

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca ŠOŠTARIČ

**DOKAZOVANJE PROTI METICILINU ODPORNEGA *Staphylococcus aureus* Z UPORABO MOLEKULARNE METODE NEPOSREDNO IZ KUŽNINE**

**DIPLOMSKO DELO**

Univerzitetni študij

**DETECTION OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* WITH MOLECULAR METHOD DIRECTLY FROM CLINICAL SAMPLES**

**GRADUATION THESIS**

University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Oddelku za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Celje.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka, dr. med.

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

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertog, 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

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

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

Datum zagovora: 08.11.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Šoštarič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.61:579.24:615.33 (043) = 863  
KG mikroorganizmi/ bolnišnične okužbe/ odpornost proti antibiotikom/ meticilin/ proti  
meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*/ MRSA/ molekularne diagnostične metode/  
večkratni PCR/ hibridizacija/ neposredno dokazovanje  
AV ŠOŠTARIČ, Mojca  
SA SEME, Katja (mentorica)/POLJAK, Mario (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije  
LI 2007  
IN DOKAZOVANJE PROTI METICILINU ODPORNEGA *Staphylococcus aureus* Z  
UPORABO MOLEKULARNE METODE NEPOSREDNO IZ KUŽNINE  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 68 str., 9 pregl., 2 sl., 77 vir.  
IJ sl  
JI sl/en

AI Proti meticilinu odporni izolati bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA) so glavni povzročitelji bolnišničnih okužb po vsem svetu. V zadnjem času se vse bolj pogosto pojavljajo tudi v domačem okolju. Okužbe z MRSA podaljšajo bivanje v bolnišnicah, povečajo stroške zdravljenja in smrtnost bolnikov. Odpornost pri MRSA obsega vse betalaktamske antibiotike in je pogosto povezana s paralelno odpornostjo proti drugim skupinam antibiotikov. Z naraščanjem števila okužb z MRSA se je pojavila potreba po kontroli širjenja. Za uspešno kontrolo širjenja se je izkazalo odkrivanje nosilcev MRSA ob sprejemu v bolnišnico v povezavi s kontaktno izolacijo in dekolonizacijo nosilcev. Hitro in natančno odkrivanje MRSA v kliničnih vzorcih je velikega pomena za zdravljenje in kontrolo širjenja. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti učinkovitost in uporabnost molekularnega testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) za dokazovanje MRSA neposredno iz kužnine. Metoda temelji na kombinaciji večkratnega PCR in hibridizacije. Za izvedbo novega molekularnega testa potrebujemo le 5-6 ur. Zanimalo nas je tudi, ali lahko vzorce enega bolnika združimo in tako z eno reakcijo dobimo rezultat o morebitni kolonizaciji oziroma okužbi bolnika ter na ta način zmanjšamo stroške testa. Ugotovili smo, da sta tako občutljivost (75,8 %) kot specifičnost (81,6 %) hitrega molekularnega testa prenizki za uporabo v praksi. Če smo upoštevali le MRSA-status bolnika, je bila občutljivost nekoliko višja (77,6 %), specifičnost pa nekoliko nižja (75,0 %). Združevanje vzorcev ni imelo bistvenega vpliva na rezultat. Izkazalo se je, da aspirati traheje niso primerna kužnina za izvedbo molekularnega testa, saj precej zmanjšajo njegovo občutljivost, v nekaterih primerih pa celo inhibirajo PCR reakcijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.61:579.24:615.33 (043) = 863
- CX microorganisms/ nosocomial infections/ antibiotic resistance/ methicillin/ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ MRSA/ molecular diagnostic methods/ multiplex PCR/ hybridisation/ direct detection
- AU ŠOŠTARIČ, Mojca
- AA SEME, Katja (supervisor)/POLJAK, Mario (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TY DETECTION OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* WITH MOLECULAR METHOD DIRECTLY FROM CLINICAL SAMPLES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 68 p., 9 tab., 2 fig., 77 ref.
- LA sl
- AL sl/en

**AB** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the major cause of nosocomial infection worldwide. Recently, MRSA has also become an established cause of community-acquired infections. MRSA infections result in longer hospital staying, increasing therapy costs and higher mortality rates. The resistance spectrum usually extends to all betalactam antibiotics and is often associated with parallel resistance to other antibiotic groups. With increasing number of MRSA infections, the need for control has arisen. Screening for potential MRSA carriers at hospital admission with additional contact isolation and decolonization has proven to be effective in reducing MRSA infections. Accurate and rapid identification of MRSA is essential for effective treatment and infection control strategies. We tested the effectiveness and applicability of molecular assay GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Germany) for MRSA detection directly from clinical samples. The method is the combination of multiplex PCR and hybridization. The new assay enables us to get results in only 5-6 hours. We also wanted to find whether specimen pooling of multiple samples from one patient could give us appropriate results about colonization or infection, resulting in cost reduction. We demonstrated that both sensitivity (75.8 %) and specificity (81.6 %) were too low for using the assay in routine laboratory work. Considering the MRSA-status of patient only, the sensitivity was higher (77.6 %) and the specificity lower (75.0 %). Specimen pooling showed no significant effect on the results. The tracheal aspirate turned out to be inappropriate clinical sample for it decreased sensitivity of the assay and sometimes inhibited the PCR reaction.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>X</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 ZNAČILNOSTI PROTI METICILINU ODPORNE BAKTERIJE <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 <i>Staphylococcus</i>	3
2.1.2 Koagulaza negativni stafilokoki	3
2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.4 Proti meticilinu odporni sevi bakterije <i>S. aureus</i>	5
2.2 ODPORNOST <i>S. aureus</i> PROTI ANTIBIOTIKOM	6
2.2.1 Odpornost proti meticilinu	6
2.2.1.1 Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom	6
2.2.1.2 Meticilin	6
2.2.1.3 Gen <i>mecA</i>	7
2.2.1.4 Izražanje odpornosti proti meticilinu	8
2.2.2 Odpornost proti glikopeptidom	9
2.3 MRSA DOMAČEGA OKOLJA	10
2.4 VIRULENCA MRSA IN DEJAVNIKI TVEGANJA	11
2.4.1 Virulenca MRSA	11
2.4.2 Dejavniki tveganja	11
2.5 EVOLUCIJA MRSA	12

2.6	EPIDEMIOLOGIJA MRSA	13
2.7	NADZOR OKUŽBE Z MRSA	15
2.8	DIAGNOSTIKA MRSA	17
<b>2.8.1</b>	<b>Pomen diagnostike MRSA</b>	<b>17</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Določanje prisotnosti <i>S. aureus</i></b>	<b>18</b>
2.8.2.1	Biokemijske metode identifikacije <i>S. aureus</i>	19
2.8.2.2	Testi lateksne aglutinacije	19
2.8.2.3	Molekularni testi	19
<b>2.8.3</b>	<b>Določanje odpornosti <i>S. aureus</i> proti meticilinu</b>	<b>20</b>
2.8.3.1	Biokemijske metode	21
2.8.3.2	Testi lateksne aglutinacije	21
2.8.3.3	Molekularni testi	21
<b>2.8.4</b>	<b>Verižna reakcija s polimerazo</b>	<b>22</b>
<b>2.8.5</b>	<b>Hibridizacija nukleinskih kislin</b>	<b>23</b>
<b>2.8.6</b>	<b>Molekularne metode za določanje MRSA</b>	<b>24</b>
<b>2.8.7</b>	<b>Presejalno testiranje na MRSA</b>	<b>27</b>
2.9	NAMEN DELA	29
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>30</b>
3.1	VZORCI BOLNIKOV	30
3.2	MATERIALI	31
3.3	IZOLACIJA DNA	32
3.4	PCR	32
3.5	HIBRIDIZACIJA	33
3.6	VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV	34
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>36</b>
4.1	PREDSTAVITEV REZULTATOV	36
4.2	REZULTATI TESTIRANJA POSAMEZNIH VZORCEV	36
4.3	REZULTATI TESTIRANJA MRSA-STATUSA BOLNIKA	41
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>45</b>

5.1	RAZPRAVA	45
5.1.1	Izbira vzorcev	45
5.1.2	Analiza rezultatov glede na posamezne vzorce	46
5.1.3	Analiza rezultatov glede na MRSA-status bolnika	49
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK	54
7	VIRI	56
	ZAHVALA	68

## KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica 1:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna skupina; obravnava vsakega vzorca posebej 37
- Preglednica 2:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; klinična skupina; obravnava vsakega vzorca posebej 38
- Preglednica 3:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; vsi vzorci; obravnava vsakega vzorca posebej 38
- Preglednica 4:** Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov, občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); izračunani glede na posamezne vzorce in klasični postopek osamitve MRSA kot zlati standard 40
- Preglednica 5:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika 41



- Preglednica 6:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); primerjava posameznih vzorcev bolnika z združenimi vzorci; nadzorna skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika 42
- Preglednica 7:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); primerjava posameznih vzorcev bolnika z združenimi vzorci; nadzorna skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika 42
- Preglednica 8:** Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna in klinična skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika 43
- Preglednica 9:** Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov, občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); izračunani glede na MRSA-status bolnika določen s klasičnim postopkom osamitve MRSA kot zlati standard 44

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b>	Delež invazivnih izolatov MRSA iz hemokultur v Evropi leta 2005 (EARSS..., 2005)	14
<b>Slika 2:</b>	Membranski trak s sondami	35

## SEZNAM OKRAJŠAV

BORSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> z mejno odpornostjo
CA-MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> domačega okolja
CNS	koagulaza negativni stafilokoki
DNA	deoksiribonukleinska kislina
HA-MRSA	bolnišnični proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	za meticilin občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	penicilin vezoče beljakovine
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PVL	Panton-Valentine leukocidin
RNA	ribonukleinska kislina
SCC	stafilokokna kromosomska kaset
SRE	specifična zaporedja locirana skrajno desno na SCC <i>mec</i> kromosomski kaseti
VISA	proti vankomicinu zmerno odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	proti vankomicinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>

## 1 UVOD

Proti meticilinu odporni izolati bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA, iz angl.: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) so pomembne bolnišnične bakterije, ki lahko povzročijo resna bolezenska stanja (Haddadin in sod., 2002). Odpornost pri MRSA obsega vse betalaktamske antibiotike in je pogosto povezana s paralelno odpornostjo proti drugim skupinam antibiotikov (Cooper in sod., 2003). Antibiotiki glikopeptidnega razreda so pogosto edini, ki jih še lahko uporabimo za zdravljenje (Rubinovitch in Pittet, 2001). Sevi bakterije *S. aureus* so pridobili odpornost proti meticilinu s sprejetjem gena *mecA*, ki ga kodira alternativna penicilin vežoča beljakovina PBP2a z zmanjšano afiniteto za betalaktamske antibiotike (Haddadin in sod., 2002).

Prvi sev MRSA so odkrili v Veliki Britaniji leta 1961 (Crisostomo in sod., 2001). Najprej so se širili predvsem kot bolnišnični patogeni, zadnja leta pa se vse bolj pogosto pojavljajo tudi v domačem okolju (Maltezou in Giamarellou, 2006). MRSA so danes endemični v mnogih bolnišnicah po vsem svetu (Haddadin in sod., 2002). Okužbe z MRSA podaljšajo bivanje v bolnišnicah, povečajo stroške zdravljenja in smrtnost bolnikov (Salgado in sod., 2006).

Z naraščanjem števila okužb z MRSA se je pojavila potreba po kontroli širjenja. Pri tem se je izkazala za uspešno strategija odkrivanja nosilcev MRSA ob sprejemu v bolnišnico v povezavi s kontaktno izolacijo in dekolonizacijo bolnika (Wernitz in sod., 2005b). Hitro in natančno odkrivanje MRSA v kliničnih vzorcih je velikega pomena za zdravljenje in kontrolo širjenja MRSA. Danes se večinoma uporablja metoda klasične izolacije in identifikacije bakterije iz kužnine, kar pa traja 2-4 dni. Dolgo čakanje na rezultat nam onemogoča hiter pričetek pravega zdravljenja in olajša nadaljnje širjenje MRSA (Harbarth in sod., 2006).

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti učinkovitost in uporabnost nove molekularne metode za dokazovanje MRSA neposredno iz kužnine. Uporabili smo test GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct, ki ga je razvila družba Hain-Lifescience (Nehren, Nemčija). Metodo smo primerjali s klasično

metodo odkrivanja MRSA s kultivacijo, ki se trenutno uporablja v praksi. Za izvedbo novega molekularnega testa potrebujemo le 5-6 ur. Temelji na kombinaciji verižne reakcije s polimerazo (PCR, iz angl.: polymerase chain reaction) in hibridizacije. Z večkratnim PCR s pomočjo z biotinom označenih začetnih oligonukleotidov iz izolirane DNA pomnožimo gen *mecA*, gen specifičen za *S. aureus* in kontrolo pomnoževanja. Produkta PCR dokažemo s pomočjo hibridizacije na membranskih trakovih z imobiliziranimi sondami. Ko se produkti vežejo na sonde, nastanejo označeni kompleksi, ki jih ob dodatku konjugata in substrata vidimo kot barvno reakcijo v obliki črte. Za uspešno identifikacijo kolonizacije ali okužbe z MRSA je potrebno odvzeti vzorce iz več anatomskih mest. Zanimalo nas je, ali lahko vzorce enega bolnika združimo in tako z eno reakcijo dobimo rezultat o morebitni kolonizaciji oziroma okužbi bolnika ter na ta način zmanjšamo stroške testa.

V delo smo vključili klinične vzorce in vzorce nadzornih kužnin bolnikov, ki so znani nosilci MRSA ali so z MRSA okuženi in bolnikov, katerih status glede nosilstva MRSA je bil neznan. Pri vsakem bolniku smo hkrati odvzeli dva seta vzorcev. Vzorca iz prvega seta so bili uporabljeni za klasično kultivacijo, vzorca drugega seta pa za molekularni test. Po izolaciji DNA smo del vzorcev drugega seta združili v skupni vzorec posameznega bolnika.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZNAČILNOSTI PROTI METICILINU ODPORNE BAKTERIJE *Staphylococcus aureus*

#### 2.1.1 *Staphylococcus*

V rod *Staphylococcus* uvrščamo po Gramu pozitivne koke, ki se urejajo v gručice. So ubikvitarni, negibljivi, fakultativno aerobni mikroorganizmi. Pogosto naseljujejo kožo in membrano sluznic. Visoka odpornost na vplive okolja jim omogoča enostavno širjenje z neposrednim stikom. Glede na sposobnost izdelovanja koagualze, encima, ki pretvarja fibrinogen v fibrin, lahko rod razdelimo na dve skupini: na koagulaza pozitivne in koagulaza negativne stafilokoke. Koagulaza pozitiven je samo *Staphylococcus aureus*. Na krvnem agarju najpogosteje raste v obliki gladkih, zlatorumenih, do 2 mm velikih kolonij, obdanih z ozkim pasom popolne (beta) hemolize. Medtem ko je *S. aureus* pomemben človeški patogen, pa so predstavniki koagulaza negativnih stafilokokov (CNS, iz angl.: coagulase negative staphylococci) običajno del normalne kožne flore. Na krvnem agarju rastejo v obliki belih, motnih in izbočenih kolonij (Brooks in sod., 2001; Seme, 2002).

#### 2.1.2 Koagulaza negativni stafilokoki

CNS predstavljajo del naravne flore kože in sluzničnih membran človeka in živali. Pri človeku prevladujejo vrste *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis* in *Staphylococcus haemolyticus*. CNS so dolgo časa obravnavali kot nepatogene bakterije, danes pa je znano, da lahko povzročijo resna obolenja in so celo med najpogostejšimi povzročitelji bolnišničnih bakteriemij pri imunsko oslabljenih bolnikih (Eiff, 2002; Seme 2002). Pogosto kolonizirajo kirurške rane in opekline. Preko različnih vsadkov, predvsem katetrov, lahko vdrejo tudi v kri oziroma v druge primarno sterilne predele organizma (Seme, 2002).

