjanje in spodbudo pri izvajanju diplomskega dela in prof. dr. Evi Ružič-Sabljić, dr. med. za recenzijo diplomske naloge.

Zahvala je namenjena tudi vodji Laboratorija za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti Nataši Švent – Kučina, dr. med., ker mi je omogočila opravljanje laboratorijskega dela, pomagala tekom izdelave diplomske naloge in za vse koristne nasvete. Za vedno pozitivno vzdušje in za vso pomoč in spodbudne besede pri praktični izdelavi diplomske naloge bi se zahvalila Romini, Karmen, Ireni, Klemenu, Stanojki in Suzani.

Posebna zahvala gre mojim staršem in sestri Petri, ki so mi ves čas stali ob strani, me podpirali in spodbujali pri premagovanju ovir.

Hvala tudi mojemu srčku Mitji, ki verjame vame in me spodbuja še v najbolj norih idejah. Skupaj sva se veselila uspehov in tolažila razočarane dni.

Nikoli ne bom pozabila Mateje, Alenke, Tadeje in Barbare, ki smo skupaj preživljale študijska leta, si med seboj pomagale in se veselile v sončnih dneh.

Res hvala vsem!