### 2.1.3 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* je najbolj patogen predstavnik stafilokokov (Brooks in sod., 2001). Pri zdravih posameznikih predstavlja del normalne kožne flore človeka, pri tem pa najpogosteje naseljuje nosnice, predele pod pazduho, perinej in dimlje (Haddadin in sod., 2002). Približno 30 % populacije je asimptomatskih nosilcev te bakterije, najpogosteje v nosnicah. Pri večini je nosilstvo le prehodnega značaja in traja do nekaj tednov, v redkih primerih pa lahko preide tudi v kronično obliko (Cooper in sod., 2003; Seme, 2002).

Bakterije *S. aureus* povzročajo velik spekter okužb, od lokalnih okužb kože in mehkih tkiv do sistemskih, kot je bakteriemija. Povzročajo tudi okužbe osrednjega živčnega sistema, zgornjih in spodnjih dihal, lokomotorne aparata, sečil in bolezenska stanja, ki so posledica delovanja bakterijskih toksinov (Seme, 2002; Cooper in sod., 2003). Razširjajo se z neposrednim stikom, najpogosteje preko rok zdravstvenega osebja ali posredno, preko kontaminiranih predmetov (Cooper in sod., 2003).

Izjemne sposobnosti prilagajanja bakterijam *S. aureus* omogočajo preživetje v človeškem organizmu. Površinski polisaharidi jih s svojim protifagocitnim delovanjem ščitijo pred makrofagi, številni beljakovinski receptorji pa jim omogočajo učinkovito pritrditev na različne celične strukture. Pogosto izločajo tudi glikokaliks, zunajcelično polisaharidno snov, ki jim omogoča tvorbo biofilma, pripomore k vezavi in jih ščiti pred naravnimi obrambnimi mehanizmi ter delovanjem antibiotikov. Številni dodatni encimi jim omogočajo lažje prodiranje in hitrejše širjenje okužbe (Seme, 2002).

Zaradi velikega števila nosilcev in izjemne tolerance na zunanje vplive se *S. aureus* hitro in uspešno širijo. To povzroča resne probleme predvsem v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah, kjer se nahaja veliko število imunsko oslabljenih bolnikov (Kluytmans in sod., 1997).

#### **2.1.4 Proti meticilinu odporni sevi bakterije *S. aureus***

Odpornost bakterij proti antibiotikom danes v zdravstvu predstavlja velik problem. Za bolnišnice in druge zdravstvene ustanove so najbolj problematične večkratno odporne bakterije. Zaradi svoje virulence, sposobnosti povzročanja širokega spektra življenjsko nevarnih okužb in velike sposobnosti prilagajanja na različne vplive okolja največ skrbi trenutno povzroča ravno *S. aureus* (Lowy, 2003).

Proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* se od na meticilin občutljivih sevov *S. aureus* (MSSA, iz angl.: methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) razlikujejo po odpornosti proti vsem betalaktamskim antibiotikom, med katere sodi tudi meticilin (Kluytmans in sod., 1997). Odpornost pri MRSA je pogosto povezana tudi s paralelno odpornostjo proti drugim skupinam antibiotikov. To predstavlja velik problem predvsem pri bolnišničnih okužbah (Cooper in sod., 2003). Zaenkrat je zdravljenje bolnikov okuženih z MRSA omejeno na uporabo glikopeptidnih antibiotikov, ki so manj učinkoviti kot proti-stafilokokni betalaktamski antibiotiki (Rubinovitch in Pittet, 2001). Okužbe z MRSA pomenijo podaljšano bivanje bolnikov v bolnišnici, višjo stopnjo obolevnosti in smrtnosti v primerjavi z ostalimi bolniki ter višje stroške zdravljenja. Stroške povišajo tudi stroge higienske potrebe za nosilce MRSA (Mellmann, 2006; Salgado in Farr, 2006).

Glavni rezervoar MRSA v bolnišnicah so okuženi in kolonizirani bolniki, glavni prenašalci pa bolnišnično osebje, ki na rokah ali predmetih prenaša okužbo. Predvsem slaba higiena rok je tista, ki omogoča enostavno in hitro širjenje (Haddadin in sod., 2002; Safdar in sod., 2003). Stopnjo okužb z MRSA lahko precej zmanjšamo z natančnejšim čiščenjem opreme in z uporabo tarčne dekolonizacije bolnikov (Johnson in sod., 2005). Okužbe z večkratno odpornimi bakterijami, kot so tudi MRSA, predstavljajo le zelo majhen delež velike populacije koloniziranih bolnikov (Safdar in sod., 2003).



Okužba z MRSA ponavadi izvira iz kolonizacije, čeprav kolonizacija MRSA redko preide v okužbo. Prehodna ali trajna kolonizacija (do treh let) se lahko pojavi na več mestih, z različnimi sevi. Najpogostejša mesta kolonizacije so rane, nos, sapnik in perinej. V posebnih pogojih je mogoč tudi prenos preko kontaminiranih površin v okolju ali preko zraka, predvsem v enotah za opekline ter pri intubiranih bolnikih (Haddadin in sod., 2002).

## 2.2 ODPORNOST *S. aureus* PROTI ANTIBIOTIKOM

### 2.2.1 Odpornost proti meticilinu

#### 2.2.1.1 Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom

Odpornost proti antibiotikom je lahko naravna ali pridobljena. Naravno odporne bakterije že po naravi nimajo mehanizma, na katerega ta antibiotik običajno deluje. O pridobljeni odpornosti pa govorimo, kadar prej občutljiva bakterija pridobi odpornost proti določenemu antibiotiku. Ločimo še pojem relativna pridobljena odpornost, ki se nanaša na postopno višanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) bakterije na določen antibiotik skozi čas. Pridobljena visoko stopenjska ali absolutna odpornost nastopi, ko se med terapijo ali po njej poveča MIK prej občutljivega izolata na nivo, ki ga s terapevtskimi dozami ne moremo doseči. Mehanizmi tega pojava še niso popolnoma razjasnjeni. V primeru MRSA gre za pridobljeno odpornost proti meticilinu (Haddadin in sod., 2002; Seme, 2002).

#### 2.2.1.2 Meticilin

Meticilin je baktericidni, betalaktamski antibiotik, odporen proti penicilinazi. Penicilinaza je encim, ki ga izloča velika večina izolatov *S. aureus* in lahko prepreči učinek penicilina. Betalaktamski antibiotiki se vežejo na encime, ki sodelujejo pri zamreževanju peptidoglikana in jih s tem inaktivirajo. Te encime imenujemo tudi penicilin vezoče beljakovine (PBP, iz angl.: penicillin binding proteins) (Seme, 2002).

Kot prvi polsintetski antibiotik, odporen proti penicilinazam, so meticilin začeli uporabljati leta 1959. Kmalu zatem so se začeli pojavljati prvi odporni sevi, ki so dobili ime MRSA (Duckworth, 2003; Pérez-Roth in sod., 2001). Odpornost proti meticilinu se je hitro širila, prav tako pa tudi odpornost proti drugim betalaktamskim antibiotikom (Haddadin in sod., 2002).

### 2.2.1.3 Gen *mecA*

Za odpornost *S. aureus* proti meticilinu je odgovoren kromosomski gen *mecA*, ki kodira dodatno PBP beljakovino, PBP2a, z manjšo afiniteto za betalaktame. Ob prisotnosti betalaktamskih antibiotikov funkcijo sinteze celične stene prevzamejo beljakovine PBP2a in s tem bakterijam omogočajo preživetje (Chambers, 1997; Seme, 2002).

Izvor gena *mecA* zaenkrat še ni znan. Ker med občutljivimi sevi niso našli nobenega homolognega gena, domnevajo, da izvira iz druge vrste (Crisostomo in sod., 2001). Možen izvor gena *mecA* je koagulaza negativen *Staphylococcus sciuri*, saj vsebuje homolog tega gena, ki se s produktom *mecA* pri MRSA ujema v 88 % aminokislin (Chambers, 1997).

Pri večini sevov je gen *mecA* relativno stabilen. Njegovo izražanje, ki je visoko variabilno, je odvisno od pogojev okolja in drugih genetskih faktorjev (Ahmadinejad in sod., 1998).

21-60 kb velik mobilni genetski element, na katerem se gen *mecA* nahaja, imenujemo stafilokokna kromosomska kasetta (SCC*mec*, iz angl. staphylococcal cassette chromosome *mec*). Vključena je na specifično mesto v kromosomu MSSA, na 3' koncu pri *S. aureus* visoko ohranjenega odprtega bralnega okvirja neznane funkcije (Wielders in sod., 2002; Huletsky in sod., 2004). Poleg *mecA* kompleksa vsebuje SCC*mec* še regulatorni lokus za kontrolo transkripcije gena *mecA* - *mecRI-mecI*, ter posebno insercijsko sekvenco, ki je potencialno mesto integracij nesorodnih determinant odpornosti (Chambers, 1997; Haddadin in sod., 2002). Dodatna genska elementa kasete SCC*mec* sta na primer *Tn554*, ki kodira odpornost

proti makrolidom, klindamicinu in streptograminu B, ter *pT181*, ki nosi zapis za odpornost proti tetraciklinu (Maltezou in Giamarellou, 2006).

Poznamo pet tipov *SCCmec* elementa. Med bolnišničnimi sevi MRSA prevladujejo tipi I, II in III. *SCCmec* tipa IV in V ter različico  $V_T$  najdemo zlasti med sevi MRSA domačega okolja (CA-MRSA, iz angl.: community-acquired MRSA) (Boyle-Vavra in sod., 2005). *SCCmec* tipa IV in V sta manjša od ostalih *SCCmec* elementov in tudi bolj mobilna. Njuno genetsko ozadje je bolj raznoliko, kar je lahko posledica pogostejšega prenašanja. Za razliko od bolnišničnih sevov MRSA ne nosita dodatnih genov za odpornost (Lowy, 2003; Boyle-Vavra in Daum, 2007).

#### 2.2.1.4 Izražanje odpornosti proti meticilinu

Pri *S. aureus* se odpornost proti meticilinu izraža na dva načina; najpogosteje kot heterogeni, redkeje pa kot homogeni fenotip. Na fenotip izražanja odpornosti proti meticilinu ima poleg okolja velik vpliv tudi genetsko ozadje. Kromosomski geni locirani na ali izven *SCCmec* kasete določajo, ali bo sev homogen ali heterogen glede na vzorec odpornosti. Pomembno vlogo imajo predvsem regulatorni geni *mecR1-mecI* (Katayama in sod., 2005). Za ekspresijo odpornosti so deloma odgovorni tudi ostali kromosomski geni. Med temi so najpomembnejši geni *fem*. So del celičnega metabolizma peptidoglikana in lahko regulirajo stopnjo odpornosti brez spreminjanja stopenj PBP2a (Haddadin in sod., 2002).

V primeru heterogenega fenotipa izražanja odpornosti se, kljub genetskemu potencialu, fenotip odpornosti izraža le pri eni izmed  $10^2$ – $10^8$  bakterij (Haddadin in sod., 2002; Chambers, 1997). Stopnja odpornosti je odvisna od pogojev rasti, kot sta temperatura in ozmolarnost medija. Mehanizem heterogenosti je zaenkrat slabo poznan. Domnevajo, da je ključnega pomena interakcija med PBP2a in produkti različnih genov. Eden teh genov je tudi gen *fem* (Sakoulas in sod., 2001). Če sev MRSA s heterogenim tipom odpornosti izpostavimo meticilinu ali podobnemu betalaktamskemu antibiotiku, bo prišlo do selekcije visoko odpornih

bakterij v populaciji, posledično pa se bo razvila homogena populacija visoko odpornih bakterij (Chambers 1997; Sakoulas in sod., 2001).

Določeno stopnjo odpornosti proti meticilinu lahko opazimo tudi pri nekaterih izolatih *S. aureus*, ki ne vsebujejo gena *mecA*. Govorimo o sevih z mejno odpornostjo (BORSA, iz angl.: borderline resistant strain). Značilno za BORSA je, da imajo MIK na mejni točki (iz angl.: break-point) ali rahlo višji (Chambers in sod., 1997). Domnevajo, da niso zelo razširjeni, epidemiološko pa nimajo večjega pomena. Mehanizmi odpornosti pri sevih BORSA še niso natančno raziskani. Možni so prekomerna tvorba betalaktamaz, tvorba modificiranih PBPjev (razen PBP2a), tvorba encimov za inaktivacijo meticilina ali pa gre za do zdaj še neodkrite mehanizme (Kohner in sod., 1999; Skov in sod., 1999).

Za razliko od BORSA najdemo tudi manjši delež izolatov, ki kljub genu *mecA* kažejo fenotipsko občutljivost za meticilin. To so skrajno heterorezistentni izolati (Sakoulas in sod., 2001).

## **2.2.2 Odpornost proti glikopeptidom**

Z leti je število okužb z MRSA naraščalo, s tem pa tudi uporaba glikopeptidnih antibiotikov, predvsem vankomicina in teikoplanina. Pridobljena odpornost proti glikopeptidom je bila prvič opisana pri enterokokih, leta 1989. Leta 1997 se je pojavil sev MRSA z zmanjšano občutljivostjo na vankomicin (VISA, iz angl.: vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*). Čeprav enterokoki in MRSA živijo v istem habitatu in so prenos gena za odpornost že prikazali v *in vitro* pogojih, so šele leta 2002 poročali o prvem sevu MRSA, odpornem proti vankomicinu (VRSA, iz angl.: vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*). Mehanizmi odpornosti pri VRSA in VISA niso enaki in so zaenkrat zelo slabo preučeni (Brown in sod., 2005).

## 2.3 MRSA DOMAČEGA OKOLJA

Dolgo časa je prevladovalo mnenje, da so MRSA zgolj bolnišnične bakterije. V zadnjih letih pa je postalo jasno, da se vedno pogosteje pojavljajo tudi v domačem okolju, pri sicer zdravih posameznikih brez značilnih dejavnikov tveganja. Te seve imenujemo MRSA domačega okolja (CA-MRSA) (Lu in sod., 2005; Maltezou in Giamarellou, 2006). CA-MRSA so danes razširjeni po vsem svetu, ponekod v ZDA pa že dosegajo epidemične razsežnosti. Največ primerov so opazili pri sicer zdravih otrocih in mlajših odraslih, pojavljajo pa se tudi pri skupinah športnikov, vojakov, brezdomcev in pri drugih tesno povezanih skupinah (Wijaya in sod., 2006; Maltezou in Giamarellou, 2006). Čeprav najpogosteje povzročajo okužbe kože in mehkega tkiva, lahko povzročijo tudi zelo invazivne in hitro napredujoče smrtno nevarne bolezni, kot so nekrozantna pljučnica, sepsa in nekrozantni fasciitis (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

Sprva so domnevali, da so se sevi CA-MRSA razvili iz bolnišničnih sevov MRSA (HA-MRSA, iz angl.: hospital-acquired MRSA). Vendar pa občutljivost sevov CA-MRSA za nebetalaktamske antibiotike in klinični sindromi bolj tipični za MSSA kažejo na to, da so se razvili ločeno. Z genotipizacijo so odkrili, da so se CA-MRSA razvili iz MSSA domačega okolja in ne iz HA-MRSA (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

CA-MRSA se od HA-MRSA razlikujejo tudi po tipu *SCCmec* elementa. Večina CA-MRSA izolatov vsebuje *SCCmec* tipa IV, redkeje pa tudi tip V oziroma njegovo različico  $V_T$ , medtem ko večina bolnišničnih izolatov vsebuje *SCCmec* tipe od I do III. *SCCmec* tipi IV, V in  $V_T$  ne vsebujejo dodatnih odpornostnih genov kakor *SCCmec* tipi I, II in III ter so manjši in se lažje prenašajo (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

Druga pomembna značilnost, ki loči CA-MRSA od HA-MRSA, je prisotnost *pvl* genov, ki nosijo zapis za Panton-Valentine leukocidin (PVL). PVL je toksin, ki uničuje levkocite in posledično povzroči nekrozo tkiva (Maltezou in Giamarellou, 2006). PVL lokus se pojavlja

predvsem med elementi *SCCmec* IV in redkeje pri *SCCmec* tipu V oziroma  $V_T$ . Domnevajo, da je prišlo do vključitve *SCCmec* elementa v seve MSSA, ki so že vsebovali gene *pvl* (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

## 2.4 VIRULENCA MRSA IN DEJAVNIKI TVEGANJA

### 2.4.1 Virulenca MRSA

Pojavlja se vprašanje ali so sevi MRSA enako ali bolj virulentni kakor sevi MSSA. Mnogi namreč opisujejo višjo obolevnost in smrtnost bolnikov z okužbo z MRSA v primerjavi z okužbami z MSSA. Prav tako so opazili višjo stopnjo smrtnosti pri bolnikih z MRSA bakteriemijo kakor pri bolnikih z MSSA bakteriemijo. Vendar je to verjetno posledica neustreznega začetka zdravljenja in slabšega delovanja vankomicina v primerjavi z drugimi proti-stafilokoknimi antibiotiki. Zaenkrat še ni dokazov, da bi bili bolnišnični sevi MRSA bolj virulentni od sevov MSSA (Davis in sod., 2004; Cosgrove in sod., 2003; Haddadin in sod., 2002). Nasprotno pa je MRSA domačega okolja lahko bolj virulentna od MSSA, predvsem zaradi dodatnega virulentnega faktorja PVL (Boyle-Vavra in Daum, 2007).

### 2.4.2 Dejavniki tveganja

Dejavniki tveganja za okužbo z MRSA se razlikujejo glede na to, ali gre za bolnišnično okužbo ali za okužbo v domačem okolju. Za bolnišnično pridobljeno okužbo z MRSA so pomembni dejavniki tveganja predhodna hospitalizacija, dolžina hospitalizacije, bivanje na oddelku za intenzivno nego, kronične bolezni, predhodno ali dolgotrajno protimikrobno zdravljenje, prisotnost in velikost ran ter izpostavljenost koloniziranim ali okuženim bolnikom (Haddadin in sod., 2002). Dodatni dejavniki tveganja so še dolgotrajna intubacija in mehanska ventilacija pri kritično bolnih bolnikih, pogosta uporaba intravenoznih naprav, npr. pri bolnikih z boleznimi ledvic, onkološkimi in hematološkimi težavami (Vannuffel in sod., 1998;

Wyllie in sod., 2005). Najbolj izpostavljeni bolnišnični oddelki so oddelki za intenzivno nego, opeklino, transplantacije, kardiologijo, ortopedijo, trauma, kirurgija in nekateri drugi (Coia in sod., 2006). Posebej veliko tveganje za okužbo z MRSA je na oddelkih, kjer se nahajajo imunsko oslabljeni ljudje in bolniki z resnimi zdravstvenimi težavami, zaradi česar so še posebej občutljivi za okužbo (Haddadin in sod., 2002).

V Sloveniji in drugih evropskih državah je opaziti tudi povezavo kolonizacije z MRSA s spolom in starostjo. Podatki kažejo, da so pri moških bolj pogosto osamili MRSA kakor pri ženskah. Prav tako pogostost osamitve MRSA narašča s starostjo posameznikov (EARSS..., 2005; Tiemersma in sod., 2004).

## 2.5 EVOLUCIJA MRSA

Na pojav in globalno širjenje MRSA lahko gledamo kot na proces pospešene evolucije, ki je potekal v sodobnem kliničnem okolju. V zelo kratkem obdobju štirih desetletij so se sevi MRSA uspešno razširili na vse konce sveta (Crisostomo in sod., 2001).

O evolucijskem izvoru sevov MRSA obstajata dve hipotezi. Prva je hipoteza enega klona. Po tej hipotezi naj bi bil prenos gena *mecA* v *S. aureus* le enkrat dogodek v zgodovini. Ta edini klon MRSA naj bi se nato razširil po vsem svetu. Po drugi hipotezi pa naj bi do horizontalnega prenosa gena *mecA* v prekursorske, filogenetsko podobne seve MSSA prišlo večkrat. Wielders in sod. (2002) so v svoji raziskavi preučevali sorodstveno razmerje med izolati MRSA in MSSA iz različnih lokacij. Ugotovili so, da imajo kloni MRSA svoje dvojnike med MSSA kloni. Rezultati podpirajo teorijo, da je v zgodovini večkrat prišlo do horizontalnega prenosa gena *mecA* v *S. aureus*, in sicer v vsaj 8 stalnih linij. Seleksijski pritisk zaradi uporabe antibiotikov pa je pripomogel k širjenju bolj odpornih klonov.

Odpornost *S. aureus* proti protimikrobnim sredstvom se je razvila kmalu po začetku razširjene uporabe penicilina v 1940ih (Kuehnert in sod., 2005). Do leta 1948 je bilo približno 60 % bolnišničnih sevov odpornih proti penicilinu. V 1940ih in 1950ih so uvajali številne nove antibiotike, vendar so bakterije hitro razvile mehanizme odpornosti. Konec 1950ih je bila večkratna odpornost že precej razširjena (Cooper in sod., 2003). Potem so leta 1960 uvedli meticilin, leto kasneje pa so v Veliki Britaniji že izolirali prvi izolat MRSA v Evropi (Cooper in sod., 2003; Crisostomo in sod., 2001; Duckworth, 2003). Sevi MRSA so se začeli širiti po vsem svetu. V 1970ih je incidenca MRSA začela upadati, konec 1970ih pa ponovno naraščati in v večini držav po svetu še vedno narašča (Cooper in sod., 2003; Fang in Hedin, 2003). Zaradi selekcijskega pritiska, ki ga je povzročila uporaba velikih količin različnih antibiotikov, so sevi MRSA pridobivali vedno večje število mehanizmov odpornosti (Crisostomo in sod., 2001).

## 2.6 EPIDEMIOLOGIJA MRSA

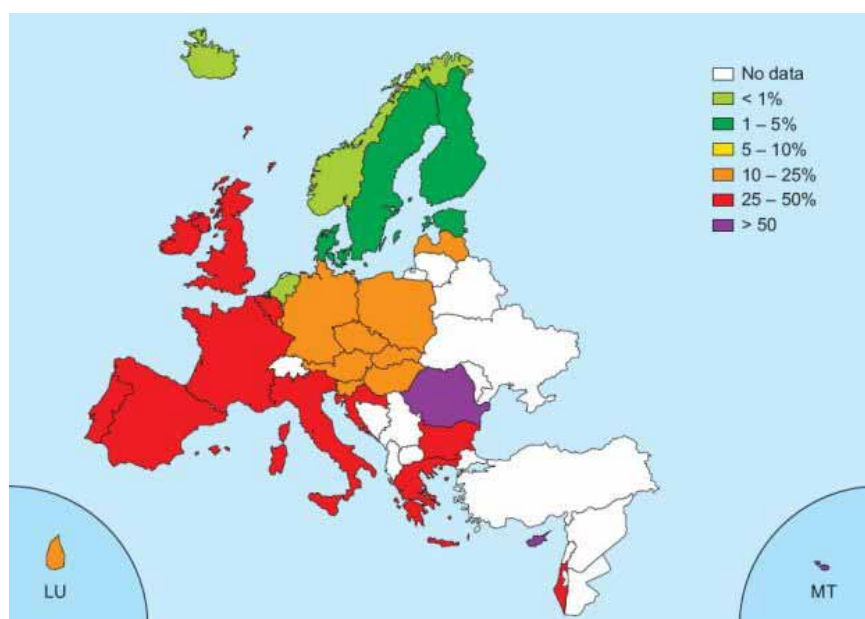
Mnoga področja na svetu, vključno z Evropo, Severno Ameriko ter velikim delom Avstralije in Azije se trenutno soočajo z naraščajočimi stopnjami okužb z MRSA. Resnična razširjenost MRSA ni znana, saj številnih asimptomatskih nosilcev nikoli ne odkrijemo. Sicer kolonizacija le pri majhnem deležu preide v okužbo, vendar pa ti nosilci predstavljajo velik rezervoar za širjenje MRSA (Gould, 2005).

Prevalenca MRSA med državami in tudi znotraj samih držav močno niha (Gould, 2005). V večini predelov sveta je prevalenca MRSA dosegla endemično stanje (Nilsson in sod., 2005). V Evropi delež MRSA variira od 30 % do 40 % na jugu in manj kot 1 % v nekaterih severnih državah, kjer so že zgodaj začeli s programi za kontrolo okužb z MRSA (Chaix in sod., 1999; Fang in Hedin, 2003). V večini evropskih držav se je delež invazivnih izolatov MRSA iz hemokultur od leta 1999 do 2002 precej zvišal. Ravno nasprotno pa se je delež invazivnih izolatov MRSA iz hemokultur v Sloveniji drastično znižal in sicer iz 21 % leta 2000 na 12 %



leta 2004. Podoben pojav so opazili tudi v Franciji. Na upad MRSA v Sloveniji so verjetno imeli vpliv državni ukrepi kontrole okužbe (EARSS..., 2005; Tiemersma in sod., 2004).

V Sloveniji so najbolj prizadeti oddelki s povišanim tveganjem, predvsem oddelek za intenzivno nego in kirurški oddelki, podobno pa velja tudi za druge države (EARSS..., 2005; Tiemersma in sod., 2004).



Slika 1: Delež invazivnih izolatov MRSA iz hemokultur v Evropi leta 2005 (EARSS..., 2005)

Zaradi uporabe neprimernih antibiotikov je zdravljenje bolnikov okuženih z MRSA pogosto neuspešno. Posledično tovrstne okužbe spremlja tudi podaljšano bivanje v bolnišnici ter višji stopnji obolevnosti in smrtnosti. Poleg tega so antibiotiki, ki še delujejo proti MRSA, pogosto bolj toksični od tistih, ki jih uporabljajo pri okužbah z MSSA (Gould, 2005).

## 2.7 NADZOR OKUŽBE Z MRSA

Mnoge države imajo različne programe za nadzor MRSA. Pomembno vprašanje, ki se zadnje čase vse pogosteje pojavlja, je, ali je nadzor MRSA sploh smiseln in če je, v kakšnem obsegu se ga splača izvajati. Rezervoar za MRSA se povečuje, saj se mnogo bolnikov, ki so že bili kolonizirani ali okuženi z MRSA, vrača v bolnišnice. Izkoreninjenje MRSA iz nekega oddelka je zelo težavno, če ne nemogoče. Učinkovite strategije nadzora so povezane tudi z velikimi stroški (Rubinovitch in Pittet, 2001). Danes je MRSA endemična v večini bolnišnic v razvitem svetu (Haddadin in sod., 2002).

Drugo pomembno področje, ki je močno povezano z nadzorom MRSA, je kontrola širjenja okužb z MRSA (Warren in sod., 2004). Prenos MRSA znotraj ali med zdravstvenimi ustanovami je težko kontrolirati kljub natančnim kontrolnim mehanizmom. Tako okuženi kot tudi kolonizirani bolniki služijo kot rezervoar za širjenje MRSA (Elsayed in sod., 2003). Danes je v uporabi kar nekaj različnih strategij za zaustavitev nadaljnjega širjenja MRSA. Najprej bi se morali posvetiti odkrivanju nosilcev MRSA (Kluytmans in sod., 1997).

Testiranje bolnikov je smotno, če mu sledi osamitev MRSA-pozitivnih bolnikov in je pri mejnih primerih tudi cenovno učinkovito. Testiranje osebja pa nasprotno nima velike vrednosti, poleg tega je tudi cenovno neučinkovito. Pomembno se je odločiti, ali bomo testirali vse bolnike ob sprejemu v bolnišnico ali pa le bolj ogrožene skupine. V drugem primeru je potrebno natančno določiti skupine z večjim tveganjem (Haddadin in sod., 2002). Wernitz in sod. (2005b) so izvedli kohortno raziskavo, katere namen je bil ugotoviti, ali lahko nadzorno testiranje skupin z definiranim tveganjem za nosilstvo MRSA v kombinaciji s preventivno kontaktno izolacijo ob sprejemu v bolnišnico prepreči bolnišnično pridobljene okužbe z MRSA. Rezultati so pokazali, da je selektivno nadzorno testiranje učinkovito pri zmanjševanju števila okužb z MRSA tudi v bolnišnicah, kjer je MRSA endemična, njena prevalenca pa narašča. Potrdili so, da zgodnja identifikacija nosilcev MRSA in preventivna

osamitev zmanjšata število prenosov na druge bolnike. Ker je nadzor vseh bolnikov predrag, se splača definirati skupino z večjim tveganjem.

Wernitz in sod. (2005a) so istega leta izvedli še raziskavo z analizo stroškov selektivnega nadzornega programa za identifikacijo potencialnih nosilcev MRSA ob sprejemu v bolnišnico. Ugotovili so, da postane nadzorni program cenovno učinkovit, če preprečijo 2,9 primera bolnišnično pridobljenih okužb z MRSA na leto. Nadzorni program je učinkovit tudi, če je več kot 0,03 % hospitaliziranih bolnikov bilo MRSA-pozitivnih ob sprejemu v bolnišnico, oziroma če je manj kot 13,7 % vseh bolnikov imelo kriterije za vključitev v nadzorno skupino. Večja kot je incidenca MRSA-pozitivnih bolnikov v nadzorni skupini in manjša kot je ta skupina, manjši so stroški. Nadzor vseh bolnikov ob sprejemu bi bil učinkovit, če bi jih vsaj 22 % bilo MRSA-pozitivnih.

Tudi Chaix in sod. (1999) so v svoji raziskavi ugotovili, da je identifikacija MRSA nosilcev v povezavi z njihovo osamitvijo učinkovita strategija, predvsem če jo primerjamo s strategijo brez identifikacije nosilcev ali brez osamitve. Ugotovili so, da na oddelkih s povišanim tveganjem presejalni testi za nosilce MRSA pripomorejo k zmanjšanju kolonizacije in širjenja MRSA.

Da je kontrola okužbe lahko učinkovita so v svoji raziskavi potrdili tudi Rao in sod. (2007). Na urgentnem oddelku bolnišnice so eno leto izvajali neselektivni program testiranja odraslih bolnikov na MRSA. Med drugim so ugotovili, da je v času izvajanja študije število bolnišnično pridobljenih MRSA okužb znatno upadlo, prav tako tudi število MRSA bakteriemij.

Kluytmans (2007) je poudaril pomembnost hitrih diagnostičnih testov za uspešno kontrolo MRSA. S hitrim odkrivanjem MRSA se namreč lahko izognemo nepotrebni preventivni izolaciji nekoloniziranih bolnikov. To je še posebej pomembno tam, kjer je endemičnost MRSA nizka.

Identifikaciji nosilcev MRSA morajo slediti ukrepi za preprečevanje nadaljnega širjenja okužbe. Eden od najbolj preprostih in učinkovitih ukrepov je umivanje rok in uporaba rokavic. Pomembno vlogo pri odstranjevanju okužbe igrajo protimikrobna sredstva. Lahko so lokalna ali sistemska. Učinkovito lokalno sredstvo za preprečevanje kolonizacije z MRSA je mupirocin, vendar so bakterije že razvile mehanizme odpornosti (Haddadin in sod., 2002; Safdar in sod., 2003). Zaradi tega se mupirocin lahko uporablja le krajše časovno obdobje. Uporabljajo ga predvsem za dekolonizacijo nosu (Coia in sod., 2006). Tudi proti sistemskim protimikrobnim sredstvom, kot sta rifampin in fusidna kislina, se že pojavlja odpornost pri MRSA, poleg tega pa imajo ta sredstva pogosto neugodne stranske učinke. Učinkovito je lahko tudi razkuževanje kože s snovmi kot so npr. klorheksidin (Coia in sod., 2006; Haddadin in sod., 2002). Za preprečevanje širjenja okužbe bi bila idealna popolna osamitev bolnikov, vendar to za bolnišnice ponavadi ni praktična rešitev. Ena od variant osamitve je tudi osamitev več bolnikov v eni sobi, z uporabo ovir (Haddadin in sod., 2002). Kadar to ni mogoče, lahko zadovoljiv učinek dosežemo tudi s kontaktno izolacijo MRSA-pozitivnih bolnikov (Warren in sod., 2004).

## 2.8 DIAGNOSTIKA MRSA

### 2.8.1 Pomen diagnostike MRSA

Brown in sod. (2005) so v reviji *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* objavili smernice za laboratorijsko diagnostiko in testiranje občutljivosti za MRSA. V članku priporočajo uporabo klasičnih, dobro uveljavljenih metod. Lateksno aglutinacijo za določanje prisotnosti PBP2a in molekularne metode za odkrivanje gena *mecA* priporočajo le za potrditev dvoumnih rezultatov. Za zlati standard za diagnostiko MRSA veljajo molekularne tehnike določanja gena *mecA* v čisti kulturi *S. aureus*, zlasti verižna reakcija s polimerazo (PCR, iz angl.: polymerase chain reaction) (Chambers, 1997).

Natančna in hitra identifikacija MRSA v kliničnih vzorcih je esencialna za pravočasno izvedbo postopkov osamitve bolnika ter za aplikacijo učinkovitega protimikrobnega zdravljenja (Jonas in sod., 2002). Metode, primerne za odkrivanje MRSA v kliničnih vzorcih, morajo biti visoko specifične in občutljive ter čim hitreje (Diederer in sod., 2005). Kljub napotkom, ki jih je objavil ameriški Nacionalni odbor za standarde kliničnih laboratorijev (iz angl. National committee for clinical laboratory standards) za testiranje občutljivosti za oksacilin za stafilokoke, ostaja optimalna metoda za odkrivanje odpornosti proti meticilinu sporna (Kohner in sod., 1999).

Za diagnostiko MRSA sta pravzaprav pomembni dve stvari. Prva je osamitev sevov *S. aureus*, druga pa testiranje občutljivosti za antibiotike, v tem primeru za meticilin oziroma oksacilin. Danes obstajajo tudi testi, ki omogočajo sočasno detekcijo sevov *S. aureus* in določanje njihove občutljivosti za meticilin (Wichelhaus in sod., 1999).

### **2.8.2 Določanje prisotnosti *S. aureus***

Dostopnih je že veliko različnih diagnostičnih testov za določanje prisotnosti bakterije *S. aureus*. V grobem jih lahko razdelimo na tri skupine in sicer glede na to, ali temeljijo na biokemičnih metodah, metodah lateksne aglutinacije ali na molekularnih metodah (Jaffe in sod., 2000; Brown in sod., 2005). Pomemben sestavni del mnogih testov so selektivna gojišča (Jonas in sod., 2002). Posledično je večina metod za identifikacijo MRSA precej dolgotrajnih, saj rezultate dobimo šele po 48 do 96 urah. Ker je hitrost testa zelo pomembna za pravočasen začetek primerne zdravljenja z antibiotiki in izvajanja ukrepov za preprečevanje širjenja MRSA, so si znanstveniki zelo prizadevali najti način za skrajšanje trajanja testa. V zadnjem času je tako bilo opisanih že kar nekaj hitrih tehnik. Te metode so ponavadi zelo občutljive, vendar pa imajo mnoge težave pri razlikovanju med MRSA in proti meticilinu odpornimi CNS. Zaradi tega je še vedno potrebna predhodna gojitev bakterij, kar pa časovni interval do rezultatov nekoliko podaljša (Warren in sod., 2004).

### 2.8.2.1 Biokemijske metode identifikacije *S. aureus*

Biokemijske metode identifikacije *S. aureus* temeljijo na značilnih fenotipskih lastnostih izolata. Pomembne značilnosti so morfologija celic in kolonij, tip hemolize na krvnem agarju, rast na selektivnem mediju, prisotnost DNAze, katalaze, koagulaze, ter mnoge druge. Biokemijske metode so cenovno učinkovite in preproste za izvedbo. Negativna stran pa je njihova počasnost in pogosto pojavljanje tako lažno pozitivnih kot tudi lažno negativnih rezultatov (Brooks in sod., 2001; Smyth in sod., 2001).

### 2.8.2.2 Testi lateksne aglutinacije

S testi lateksne aglutinacije lahko učinkovito in hitro ločimo med *S. aureus* in CNS (Brown in sod., 2005). Ključna sestavina testa so lateksni delci z vezanimi antigensko specifičnimi protitelesi. Ob dodatku kliničnega vzorca se protitelesa vežejo na antigene mikroorganizma, pri tem pa poteče reakcija aglutinacije (Brooks in sod., 2001). Zgodnje različice testa lateksne aglutinacije za dokazovanje bakterije *S. aureus* so vsebovale protitelesa proti celično vezani koagulazi in proti površinskemu proteinu A. Pojavil se je problem lažno negativnih rezultatov, saj nekateri sevi te bakterije pogosto izločajo sluz, ki zamaskira površinske antigene. Zaradi tega so razvili nove teste, kjer so tarče kapsularni polisaharidi ter skupinsko specifični površinski antigeni (Griethuysen in sod., 2001).

Na razpolago so že številni komercialni kiti za hitro identifikacijo bakterij *S. aureus*, vendar je pri večini še vedno potrebno naknadno testiranje občutljivosti za antibiotike. Kljub temu je čas, potreben za izvedbo testa, krajši kakor pri klasičnih metodah (Wichelhaus in sod., 1999).

### 2.8.2.3 Molekularni testi

Velika prednost molekularnih testov je njihova neodvisnost od dolgotrajne inkubacije ali izražanja fenotipskih lastnosti. Mnoge oblike zaenkrat še niso praktične za uporabo v rutinskih

kliničnih laboratorijih, predvsem zaradi potrebnega strokovnega znanja ter komplicirane in drage opreme (Kaplan in sod., 2005).

Razvitih je že veliko različnih tehnik odkrivanja *S. aureus* s PCR. Razlikujejo se po protokolu PCR, pa tudi po načinu izolacije DNA. V kliničnem laboratoriju so pogosto potrebni dodatni koraki za lizo celic in odstranitev potencialnih inhibitorjev pomnoževanja. Ti koraki zvišajo stroške in podaljšajo trajanje testa. Poleg tega je pri večini molekularnih testov potrebna čista bakterijska kultura, kar časovni interval spet podaljša (Jaffe in sod., 2000).

Za genske markerje se uporabljajo različni geni, specifični za *S. aureus*. Pogosto se v ta namen uporablja gen *nuc*, ki kodira za *S. aureus* specifično termonukleazo (Becker in sod., 2006). Primeren je tudi gen *femB*, ki kodira encim, pomemben pri navzkrižnem povezovanju peptidoglikana (Jonas in sod., 2002). Drugi možni genski markerji, specifični za *S. aureus*, so še geni *femA*, gen za koagulazo *coa*, gen *spa*, ki kodira protein A, geni *Sa442*, 16S rRNA in geni za površinske fibrinogen vezoče beljakovine (Brown in sod., 2005).

### **2.8.3 Določanje odpornosti *S. aureus* proti meticilinu**

Dokazu prisotnosti *S. aureus* v kužnini ponavadi sledi testiranje občutljivosti za antibiotike, od katerih je najpomembnejši meticilin. Testiranje občutljivosti za antibiotike je težavno, saj je odvisno od natančne kontrole testnih pogojev (Kearns in sod., 1999). Noben posamezen skupek testnih pogojev pa ni primeren za odkrivanje vseh sevov MRSA (Brown in sod., 2005; Swenson in sod., 2001). Tako kot pri odkrivanju prisotnosti *S. aureus* tudi pri določanju odpornosti proti meticilinu obstaja več različnih metod. V grobem jih lahko razdelimo na tri skupine: biokemijske metode, metode lateksne aglutinacije in molekularne metode (Brown in sod., 2005).

### 2.8.3.1 Biokemijske metode

Gojitvene metode določanja občutljivosti za antibiotike temeljijo na fenotipskih lastnostih, ki so posledica odpornosti. Izražanje odpornosti je v veliki meri odvisno od različnih *in vitro* pogojev, kot so sestavine testa, gojišče, temperatura in koncentracija NaCl. Za testiranje občutljivosti se je na začetku uporabljal meticilin. Ker pa danes meticilina ne proizvajajo več, ga je nadomestil oksacilin ali v novejših testih cefoksitin (Brown in sod., 2005).

V rutinskih laboratorijih se za testiranje odpornosti uporabljajo difuzijski in dilucijski antibiogrami. S temi metodami dobimo rezultate po približno dveh dneh, pri heterorezistentnih sevih pa je pogosto potrebna še podaljšana inkubacija (Brown in sod., 2005)

### 2.8.3.2 Testi lateksne aglutinacije

Testi lateksne aglutinacije omogočajo določanje MRSA z uporabo protiteles proti PBP2a, ki so vezana na lateksne delce. Ob prisotnosti beljakovine PBP2a pride do reakcije aglutinacije. Test je hiter in enostaven za uporabo ter zaradi tega primeren za klinične rutinske laboratorije (Brown in sod., 2005). Eden takih testov je tudi MRSA-screen latex agglutination test (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan). Sakoulas in sodelavci (2001) so v svoji raziskavi prikazali občutljivost 100 % in specifičnost 99,1 %.

### 2.8.3.3 Molekularni testi

Dokazovanje gena *mecA* s PCR je referenčna metoda za ugotavljanje odpornosti proti meticilinu. Za razliko od gojitvenih metod lahko z molekularnimi metodami učinkovito ločimo med sevi MRSA in BORSA. Prav tako nam omogočajo tudi odkrivanje tistih sevov, ki nosijo gen *mecA*, a ne izražajo fenotipa odpornosti (Brown in sod., 2005).



#### 2.8.4 Verižna reakcija s polimerazo

PCR je hitra in enostavna metoda za pomnoževanje neomejenega števila kopij kateregakoli fragmenta DNA. Za reakcijo potrebujemo osnovno DNA ali RNA molekulo, katere del želimo pomnožiti, in molekule dveh začetnih oligonukleotidov. Začetni oligonukleotidi so kratka, specifična zaporedja nukleotidov, komplementarna nukleotidnim sekvencam na vsaki strani fragmenta DNA ali RNA, ki ga želimo pomnožiti. Pod ustreznimi pogoji se specifično vežejo na ta zaporedja (Powledge, 2004).

PCR sestoji iz treh glavnih korakov:

- denaturacija tarčnega genetskega materiala, kar dosežemo s segrevanjem na 90-96 °C
- vezava začetnih oligonukleotidov na komplementarna mesta zdaj enovijačne DNA poteka pri 45-65 °C
- DNA sinteza s termostabilno polimerazo poteka pri 72-80 °C

Dobimo nov heliks dvovijačne DNA, ki je zdaj v dveh kopijah. Celoten proces ponovimo od začetka in ga ponavljamo tako dolgo, dokler ne dobimo dovolj velikega števila kopij (Powledge, 2004).

Za polimerazo uporabljamo Taq polimerazo, saj lahko za razliko od drugih polimeraz svoje delo opravlja pri visokih temperaturah, potrebnih za pravilen potek reakcije. Izolirali so jo iz bakterije, ki naseljuje termalne vrelece, *Thermus aquaticus* (Powledge, 2004).

Obstaja veliko različic PCR, vendar je za potrebe našega dela pomembna le ena – večkratni PCR. Večkratni PCR je ena od različic PCR, pri kateri hkrati pomnožujemo dva ali več lokusov v isti reakciji. Prvič so ta način opisali leta 1988, od takrat pa se je uspešno prilagodil številnim področjem testiranja DNA. V reakciji je vključenih več parov začetnih oligonukleotidov (Henegariu in sod., 1997).

Že na enojni PCR vplivajo mnogi dejavniki, na večkratni PCR pa še v toliko večji meri. V literaturi se pogosto pojavljajo poročila o problemih z inhibicijo PCR. Inhibitorno bi naj delovala kri in urin, predvsem pa hem in njegovi metabolni produkti, polianetolesulfonična kislina, kisli polisaharidi, človeški plazemski imunoglobulin in laktoferin (Louie in sod., 2002). Posledica inhibicije pomnoževanja je lažno negativen rezultat. Rešitev tega problema je preprosta; omogočiti moramo detekcijo gena, ki je vedno prisoten, ali ga celo sami dodamo. Ta gen imenujemo notranja kontrola in če ne pride do pomnoževanja notranje kontrole, takoj vemo, da do pomnoževanja sploh ni prišlo zaradi inhibicije. Geni, ki se pri identifikaciji MRSA v ta namen najpogosteje uporabljajo, so *nuc*, *coa* in *gyrA*. Alternativna notranja kontrola je lahko tudi gen za 16S rRNA (Brown in sod., 2005).

Čeprav molekularni testi pomenijo izboljšavo v diagnostiki MRSA, pa imajo vseeno nekatere pomanjkljivosti. Pri PCR je največja težava možnost kontaminacije med delom. Učinkovita rešitev je uporaba ločenih delovnih površin in prostorov za delo pred reakcijo PCR, ločen prostor, v katerem poteka PCR in prostor za delo po končani PCR reakciji (Elsayed in sod., 2003).

Kljub učinkovitosti PCR tehnik, veliko oviro za splošno uporabo še vedno predstavlja dostopnost in cena specializirane opreme, strokovna usposobljenost in še vedno predolgo trajanje testov (Whalley in sod., 2000).

### **2.8.5 Hibridizacija nukleinskih kislin**

Hibridizacija nukleinskih kislin ali renaturacija pomeni ponovno povezovanje komplementarnih enovijačnih verig nukleinskih kislin, sonde in tarče. Sonde ponavadi predstavljajo homogeno populacijo znanih molekul, tarče pa kompleksne, heterogene populacije molekul nukleinskih kislin. Če je sonda ali tarča prvotno dvovijačna, moramo najprej verige med seboj ločiti, ponavadi pod vplivom vročine ali alkaličnih sredstev. Ko zmešamo enovijačne sonde z enovijačnimi tarčami, se ob ustreznih pogojih verige s

komplementarnimi baznimi pari med seboj ponovno povežejo. Če se med seboj povežejo tarče ali sonde, dobimo homoduplekse, če pa se povežejo tarče s sondami, pa heteroduplekse. Ravno zaradi heterodupleksov so hibridizacijske tehnike tako uporabne (Strachan in Read, 1999).

V uporabi je veliko različic hibridizacije nukleinskih kislin. Pri prvih testih je reakcija potekala v tekočini, tako da so zmešali enak volumen tarče s sondo. Kasneje so ugotovili, da lahko hitrost vezave precej povečamo, če tarčno DNA imobiliziramo na trdno površino, kot je npr. membrana iz najlona ali nitroceluloze. Ne dolgo nazaj so začeli uporabljati metodo reverzne hibridizacije, kjer so sonde vezane na nosilec. Pri tem tarčna DNA predstavlja nedefinirano, heterogeno populacijo DNA, medtem ko je molekularna sestava sonde poznana in razišče tarčno populacijo DNA (Strachan in Read, 1999).

V našem primeru imamo označeno tarčno DNA, saj so bili z biotinom označeni že začetni oligonukleotidi pri pomnoževanju. Ko so se produkti vezali na sonde, ki so bile imobilizirane na trakovih, so nastali označeni kompleksi. Ob dodatku konjugata in substrata se je prikazala barvna reakcija.

### **2.8.6 Molekularne metode za določanje MRSA**

Hitra in natančna identifikacija MRSA v kliničnih vzorcih je velikega pomena za zdravljenje in pravilno obravnavo koloniziranih ali okuženih bolnikov. Čeprav obstaja tudi nekaj hitrih testov, ki temeljijo na gojitvenih metodah, encimskih tehnikah ali lateksni aglutinaciji, se bomo tu omejili na molekularne teste. Opisani so bili že številni molekularni pristopi, ki skrajšajo čas identifikacije MRSA (Louie in sod., 2000).

Odkritje gena *mecA* še ne pomeni, da smo odkrili MRSA, saj ta gen pogosto vsebujejo tudi predstavniki CNS. Molekularni testi, ki so danes na voljo, večinoma temeljijo na odkrivanju gena, specifičnega za *S. aureus* in gena *mecA*. Problem pri neposrednem večkratnem PCR se

pojavi, ker lahko *S. aureus* in proti meticilinu odporni CNS naseljujejo iste habitate in lahko povzročajo sočasno kolonizacijo oziroma okužbo. Kadar testiramo čiste bakterijske kulture, to nima velikega pomena, če pa izvajamo večkratni PCR neposredno iz kužnine, se teoretično lahko pojavijo lažno pozitivni rezultati (Huletsky in sod., 2004; Becker in sod., 2006).

V literaturi je opisanih več različnih hitrih molekularnih testov za ugotavljanje prisotnosti MRSA. Večinoma je potrebna predbogatitev na različnih bogatitvenih gojiščih. V tem koraku se izvede tudi delna selekcija (Huletsky in sod., 2004). Hain-Lifescience (Nehren, Nemčija) je poleg testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct razvil tudi test GenoType<sup>®</sup>MRSA, pri katerem je potrebna predhodna gojitev na krvnem agarju (Hain.Lifescience..., 2002). Tudi Jonas s sod. (2002) v svoji raziskavi predstavlja uporabo molekularnih tehnik, v tem primeru dvojnega PCR, po predhodni inkubaciji na selektivnem bogatitvenem gojišču. Podobnega principa sta se za svoj presejalni test poslužila tudi Fang in Hedin (2003), le da sta izvedla PCR v realnem času. Uporabila sta selektivni bogatitveni bujon, ki favorizira rast MRSA. Dvojni PCR v realnem času so preizkusili tudi Elsayed in sod. (2003), vendar so najprej *S. aureus* z gojitvenimi tehnikami izolirali iz kužnine. Schuenck in sod. (2006) so v svoji raziskavi uporabili selektivno gojišče in večkratni PCR za hitro detekcijo nosilcev MRSA v nosu. Nekateri hitri molekularni testi omogočajo delno avtomatizacijo, kar je velika prednost, saj se zmanjša možnost kontaminacije (Grisold in sod., 2002).

Pri vseh zgoraj omenjenih testih je ključnega pomena, da predhodno izvedemo vsaj bogatitev, če ne tudi izolacije *S. aureus* iz kužnine. Nekateri testi zahtevajo čiste kulture, medtem ko drugim zadostuje že predobogatitev v selektivnem bujonu. Čeprav rezultate dobimo prej kakor s klasičnimi metodami, torej 2-5 ur po končani gojitvi, sama gojitev oziroma bogatitev vzame precej časa. Tukaj imajo veliko prednost neposredni testi, ki omogočajo hitro identifikacijo MRSA neposredno iz kužnine in podajo rezultate že 4-6 ur po odvzemu kužnin (Brown in sod., 2005; Fang in Hedin, 2003; Huletsky in sod., 2004).

V literaturi zasledimo tudi opise molekularnih testov, ki temeljijo na metodi hibridizacije. Nekateri uporabljajo hibridizacijo kot samostojno metodo, drugi pa v kombinaciji s PCR. Tudi ti testi se razlikujejo po tem, ali so neposredni ali pa je potrebna bogatitev. Enega od posrednih hibridizacijskih testov za odkrivanje MRSA so opisali Skov in sod. (1999). S pomočjo hibridizacije so pri *S. aureus* odkrivali gena *mecA* in *nuc*, kar jim je omogočilo hitro in natančno odkrivanje MRSA. Kaplan in sod. (2005) so razvili in opisali hibridizacijski test, imenovan Gen-probe (San Diego, California), ki je komercialno dostopen. Vključili so sondo, specifično za rod stafilokokov, drugo specifično za *S. aureus* in tretjo za *mecA* gen. Test je zelo hiter, tudi občutljiv (93,9 %) in specifičen (98,6 %).

V uporabi je tudi nekaj testov, ki so sestavljeni iz kombinacije PCR in hibridizacije. Specifične odseke DNA najprej pomnožimo s PCR, produkte pa nato zaznavamo s hibridizacijo (Krishnan in sod., 2002).

Pri bolnikih s sumom na okužbo z MRSA kot kužnino pogosto uporabijo kri. Posledično so raziskovalci razvili kar nekaj testov za ugotavljanje MRSA iz pozitivnih hemokultur. S pomočjo molekularnih tehnik pridemo do rezultata hitreje kot s klasičnimi metodami, saj jih lahko uporabimo neposredno na hemokulturi (Eigner in sod., 2005; Hallin in sod., 2003; Levi in Towner, 2003; Louie in sod., 2002; Stratidis in sod., 2007).

Najhitrejši in vedno bolj zanimivi so molekularni testi, ki omogočajo dokazovanje MRSA neposredno iz kužnine. Takšen test so opisali Huletsky in sod. (2004). Test temelji na večkratnem PCR v realnem času. Vsebuje več različnih začetnih oligonukleotidov, ki zajamejo vse različice SRE (SRE so specifična zaporedja, ki so locirane skrajno desno na *SCCmec* kromosomski kaseti) in set začetnih oligonukleotidov za specifično sekvenco, ki leži na kromosomu bakterije *S. aureus*. Ugotovili so, da je specifičnost testa višja od 97 %.

Drugi tak test je kvalitativni *in vitro* diagnostični test IDI-MRSA (Infecto Diagnostics, Inc., Sainte-Foy, Quebec, Canada). V prvem koraku pomnožimo MRSA specifične DNA sekvence

s PCR v realnem času. Produkta nato določimo s fluorogeno tarčno hibridizacijo. Tako specifičnost kot občutljivost testa sta nad 90 % (Warren in sod., 2004; Hal in sod., 2007). Zanimivo metodo so v svoji raziskavi opisali Paule in sod. (2004). V prvem koraku so neposredno iz kužnine (brisa nosu) izolirali DNA in izvedli PCR v realnem času na gen *femA*. Vse pozitivne brise so nacepili na plošče in jih inkubirali do naslednjega dneva, nakar so kolonije uporabili za PCR v realnem času na gena *mecA* in *ileS-2*. Test je hiter in zanesljiv (občutljivost 98 % in specifičnost 99 %) ter omogoča hitro identifikacijo negativnih bolnikov.

V to kategorijo testov spada tudi test GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija), ki smo ga preizkusili v okviru tega diplomskega dela. Test je kombinacija večkratnega PCR in hibridizacije, izvaja pa se neposredno na vzorcu kužnine.

### **2.8.7 Presejalno testiranje na MRSA**

Presejalno testiranje na MRSA je ključnega pomena za uspešno zdravljenje in kontrolo širjenja MRSA. Zdravstvenim ustanovam omogoča hitro identifikacijo z MRSA koloniziranih bolnikov (Salgado in Farr, 2006). Testi morajo biti hitri, enostavni, primerni za množično uporabo in cenovno ugodni. Klasične metode presejalnega testiranja zajemajo cepljenje na trda agaraska gojišča. Za boljše rezultate priporočajo uporabo predhodne bogatitve v bogatitvenih bujonih. Večina agaraskih gojišč vsebuje indikator za razločevanje bakterije *S. aureus*, inhibitorne substance, ki pripomorejo k selekciji bakterije *S. aureus* in penicilinski antibiotik v ustrezni koncentraciji – meticilin, oksacilin ali cefoksitin (Brown in sod., 2005; Francois in sod., 2003).

Za uspešno presejalno testiranje je zelo pomembna tudi izbira vzorcev. Priporočena anatomsko mesta za jemanje vzorcev pri bolnikih so nos, žrelo, kožne gube (pazduha in dimlje), kožne razjede in rane, vstopna mesta katetrov ter sputum oziroma aspirat traheje pri intubiranih bolnikih (Coia in sod., 2006).

Za presejalno testiranje nosilcev MRSA je pomembno, da testiramo več anatomskih mest hkrati, drugače bi lahko zgrešili do polovico koloniziranih bolnikov. Najpogosteje so opazili kolonizacijo nosu (43 %), dokaj pogosto pa sta kolonizirana tudi intaktna koža in rektum (Eveillard in sod., 2006). Posameznemu bolniku večinoma odvzamejo 2-5 brisov. Ker obdelava vseh brisov predstavlja velike stroške, so Grmek-Košnik in sod. (2005) izvedli raziskavo, ki je ocenjevala smiselnost združevanja vzorcev. Vzorce posameznega bolnika so združili v en vzorec in jih skupaj nacepili na gojišče. Občutljivost metode je bila nekoliko nižja, prihajalo je tudi do zakasnitve pri rezultatih. Razlog je verjetno razredčenje MRSA, ali pa so jih prerastle druge bakterije.

Ker so klasične tehnike počasne, se na tem področju vedno bolj uveljavljajo molekularne metode. Večina molekularnih testov, ki so jih razvili v zadnjih desetih letih, temelji na večkratnem PCR (iz angl.: multiplex PCR). Test vsebuje začetne oligonukleotide tako za detekcijo gena *mecA* kot tudi za detekcijo gena, specifičnega za *S. aureus*. Za hitrejša rezultate so začeli uporabljati tudi PCR v realnem času. Vendar so te metode v večini primerov uporabne le na čistih kulturah, ali pa je potrebna vsaj predhodna bogatitev. V teh začetnih korakih se že izvede določena stopnja selekcije, a se zaradi tega močno podaljša trajanje testa (Brown in sod., 2005). Hitri presejalni testi omogočajo zgodnjo detekcijo nosilcev MRSA, s tem pa pripomorejo k boljšemu izidu zdravljenja in preprečevanju širjenja okužbe zaradi takojšnje kontaktne izolacije bolnika (Harbarth in sod., 2006).

Da bi skrajšali čas do rezultatov, se mnogi trudijo razviti molekularne teste, ki bi jih lahko izvedli neposredno na vzorcu in predhodna gojitev ali bogatitev ne bi bila potrebna (Brown in sod., 2005).

## 2.9 NAMEN DELA

Proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* povzročajo težave v bolnišnicah po vsem svetu (Crisostomo in sod., 2001). Razen odpornosti proti vsem betalaktamskim antibiotikom pogosto vsebujejo še dodatne mehanizme odpornosti, ki jim omogočijo zaščito pred različnimi skupinami antibiotikov. Zaradi tega je v večini primerov ustrezno zdravljenje mogoče le z antibiotiki glikopeptidnega razreda (Rubinovitch in Pittet, 2001).

Pri diagnostiki MRSA se trenutno najpogosteje uporabljajo klasične metode kultivacije. Kljub temu, da so te metode dobro uveljavljene, cenovno učinkovite in preproste za izvedbo, jih precej omejuje njihova dolgotrajnost (Brown in sod., Warren in sod., 2004). Pri okuženih bolnikih je hitrost identifikacije MRSA zelo pomembna za hiter začetek ustreznega antibiotičnega zdravljenja. Hitra identifikacija MRSA nosilcev pa lahko prepreči nadaljnje širjenje (Jonas in sod., 2002).

V diplomskem delu smo preizkušali učinkovitost in uporabnost molekularnega testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija). Gre za molekularni test, ki omogoča določanje MRSA neposredno iz kužnine in temelji na večkratnem PCR v kombinaciji s hibridizacijo. Test so že ovrednotili v dveh kliničnih laboratorijih. Pri obeh je bila občutljivost testa višja od 93 %, specifičnost testa pa višja od 98 % (Hain-Lifescience..., 2006). V diplomskem delu nas je zanimalo, ali je molekularna metoda za odkrivanje MRSA neposredno iz kužnine enako ali bolj občutljiva od klasične metode kultivacije. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, ali združevanje vzorcev vpliva na občutljivost molekularne metode za odkrivanje MRSA neposredno iz kužnine.



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORCI BOLNIKOV

V delo smo vključili klinične vzorce in vzorce nadzornih kužnin hospitaliziranih bolnikov, ki so znani nosilci MRSA ali so z MRSA okuženi in bolnikov, katerih status glede nosilstva MRSA je neznan. V nadzorni skupini so bili večinoma bolniki oddelka za intenzivno interno medicino. Pri tej skupini se izvaja le kontrola kolonizacije oziroma okužbe z namenom preprečevanja širjenja MRSA. Klinična skupina predstavlja bolnike iz drugih oddelkov bolnišnice, pri katerih obstaja močen sum na okužbo z MRSA, ali pa jim je bila ta okužba že dokazana. Kužnine so bile odvzete bolnikom, hospitaliziranim v Splošni bolnišnici Celje in v Kliničnem centru Ljubljana.

Pri vsakem bolniku sta bila vzporedno odvzeta dva seta vzorcev kužnin. Vzorce iz prvega seta so v rutinskem bakteriološkem laboratoriju Oddelka za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Celje testirali s klasičnimi metodami kultivacije. Pri tem so uporabili kombinacijo neselektivnih in selektivnih gojišč ter predobogatitev. Vzorce drugega seta smo uporabili za izvedbo molekularne metode pomnoževanja nukleinskih kislin in hibridizacije. Testirali smo jih na dva načina – vsakega posebej in z združevanjem posameznih vzorcev odvzetih enemu bolniku v skupni vzorec. Združevanje smo izvedli po koraku izolacije DNA iz vzorcev. Pri nadzornih kužninah je bilo vsakemu bolniku odvzetih več brisov (od dva do pet) in sicer najpogosteje bris nosu, dimelj, pod pazduhe in žrela. Pri kliničnih kužninah so vzorce predstavljali predvsem brisi ran ali aspirati traheje.

Na začetku smo testirali vse odvzete nadzorne kužnine. Ko pa smo nabrali dovolj veliko število negativnih vzorcev za statistično analizo, smo testiranje omejili le na tiste vzorce, ki so bili po klasični metodi detekcije MRSA pozitivni.

Do izvedbe molekularnega testa smo brise hranili v hladilniku pri 4 °C. Čas hranjenja je bil od enega dneva do največ deset dni.

### 3.2 MATERIALI

Za izvedbo molekularnega testa smo uporabili sestavine originalnega kompleta GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija). Sestavine kompleta so:

- membranski trakovi, prekriti z ustreznimi sondami
- pufer za lizo
- mešanica primarnih nukleotidov, ki vsebuje specifične začetne oligonukleotide, nukleotide in barvilo
- denaturacijska raztopina
- hibridizacijski pufer
- stringend wash raztopina
- raztopina za izpiranje
- konjugatni koncentrat
- konjugatni pufer
- substratni koncentrat
- substratni pufer
- banjica, papir za ocenjevanje

Dodatno smo potrebovali še sterilizirano destilirano vodo in termostabilno DNA polimerazo. Uporabili smo Hot Start Taq polimerazo Qiagen (Santa Clara, CA, ZDA).

### 3.3 IZOLACIJA DNA

V koraku izolacije DNA smo iz kužnin izolirali celotno DNA. Sledili smo postopku, ki so ga priporočili proizvajalci testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) in uporabili priložene reagente. Po končanem procesu izolacije smo dobili očiščeno DNA, primerno za pomnoževanje s PCR.

Bris smo najprej temeljito sprali v 300 µl pufru za lizo. Vzorce smo nato inkubirali pri 95 °C za 12 minut na segrevajočem bloku Thermomixer Comfort 5355 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Po končani inkubaciji smo epruvetke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) z vzorci za 5 minut centrifugirali pri 6000 obratih in 4 °C na centrifugi Hettich Mikro 200R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija). Supernatant smo previdno prenesli v novo epruvetko. Kadar smo imeli več kužnin enega bolnika smo po tej fazi izvedli združevanje vzorcev. Iz vsakega vzorca enega bolnika smo odvzeli po 15 µl in jih združili v eni epruvetki.

### 3.4 PCR

Večkratni PCR nam omogoča sočasno pomnoževanje več genov v isti reakciji. V našem primeru smo hkrati pomnoževali gen *mecA*, gen specifičen za *S. aureus* in kontrolo pomnoževanja. V navodilih testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) ni bilo omenjeno kateri geni (razen *mecA*) so vključeni v pomnoževanje.

Za pomnoževalno mešanico smo na epruvetko zmešali 35 µl mešanice primarnih nukleotidov z barvilom (PNM), 5 µl 10X polimeraznega inkubacijskega pufru, 1 enoto oz. 0,2 µl termostabilne DNA polimeraze in 4,8 µl destilirane vode. V ločenem prostoru smo mešanici za PCR dodali še 5 µl raztopljene izolirane DNA. Za negativno kontrolo smo uporabili 5 µl destilirane sterilne vode namesto vzorca.

Upoštevali smo priporočene pogoje pomnoževanja:

- 5 minut na 95 °C } 1 cikel
  - 30 sekund na 95 °C
  - 40 sekund na 55 °C
  - 40 sekund na 72 °C.
- } 35 ciklov

Za pomnoževanje smo uporabili RT-PCR aparat ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)

### 3.5 HIBRIDIZACIJA

Hibridizacija sestoji iz več korakov. V prvem koraku pride do kemične denaturacije pomnoženega produkta, tako da dobimo enovijačne, z biotinom označene dele DNA. V naslednjem koraku te označene, enovijačne DNA hibridizirajo s sondami, vezanimi na membranske trakove. Sledi spiranje in dodajanje konjugata streptavidin/alkalna fosfataza. Ta se veže na nastale komplekse sonda-pomnožena DNA. V zadnjem koraku izvedemo barvanje, tako, da dodamo substrat za ta encim. Posledica je barvna reakcija v obliki pasov, na katerih so bile nanese sonde, kar omogoča hitro in enostavno interpretacijo rezultatov.

Hibridizacijo smo izvajali v priloženih banjicah, ki so imele po 12 vdolbinic za trakove. V vogal vsake vdolbinice smo odpipetirali po 20 µl denuracijske raztopine, v kateri smo resuspendirali po 20 µl vzorca iz PCR. Po pet minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo v vsako vdolbinico dodali po 1 ml hibridizacijskega pufra, segretega na 45 °C. Rahlo smo premešali in v vdolbinice položili trak s sondami. Banjico smo inkubirali na stresalnem inkubatorju (Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, Nemčija) pri 45 °C za 30 minut. Nato smo odstranili tekočino, dodali po 1 ml Stringend Wash raztopine segrete na 4 °C in inkubirali pod enakimi pogoji za 15 minut. Delo smo nadaljevali na sobni temperaturi. Tekočino smo previdno odstranili iz vdolbinic ter 1 minuto spirali z 1 ml tekočine za spiranje.

Tudi to tekočino smo previdno odstranili in dodali po 1 ml predhodno pripravljene raztopine konjugata ter inkubirali za 30 minut na stresalniku na sobni temperaturi. Raztopino konjugata smo odlili in trakove dvakrat izpirali za 1 minuto s po 1 ml raztopine za spiranje in enkrat z destilirano vodo. Tekočino smo spet odstranili in v temi odpipetirali po 1 ml predhodno pripravljene raztopine substrata. Sledila je inkubacija v temi brez stresa, za 5-20 minut, dokler ni nastala vidna barvna reakcija. Večinoma smo za dobro vidno barvno reakcijo trakove inkubirali 20 minut. Trakove smo posušili in jih prilepili na priložen protokol.

### 3.6 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

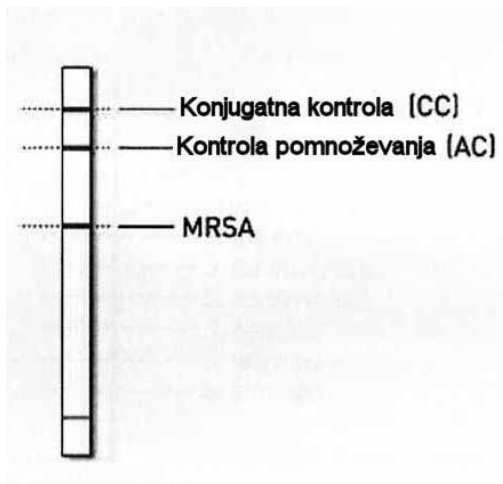
Test GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) je kombinacija večkratnega PCR in hibridizacije. Z večkratnim PCR smo z uporabo priloženih, z biotinom označenih začetnih oligonukleotidov pomnoževali tri gene: gen *mecA*, gen specifičen za *S. aureus* in kontrolo pomnoževanja. V vsaki PCR seriji smo poleg ostalih vzorcev testirali še negativno kontrolo, kjer smo reakcijski mešanici namesto izolirane DNA dodali sterilno destilirano vodo. Večkratnemu PCR je sledila hibridizacija produktov na membranske trakove z vezanimi sondami. Sonde so bile vezane v treh reakcijskih pasovih:

- konjugatna kontrola (CC): nastala barvna reakcija kaže na uspešnost vezave konjugata in substratne reakcije, torej na pravilen potek hibridizacije.
- kontrola pomnoževanja (AC): nastala reakcija kaže na pravilno izveden postopek pomnoževanja, saj se sem veže kontrolni amplikon. Odsotnost barvne reakcije pomeni napako v koraku pomnoževanja.
- MRSA: če pride do reakcije, to pomeni prisotnost proti meticilinu odpornega seva *S. aureus*. Intenziteta pasu je odvisna od začetne koncentracije DNA.

Pravilnost poteka testa smo dokazovali s pomočjo kontrole hibridizacije, kontrole pomnoževanja in zunanjo negativno kontrolo. Če sta tako hibridizacija kot PCR reakcija pravilno potekla, sta bila na traku prisotna oba pasova. Prisotnost tretjega pasu je nakazovala

pozitivno reakcijo. Rezultate smo odčitali glede na rezultat negativne kontrole. Če je bil MRSA pas negativnega kontrolnega vzorca rahlo pozitiven v primerjavi z intenziteto drugih vzorcev istega kroga, smo ga obravnavali kot nespecifičnega. V takih primerih smo samo signale višjih intenzitet označili za specifične. Če je bil MRSA pas negativen, sta morali biti obe kontroli obarvani pozitivno. Če ni bilo tako, je prišlo do pojava lažno negativne reakcije in test smo morali ponoviti.

Rezultate smo pridobili v povprečju po 5-6 urah dela.



Slika 2: Membranski trak s sondami

## 4 REZULTATI

### 4.1 PREDSTAVITEV REZULTATOV

V diplomskem delu smo želeli preveriti učinkovitost in uporabnost molekularne metode za dokazovanje MRSA neposredno v kužnini. V raziskavo smo vključili nadzorne kužnine 76 bolnikov in klinične kužnine 38 bolnikov. Skupini smo obravnavali ločeno, saj se razlikujeta po vrsti kužnine in po pogostosti pojavljanja pozitivnih rezultatov. Kužnine nadzorne skupine so bile predvsem brisi nosu in kože, v nekaterih primerih pa tudi brisi žrela in aspirati traheje. Pri skupini bolnikov s sumom na okužbo smo za kužnine uporabili brise ran ali aspirate traheje. Vsakemu bolniku sta bila vzporedno odvzeta dva seta vzorcev. Prvi set smo uporabili za rutinsko testiranje s klasično kultivacijo s kombinacijo neselektivnih in selektivnih gojišč ter predbogatitve, vzorce drugega seta pa smo testirali z novim molekularnim testom GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija). Pri nadzorni skupini, v treh primerih pa tudi pri klinični, smo na bolnika imeli po več različnih vzorcev. Dele teh vzorcev drugega seta smo po koraku izolacije DNA združili v skupni vzorec, preostanek pa testirali posebej.

Rezultate smo analizirali na dva načina. Najprej smo rezultat vsakega vzorca posebej primerjali z rezultatom iz rutinskega testiranja. V nadaljevanju pa smo primerjali še MRSA-status bolnika glede na molekularni test z MRSA-statusom bolnika po rutinskem testiranju.

### 4.2 REZULTATI TESTIRANJA POSAMEZNIH VZORCEV

V tem delu smo obravnavali vsak vzorec posebej ter primerjali rezultate molekularne metode za odkrivanje MRSA neposredno iz kužnine z rezultati klasične metode kultivacije. Obravnavali smo dve skupini vzorcev – nadzorne in klinične. Skupno smo testirali 182 nadzornih in 42 kliničnih vzorcev. Pri trinajstih bolnikih nadzorne skupine smo imeli rezultate klasične metode kultivacije le za MRSA-status bolnika in ne tudi rezultatov posameznih

vzorcev, zato le-teh tukaj nismo upoštevali. Tako smo vključili le 143 nadzornih vzorcev. Od tega je bilo 63 brisov nosu, 64 brisov kože (predvsem brisi pazduhe in dimelj), 12 brisov žrela ter 4 aspirati traheje. Pri kliničnih vzorcih je bilo 26 aspiratov traheje, 11 brisov ran, 2 brisa diabetičnega stopala ter po en bris nosu, žrela in kože.

V Preglednici 1 smo predstavili rezultate testiranja kužnin nadzorne skupine. Primerjali smo rezultate molekularnega in klasičnega testiranja za vsak posamezen vzorec posebej. Od 143 vzorcev je bilo pri dveh pomnoževanje s PCR neuspešno, verjetno zaradi inhibicije pomnoževanja.

Preglednica 1: Rezultati testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna skupina; obravnava vsakega vzorca posebej

		Klasične metode kultivacije MRSA		
		pozitivno	negativno	Skupaj
GenoType <sup>®</sup> MRSA Direct	pozitivno	22	21	43
	negativno	8	90	98
	Skupaj	30	111	141

Preglednica 2 prikazuje rezultate vzorcev iz klinične skupine. Testirali smo 42 vzorcev. Čeprav test prvotno ni namenjen testiranju aspiratov traheje, smo to vrsto kužnine vseeno vključili. Da pa to ne bi vplivalo na končne rezultate, smo obe skupini kužnin analizirali tudi ločeno. V treh primerih, ko je bila testirana kužnina aspirat traheje, do PCR reakcije ni prišlo. Za tri vzorce se je izkazalo, da so MRSA negativni tudi po klasičnem testiranju.



Preglednica 2: Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; klinična skupina; obravnava vsakega vzorca posebej

		Klasične metode kultivacije MRSA		
		pozitivno	negativno	Skupaj
<b>GenoType®MRSA Direct brisi in aspirati traheje</b>	pozitivno	28	0	28
	negativno	8	3	11
	Skupaj	36	3	39
<b>GenoType®MRSA Direct aspirati traheje</b>	pozitivno	16	0	16
	negativno	6	0	6
	Skupaj	22	0	22
<b>GenoType®MRSA Direct brisi</b>	pozitivno	12	0	12
	negativno	2	3	5
	Skupaj	14	3	17

Na koncu smo klinične in nadzorne vzorce analizirali skupaj in rezultate prikazali v Preglednici 3. Od 185 testiranih vzorcev pri petih ni prišlo do pomnoževanja. Ker aspirati traheje niso priporočena kužnina, smo se odločili podati rezultate tudi brez upoštevanja tovrstnih kužnin. Tukaj smo odšteli tudi štiri aspirate traheje, ki smo jih imeli kot del nadzornih kužnin.

Preglednica 3: Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; vsi vzorci; obravnava vsakega vzorca posebej

		Klasične metode kultivacije MRSA		
		pozitivno	negativno	Skupaj
<b>GenoType®MRSA Direct vse kužnine</b>	pozitivno	50	21	71
	negativno	16	93	109
	Skupaj	66	114	180
<b>GenoType®MRSA Direct brez aspiratov traheje</b>	pozitivno	34	21	55
	negativno	9	90	99
	Skupaj	43	111	154

V Preglednici 4 so izračunane vrednosti iz podatkov v Preglednicah 1, 2 in 3. Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov smo izračunali glede na število vzorcev.

$$\text{Delež lažno negativnih rezultatov} = \frac{\text{lažno negativni}}{\text{vsi}} \quad \dots(1)$$

$$\text{Delež lažno pozitivnih rezultatov} = \frac{\text{lažno pozitivni}}{\text{vsi}} \quad \dots(2)$$

Za izračun občutljivosti in specifičnosti testa smo predpostavili, da so rezultati klasičnega testiranja v skladu z dejanskim MRSA-statusom bolnika. Občutljivost testa je izražena z odstotkom bolnikov z okužbo z MRSA, pri kateri je rezultat molekularnega testa pozitiven. Specifičnost testa je izražena z odstotkom neokuženih oziroma nekoloniziranih bolnikov, pri katerih je rezultat molekularnega testa negativen.

$$\text{Občutljivost} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \quad \dots(3)$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \quad \dots(4)$$

Na koncu so podane še pozitivne in negativne napovedne vrednosti testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija). Napovedna vrednost prikaže verjetnost, s katero bo test pravilno določil prisotnost ali odsotnost okužbe oz. kolonizacije z MRSA.

$$\text{PNV} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno pozitivni}} \quad \dots(5)$$

$$\text{NNV} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno negativni}} \quad \dots(6)$$

Za tri klinične vzorce se je izkazalo, da so MRSA negativni tudi po klasičnem testiranju. V tem primeru specifičnosti testa nismo računali, ker bi za verodostojne izračune potrebovali večje število negativnih kliničnih vzorcev. Občutljivost testa pri nadzornih kužninah je bila 73,3 %, pri kliničnih vzorcih 77,8 %, od tega pri aspiratih traheje 72,7 % in pri ostalih kliničnih vzorcih 85,7 %. Občutljivost za vse vzorce skupaj je bila 75,8 % oziroma 79,1 % brez aspiratov traheje.

Preglednica 4: Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov, občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); izračunani glede na posamezne vzorce in klasični postopek osamitve MRSA kot zlati standard

	lažno negativni (%)	lažno pozitivni (%)	občutljivost (%)	specifičnost (%)	PNV (%)	NNV (%)
Nadzorne kužnine,	5,7	14,9	73,3	81,1	51,2	91,8
Klinični vzorci, vse kužnine	20,5	/	77,8	/	/	/
Klinični vzorci, samo aspirati traheje	27,3	/	72,7	/	/	/
Klinični vzorci, samo brisi	11,8	/	85,7	/	/	/
Vsi vzorci	8,9	11,7	75,8	81,6	70,4	85,3
Vsi vzorci, brez aspiratov traheje	5,8	13,6	79,1	81,1	61,8	90,9

### 4.3 REZULTATI TESTIRANJA MRSA-STATUSA BOLNIKA

MRSA-status bolnika smo določali glede na rezultate posameznih vzorcev posameznega bolnika ali po rezultatu združenega vzorca. Pri tem je MRSA-status bolnika pozitiven, če je katerikoli vzorec pozitiven oziroma če je rezultat združenega vzorca pozitiven. MRSA-status bolnika je negativen, če so vsi vzorci negativni oziroma če je rezultat združenega vzorca negativen.

Vključili smo 76 bolnikov iz nadzorne skupine (skupno 182 vzorcev) in 38 bolnikov iz klinične skupine (skupno 42 vzorcev).

V Preglednici 5 so predstavljeni rezultati nadzornih kužnin glede na MRSA-status bolnika. Rezultati so razdeljeni na dve skupini. V prvi skupini so rezultati posameznih brisov, v drugi skupini pa so predstavljeni rezultati združenih vzorcev. Pri združenih vzorcih v dveh primerih ni prišlo do reakcije pomnoževanja.

Preglednica 5: Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika

		Klasične metode kultivacije MRSA		
		pozitivno	negativno	Skupaj
<b>GenoType®MRSA Direct posamezni vzorci</b>	pozitivno	26	11	37
	negativno	7	32	39
	Skupaj	33	43	76
<b>GenoType®MRSA Direct združeni vzorci</b>	pozitivno	26	10	36
	negativno	6	32	38
	Skupaj	32	42	74

V Preglednici 6 smo primerjali molekularno testiranje posameznih brisov z molekularnim testiranjem združenih vzorcev, glede na MRSA-status bolnika. Zanimivi so predvsem trije bolniki, ki so bili glede na posamezne vzorce MRSA negativni, glede na združeni vzorec pa

MRSA pozitivni. Po drugi strani pa so trije bolniki z negativnim združenim vzorcem imeli pozitivne posamezne vzorce.

Preglednica 6: Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija); primerjava posameznih vzorcev bolnika z združenimi vzorci; nadzorna skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika

		GenoType®MRSA Direct združeni vzorci		Skupaj
		pozitivno	negativno	
GenoType®MRSA Direct posamezni vzorci	pozitivno	33	3	36
	negativno	3	35	38
	Skupaj	36	38	74

V Preglednici 7 so predstavljeni rezultati primerjave molekularnega testiranja s klasičnimi metodami kultivacije za klinične vzorce, glede na MRSA-status bolnika. Od 38 bolnikov pri treh aspiratih traheje ni prišlo do pomnoževanja. Pri klinični skupini vzorcev smo imeli večinoma le po eno kužnino na bolnika, zato združevanje vzorcev ni bilo potrebno.

Preglednica 7: Rezultati testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; klinična skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika

		Klasične metode kultivacije MRSA		Skupaj
		pozitivno	negativno	
GenoType®MRSA Direct	pozitivno	26	0	26
	negativno	8	1	9
	Skupaj	34	1	35
GenoType®MRSA Direct, brez aspiratov traheje	pozitivno	10	0	10
	negativno	2	1	3
	Skupaj	12	1	13

V Preglednici 8 smo predstavili vzorce nadzorne in klinične skupine skupaj. Ločeno smo analizirali dve skupini. V prvi skupini smo obravnavali samo rezultate posameznih vzorcev, v

drugi pa rezultate združenih vzorcev, kjer smo jih imeli, ali pa posameznih, če smo imeli le po en vzorec na bolnika. V obeh primerih smo rezultate analizirali tudi brez aspiratov traheje.

Preglednica 8: Rezultati testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) v primerjavi s klasičnimi metodami določanja MRSA s kultivacijo; nadzorna in klinična skupina; obravnava MRSA-statusa bolnika

		Klasične metode kultivacije MRSA		
		pozitivno	negativno	Skupaj
<b>GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct posamezni vzorci</b>	pozitivno	52	11	63
	negativno	15	33	48
	Skupaj	67	44	111
<b>GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct posamezni vzorci, brez aspiratov traheje</b>	pozitivno	36	11	47
	negativno	9	33	42
	Skupaj	45	44	89
<b>GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct združeni oz. posamezni vzorci</b>	Pozitivno	52	10	62
	Negativno	14	33	47
	Skupaj	66	43	109
<b>GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct združeni oz. posamezni vzorci brez aspiratov traheje</b>	pozitivno	36	10	46
	negativno	8	33	41
	Skupaj	44	43	87

Preglednica 9 predstavlja izračunane vrednosti k podatkom zbranim v Preglednicah 5, 7 in 8. Izračuni se nanašajo na MRSA status bolnika. Izračunali smo delež lažno negativnih (formula 1) in lažno pozitivnih rezultatov (formula 2), občutljivost (formula 3) in specifičnost (formula 4) testa ter pozitivno (formula 5) in negativno (formula 6) napovedno vrednost.

Največji delež lažno negativnih rezultatov je opazen pri kliničnih vzorcih, 22,9 %. Vendar moramo upoštevati, da smo pri tej skupini vključili predvsem tiste vzorce, ki so bili po klasični metodi testiranja pozitivni. Občutljivost testa se giblje od 76,5 % do 83,3 % med

različnimi skupinami. Pove nam, kolikšen delež resnično pozitivnih rezultatov lahko test odkrije. Specifičnost testa niha od 70,5 % do 76,2 %.

Preglednica 9: Delež lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov, občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) izračunani glede na MRSA-status bolnika določen s klasičnim postopkom osamitve MRSA kot zlati standard

	lažno negativni (%)	lažno pozitivni (%)	občutljivost (%)	specifičnost (%)	PNV (%)	NNV (%)
Nadzorna skupina, posamezni vzorci	9,2	14,5	78,8	74,4	70,3	82,1
Nadzorne skupina, združeni vzorci	8,1	13,5	81,3	76,2	72,2	84,2
Klinična skupina, brez aspiratov traheje	15,4	/	83,3	/	/	/
Klinična skupina, vsi vzorci	22,9	/	76,5	/	/	/
Vsi bolniki, posamezni vzorci	13,5	9,9	77,6	75,0	82,5	68,8
Vsi bolniki, posamezni vzorci, brez aspiratov traheje	10,1	12,4	80,0	75,0	76,6	78,6
Vsi bolniki, združeni oz. posamezni vzorci	12,6	11,7	79,1	70,5	80,3	68,9
Vsi bolniki, združeni oz. posamezni vzorci, brez aspiratov traheje	9,0	14,6	82,2	70,5	74,0	79,5

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Izbira vzorcev

Pri vzorcih iz nadzorne skupine so kužnine predstavljali predvsem brisi nosu, kože in žrela. Namen nadzornega testiranja je najti bolnike kolonizirane z MRSA in preprečiti širjenje kolonizacije. Vsakemu bolniku so bili odvzeti brisi iz različnih anatomskih mest, saj lahko le tako zanesljivo potrdimo kolonizacijo z MRSA. Vzoredno so bili odvzeti najprej vzorci za klasično odkrivanje MRSA s kultivacijo, nato pa še vzorci za metodo GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct.

Pri klinični skupini so bile kužnine drugačne. Večinoma je šlo za brise ran in aspirate traheje. Ta vrsta kužnin je že po naravi bolj problematična za izvedbo testa, kar je še dodaten razlog, da smo jih želeli testirati ločeno. Brisi ran pogosto vsebujejo kri ali njene produkte, za katere je znano, da lahko inhibirajo PCR reakcijo (Louie in sod., 2002). Še večji problemi pa se lahko pojavijo pri obdelavi aspiratov traheje. Pri klasičnih gojitvenih tehnikah gojišče pogosto prerastejo druge v aspiratu traheje prisotne bakterije (na primer predstavniki rodu *Pseudomonas*) ter onemogočijo rast MRSA (Vannuffel in sod., 1998; Brown in sod., 2005). Pri molekularnih metodah se problemi lahko pojavijo že v procesu izolacije DNA, saj aspirati traheje praviloma vsebujejo veliko sluzi, lahko pa tudi inhibirajo sam proces pomnoževanja DNA. Ker se pri določanju okužbe z MRSA kot kužnina pogosto uporabljajo aspirati traheje, smo se želeli prepričati, ali test GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) deluje tudi v tem primeru. Tovrstnih podatkov v literaturi namreč nismo našli. Test nam omogoča enostavno zaznavanje inhibicije PCR reakcije. Na traku za odčitavanje rezultatov v primeru inhibicije PCR reakcije ne bi videli črte kontrole pomnoževanja, ampak le črto konjugatne kontrole. Večji problem nastane ob neučinkoviti izolaciji DNA iz vzorca.



Test nam v tem primeru pokaže lažno negativen rezultat, saj se je v PCR reakciji pomnožila le kontrola pomnoževanja.

V primerjavi s klasičnimi gojitvenimi testi predstavlja molekularni test, ki smo ga preizkušali (tako kot tudi drugi molekularni testi), precejšnje stroške. Ker se predvsem pri nadzornem testiranju nabere veliko število vzorcev, bi bila cenovno ugodnejša rešitev združevanje brisov posameznega bolnika v skupen vzorec. Namesto 2 do 5 vzorcev bi tako za vsakega bolnika testirali le en, združen vzorec. To smo tudi storili. Vzorce posameznega bolnika smo združili v skupen vzorec po koraku izolacije DNA, pred PCR reakcijo. Zanimalo nas je, ali je testiranje združenih vzorcev enako učinkovito kot testiranje posameznih vzorcev.

Odločili smo se za dva načina predstavitve rezultatov. Najprej smo upoštevali in primerjali vsak posamezen vzorec posebej in tako dobili rezultate primerjave molekularnega testa s klasičnim. Ker pa nas v končni fazi zanima le, ali je bolnik MRSA-pozitiven ali MRSA-negativen, smo naredili še ločeno primerjavo glede na MRSA-status bolnika. V tem primeru smo primerjali MRSA-status bolnika, določen z molekularno metodo, z MRSA-statusom bolnika, določenim s klasičnimi metodami kultivacije.

### **5.1.2 Analiza rezultatov glede na posamezne vzorce**

V analizo rezultatov posameznih kužnin smo vključili 185 vzorcev, od tega 143 nadzornih in 42 kliničnih. Pri petih vzorcih (dveh nadzornih in treh kliničnih) reakcija pomnoževanja DNA ni potekla. Te vzorce smo testirali še enkrat, a do reakcije ponovno ni prišlo. Pri ostalih vzorcih iz istih serij je reakcija pomnoževanja normalno potekala. Zaradi tega sklepamo, da so ti vzorci vsebovali substance, ki inhibirajo PCR reakcijo in ni šlo za napako v postopku. Če je šlo za inhibicijo pomnoževanja, bi mogoče pomagalo redčenje vzorca. Tako bi razredčili inhibitorje, ostalo pa bi še dovolj bakterijske DNA za potek pomnoževanja nukleinskih kislin. Vse tri klinične kužnine, pri katerih PCR ni potekel, so bile aspirati traheje.

Občutljivost molekularnega testa je le 75,8 %, kar je precej nižje od pričakovanega. Občutljivost testa samo za nadzorno skupino vzorcev je 73,3 %, za klinično skupino pa nekoliko višja, 77,8 %. Pri klinični skupini je bilo veliko vzorcev aspiratov traheje. Ker je ta vrsta kužnine lahko problematična, smo izračunali še občutljivost testa samo za aspirate traheje in samo za ostale vzorce. Ločena analiza je pokazala, da je občutljivost testa, kadar je kužnina aspirat traheje, le 72,7 %, če pa aspiratov traheje ne upoštevamo, pa kar 85,7 %. Delež lažno negativnih rezultatov je pri aspiratih traheje za 15,5 % višji kakor pri ostalih kliničnih kužninah, kar potrjuje, da test za tovrstno kužnino ni primeren. Domnevamo, da je do težav prišlo v koraku izolacije DNA, najverjetneje zaradi prisotnosti sluzi. To bi tudi pojasnilo velik delež lažno negativnih rezultatov. Če je problem res v tem, bi občutljivost testa lahko povišali s spremenjenim postopkom izolacije DNA. Ena od možnosti bi bila redčenje vzorcev, lahko pa bi tudi podaljšali inkubacijo pri 95 °C. Visoki deleži lažno negativnih rezultatov v klinični skupini v primerjavi z nadzornimi kužninami nas ne smejo zavesti, saj so procenti računani glede na vse vzorce, kar pri nadzornih kužninah vključuje tako negativne kot pozitivne, pri kliničnih pa pretežno pozitivne vzorce.

Občutljivost molekularnega testa za vse vzorce razen aspiratov traheje je 79,1 %. Če primerjamo občutljivost nadzorne in klinične skupine (brez aspiratov traheje), opazimo, da je rezultat precej boljši pri klinični skupini. A tudi v tem primeru je delež lažno negativnih rezultatov precej višji od pričakovanega. Možno je, da je na visok delež lažno negativnih rezultatov vplival že način odvzema brisov. Najprej so odvzeli bris za rutinsko, klasično kultivacijo bakterij in šele nato drugi bris za molekularno testiranje. Če je bilo prisotno le majhno število bakterij, so jih zajeli že s prvim brisom, z drugim pa ne, ali pa so bile pod zaznavno mejo testa. Nadaljnji korak, ki je lahko prispeval k deležu lažno negativnih rezultatov, je shranjevanje odvzetih vzorcev. Vzorce smo pred uporabo hranili v hladilniku pri 4 °C. Vzorce, namenjene klasičnemu testiranju, so uporabili hitro po odvzemu. Vzorca, namenjeni molekularnemu testiranju, pa so bili v nekaterih primerih dlje časa (tudi po več dni) spravljani v hladilniku. Možno je, da je v teh primerih večji delež MRSA kljub transportnemu gojišču propadel. Seveda pa bi v tem primeru lahko prišlo do pomnoževanja DNA mrtvih

bakterij. Teoretično bi bilo možno tudi, da je bila v vzorcu mešana družba MRSA in MSSA, po daljšem shranjevanju pa so zaradi selekcije preživeli predvsem sevi MSSA.

Specifičnost, oziroma odstotek vzorcev brez MRSA okužbe ali kolonizacije, pri katerih je bil rezultat molekularnega testa negativen, je bila pri nadzornih kužninah 81,1 %, za vse vzorce pa 81,6 %. Pri klinični skupini specifičnosti nismo mogli izračunati zaradi pomanjkanja negativnih vzorcev. Specifičnost testa GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) je nižja kot smo pričakovali in kot je navedeno v navodilih za uporabo testa (Hain-Lifescience..., 2006). Razlogov je lahko več. Lažno pozitivni rezultati bi lahko bili posledica kontaminacije negativnega vzorca s pozitivnim. Do tovrstne kontaminacije bi teoretično lahko prišlo na različnih mestih v postopku, najverjetneje pa v začetnih korakih postopka hibridizacije. Kljub temu pa smo mnenja, da kontaminacija ni bila razlog za nizko specifičnost testa. Pogosto je namreč bil vzorec, ki je dal lažno pozitiven rezultat, v hibridizacijski banjici prostorsko precej oddaljen od resnično pozitivnega vzorca, kar bi kontaminacijo precej otežilo. Drugi razlog je lahko zaznavna meja testa, oziroma najmanjše število bakterij, ki jih s testom še lahko dokažemo. Možno je namreč, da molekularna metoda, ki smo jo uporabili, zazna že precej manjše število bakterij kakor klasične tehnike kultivacije. Če je bilo v vzorcu tako malo bakterij, da so padle pod zaznavno mejo klasičnega testa, molekularni test pa jih je zaznal, se je to pokazalo v navidez lažno pozitivnem rezultatu. To bi lahko preverili z odvzemom novih vzorcev pri istem bolniku oziroma s sledenjem bolnika. Vendar bi bilo le-to lahko dvomljivo zaradi možne naknadne kolonizacije z MRSA ali pa bi MRSA uničili v postopku zdravljenja ali dekolonizacije bolnika.

Nizka specifičnost je lahko tudi posledica naše morda napačne predpostavke, da so klasične tehnike kultivacije popolnoma zanesljive. To bi lahko preverili z uporabo zlatega standarda določanja MRSA, klasičnega PCR na čisti kulturi bakterij *S. aureus*. Tako klasične tehnike kultivacije in test GenoType®MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) bi primerjali z rezultati klasičnega PCR in ugotovili, kateri je bolj specifičen. Četrti razlog za pojav lažno pozitivnih rezultatov je lahko sočasna kolonizacija predela, iz katerega je bil bris odvzet, s sevi

MSSA in MR-CNS. Pomnožil bi se predel genoma, specifičen za *S. aureus* iz seva MSSA, gen *mecA* pa iz seva MR-CNS in dobili bi lažno pozitiven rezultat. V tem primeru bi bil test popolnoma neuporaben za neposredno dokazovanje MRSA v kužnini. Vendar je to malo verjetno, saj bi bil glede na pogostost kolonizacije z MSSA delež lažno pozitivnih rezultatov verjetno precej večji.

Podobne rezultate so v svoji raziskavi prikazali tudi Hal in sod. (2007). Prikazana občutljivost molekularnega testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) je bila 69 %, specifičnost pa 96 %.

### 5.1.3 Analiza rezultatov glede na MRSA-status bolnika

MRSA-status bolnika smo določali na dva načina:

- iz vseh vzorcev posameznega bolnika: pri tem je veljal bolnik za MRSA pozitivnega, če je bil vsaj en vzorec pozitiven in za MRSA negativnega, če so bili vsi vzorci negativni.
- iz združenega vzorca, ki smo ga dobili z združevanjem vzorcev pred potekom PCR reakcije

Testirali smo 76 bolnikov iz oddelka za intenzivno nego (nadzorna skupina) in 38 bolnikov s sumom na okužbo z MRSA ali s preteklo izolacijo MRSA (klinična skupina). Rezultate, ki smo jih dobili z molekularnimi metodami (tako za posamezne kot tudi za združene vzorce), smo primerjali z rezultati, pridobljenimi s klasičnimi gojitvenimi metodami. V dveh primerih združenih vzorcev ni potekla PCR reakcija, čeprav je za posamezne vzorce tega bolnika potekla. Zakaj je do tega prišlo, nam ni znano. Možno pa bi bilo, da z združitvijo povečamo količino inhibitorjev pomnoževanja, če jih je vsebovalo več vzorcev.

Občutljivost molekularnega testa za določanje MRSA-statusa bolnika iz posameznih vzorcev je bila pri nadzorni skupini 78,8 %, pri klinični pa 76,5 % oziroma 83,3 % brez aspiratov

traheje. Kakor je bilo opazno že pri analizi posameznih vzorcev, je tudi v tem primeru občutljivost precej nizka. Pri nadzorni skupini je sicer nekoliko višja pri analizi MRSA-statusa bolnika, pri klinični skupini pa nekoliko nižja. Boljši rezultat pri nadzorni skupini smo tudi pričakovali, saj na določanje MRSA-statusa bolnika vplivajo rezultati vseh vzorcev tega bolnika. Če je vsaj en vzorec pozitiven, se bolnik že šteje za MRSA pozitivnega, tudi če so vsi ostali vzorci negativni. Občutljivost testa za vse vzorce je 77,6 % in 80,0 % za vse vzorce razen aspiratov traheje, kar je nekoliko boljše kakor pri analizi posameznih vzorcev, predvsem na račun nadzornih vzorcev.

Specifičnost molekularne metode pri obravnavi MRSA-statusa bolnika (75,0 %) pa je nasprotno nižja kakor pri analizi posameznih vzorcev (81,6 %). To je tudi posledica določanja MRSA-statusa bolnika. Bolnik je namreč spoznan za MRSA negativnega le, če so vsi njegovi vzorci negativni.

Pri klinični skupini od 38 bolnikov trem nismo mogli določiti MRSA-statusa, ker pomnoževanje ni poteklo. Samo en bolnik se je izkazal za MRSA-negativnega po obeh uporabljenih metodah. Pomanjkanje negativnih rezultatov je tudi razumljivo, saj gre za bolnike s sumom na okužbo z MRSA ali pa za znane nosilce MRSA.

MRSA-status bolnika pri nadzorni skupini smo določali tudi iz rezultatov združenih vzorcev. Občutljivost molekularnega testa za združene vzorce v nadzorni skupini je 81,3 %, kar je višje kakor pri določanju MRSA-statusa bolnika iz posameznih vzorcev. Tudi specifičnost je pri združenih vzorcih nekoliko višja kakor pri posameznih vzorcih. Iz tega je razvidno, da se rezultati posameznih kužnin in združenih vzorcev med sabo niso vedno ujemali. Presenetila nas je predvsem primerjava občutljivosti med posameznimi in združenimi vzorci. Pričakovali smo, da bo združevanje vzorcev zmanjšalo občutljivost testa, zgodilo pa se je ravno obratno. Zakaj je prišlo do tega pojava, nam ni znano. Teoretično bi bilo možno, da smo z združevanjem vzorcev razredčili inhibitorje, v kolikor ti niso bili prisotni v vseh vzorcih.

Pri klinični skupini smo imeli večinoma le po en vzorec na bolnika, zato združevanje vzorcev ni bilo potrebno.

Analizi združenih vzorcev smo se podrobneje posvetili v Preglednici 6, kjer smo primerjali rezultate združenih vzorcev z rezultati posameznih vzorcev, glede na MRSA-status bolnika. Trije bolniki od 36, ki so bili glede na posamezne vzorce pozitivni, so bili negativni po združenih vzorcih. Razlog je verjetno posledica postopka združevanja, kjer pride do redčenja vzorca. Zaradi tega je možno, da pade količina MRSA DNA pod prag zaznave testa.

Bolj nerazumljivi so rezultati testa pri treh bolnikih od 38, ki so bili glede na posamezne vzorce MRSA-negativni in glede na združeni vzorec MRSA-pozitivni. Problem bi se ponovno lahko pojavil pri procesu združevanja vzorcev, ki smo ga izvajali po koraku izolacije DNA. Če je bilo v vzorcu zelo malo bakterijske DNA, bi jo lahko pri koraku združevanja po naključju zajeli v tolikšni meri, da je v posameznem vzorcu ne bi ostalo dovolj za potek PCR reakcije. Možno pa je tudi, da je prišlo do kontaminacije vzorca.

Vpliv združenih vzorcev se pozna tudi pri analizi MRSA-statusa vseh bolnikov skupaj. Če smo namesto MRSA-statusa bolnika glede na njegove posamezne vzorce upoštevali združeni vzorec (kjer smo ga imeli), smo dobili višjo občutljivost tako v skupini z aspirati traheje kot tudi v skupini brez aspiratov traheje.

Pri vseh izračunanih vrednostih za nadzorne kužnine se je pokazalo, da bi bilo združevanje vzorcev možno in bi celo dalo nekoliko boljše rezultate.

Podatke za vse bolnike skupaj smo analizirali na dva načina. Pri prvem smo upoštevali samo posamezne nadzorne vzorce in klinične vzorce, pri drugi pa še združene vzorce. V obeh primerih smo naredili ločeno analizo z izključitvijo vzorcev, katerih kužnina je bila aspirat traheje. Skupno smo testirali 114 bolnikov, 76 iz nadzorne in 38 iz klinične skupine.

Občutljivost hitre molekularne metode za vse vzorce pri obravnavi le MRSA-statusa bolnika je 77,6 % oz. 79,1 % če upoštevamo združene vzorce. Boljši rezultat ob skupni analizi posameznih in združenih vzorcev se tudi ujema z ugotovitvami pri nadzorni skupini. Če odštejemo vzorce, pri katerih je bila edina uporabljena kužnina aspirat traheje, dobimo v obeh primerih za približno tri odstotke višjo občutljivost testa. Tukaj torej ponovno opazimo vpliv aspiratov traheje na zmanjšanje občutljivosti testa.

## 5.2 SKLEPI

- Tako občutljivost kot tudi specifičnost hitrega molekularnega testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) za določanje MRSA neposredno iz kužnine sta bili nižji kot smo pričakovali glede na navedbe proizvajalca. Analiza rezultatov temelji na predpostavki, da sta občutljivost in specifičnost uporabljenih klasičnih metod za ugotavljanje MRSA s kultivacijo 100 % oziroma se temu odstotku zelo približata.
- Občutljivost testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) je pri analizi posameznih vzorcev 75,8 %, pri analizi MRSA-statusa bolnikov pa 77,6 % oz. 81,3 % pri združenih vzorcih. Če iz analize izločimo aspirate traheje, dobimo v vseh primerih boljše rezultate. Molekularni test se je torej najboljše izkazal v primeru obravnave MRSA-statusa bolnika, vendar brez aspiratov traheje. Občutljivost je v tem primeru 80,0 % oziroma 82,2 %, če vključimo še združene vzorce.
- Občutljivost molekularnega testa je prenizka, da bi ga lahko uporabili v praksi
- Ugotovili smo, da združevanje vzorcev ne vpliva negativno na občutljivost molekularnega testa, ampak ravno obratno. Združevanje vzorcev bi torej bilo izvedljivo.
- Izkazalo se je, da aspirati traheje niso primerna kužnina za izvedbo testa, saj precej zmanjšajo njegovo občutljivost, v nekaterih primerih pa celo inhibirajo PCR reakcijo.



## 6 POVZETEK

Proti meticilinu odporni izolati bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA) sodijo v vrsto ubikvitarnih organizmov, ki se nenehno prilagajajo na nova protimikrobna sredstva in vplive okolja. So glavni povzročitelji bolnišničnih okužb po vsem svetu. V zadnjem času se vse bolj pogosto pojavljajo tudi v domačem okolju. (Duckworth, 2003, Maltezou in Giamarellou, 2006). Okužbe z MRSA podaljšajo bivanje v bolnišnicah, povečajo stroške zdravljenja in smrtnost bolnikov (Salgado in sod., 2006). Odpornost pri MRSA obsega vse betalaktamske antibiotike in je pogosto povezana s paralelno odpornostjo proti drugim skupinam antibiotikov (Cooper in sod., 2003). Glikopeptidni antibiotiki so pogosto edini, ki jih še lahko uporabimo za zdravljenje tovrstnih okužb (Rubinovitch in Pittet, 2001). Sevi bakterije *S. aureus* so pridobili odpornost proti meticilinu s sprejetjem gena *mecA*, ki kodira alternativni penicilin vežoča beljakovina PBP2a z zmanjšano afiniteto za betalaktamske antibiotike (Haddadin in sod., 2002).

Z naraščanjem števila okužb z MRSA se je pojavila potreba po kontroli širjenja. Za uspešno kontrolo širjenja se je izkazalo odkrivanje nosilcev MRSA ob sprejemu v bolnišnico v povezavi s kontaktno izolacijo in dekolonizacijo nosilcev (Wernitz in sod., 2005b). Hitro in natančno odkrivanje MRSA v kliničnih vzorcih je velikega pomena za zdravljenje in kontrolo širjenja MRSA. Danes se večinoma uporablja metoda klasične izolacije in identifikacije bakterije iz kužnine, kar pa traja 2-4 dni. Dolgo čakanje na rezultat nam onemogoča hiter pričetek pravičnega zdravljenja in olajša nadaljnje širjenje MRSA (Harbarth in sod., 2006).

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti učinkovitost in uporabnost nove molekularne metode za dokazovanje MRSA neposredno iz kužnine. Uporabili smo test GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct, ki ga je razvila družba Hain-Lifescience (Nehren, Nemčija). Metodo smo primerjali s klasično metodo odkrivanja MRSA s kultivacijo, ki se trenutno uporablja v praksi. Metoda temelji na kombinaciji večkratnega PCR in hibridizacije. Za izvedbo novega molekularnega testa potrebujemo le 5-6 ur. Z večkratnim PCR s pomočjo z biotinom označenih začetnih

oligonukleotidov iz izolirane DNA pomnožimo gen *mecA*, gen specifičen za *S. aureus* in kontrolo pomnoževanja. Produkta PCR dokažemo s pomočjo hibridizacije na membranskih trakovih z vezanimi sondami. Ko se produkti vežejo na sonde, nastanejo označeni kompleksi, ki jih ob dodatku konjugata in substrata vidimo kot barvno reakcijo v obliki črte.

Za uspešno identifikacijo kolonizacije ali okužbe z MRSA je potrebno odvzeti vzorce iz več anatomskih mest, zato smo na enega bolnika pridobili od 2-5 vzorcev. Zanimalo nas je tudi, ali lahko vzorce enega bolnika združimo in tako z eno reakcijo dobimo rezultat o morebitni kolonizaciji oziroma okužbi bolnika ter na ta način zmanjšamo stroške testa.

Ugotovili smo, da sta tako občutljivost (75,8 %) kot specifičnost (81,6 %) hitrega molekularnega testa GenoType<sup>®</sup>MRSA Direct (Hain-Lifescience, Nehren, Nemčija) prenizki za uporabo testa v praksi. Če smo upoštevali le MRSA-status bolnika, je bila občutljivost nekoliko višja (77,6 %), specifičnost pa nekoliko nižja (75,0 %). Združevanje vzorcev ni imelo bistvenega vpliva na rezultat. Izkazalo se je, da aspirati traheje niso primerna kužnina za izvedbo molekularnega testa, saj precej zmanjšajo njegovo občutljivost, v nekaterih primerih pa celo inhibirajo PCR reakcijo.

## 7 VIRI

- Ahmadinejad M., Snyder J.W., Perlin M.H. 1998. A combined molecular approach to screen for *mec* gene variants from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 30: 17-20
- Becker K., Pagnier I., Schuhen B., Wenzelburger F., Friedrich A.W., Kipp F., Peters G., von Eiff C. 2006. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1: 229-231
- Boyle-Vavra S., Daum R.S. 2007. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87: 3-9
- Boyle-Vavra S., Ereshefsky B., Wang C-C., Daum R.S. 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type V<sub>T</sub> or SCC*mec* type IV. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 9: 4719-4730
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2001. The staphylococci. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 22<sup>nd</sup> ed. Foltin J., Ransom J., Lebowitz H., Holton B. (eds.). New York, The McGraw-Hill Companies, Inc.: 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

- Chaix C., Durand-Zaleski I., Alberti C., Brun-Buisson C. 1999. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* A cost-benefit analysis in an intensive care unit. *The Journal of American Medical Association*, 282, 18: 1745-1751
- Chambers H.F. 1997. Methicillin-resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 4: 781-791
- Coia J.E., Duckworth G.J., Edwards D.I., Farrington M., Fry C., Humphreys H., Mallaghan C, Tucker D.R. 2006. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*, 63S: S1-S44
- Cooper B.S., Stone S.P., Kibbler C.C., Cookson B.D., Roberts J.A., Medley G.F., Duckworth G.J., Ali R., Ebrahim S. 2003. Systematic review of isolation policies in the hospital management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review of the literature with epidemiological and economic modelling. *Health Technology Assessment*, 7, 39: 1-4
- Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E.N., Schwaber M.J., Karchmer A.W., Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 53-59
- Crisostomo M.I., Westh H., Tomasz A., Chung M., Oliveira D.C., de Lencastre H. 2001. The evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 17: 9865-9870

- Davis K.A., Stewart J.J., Crouch H.K., Florez C.E., Hospenthal D.R. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 776-782
- Diederer B., van Duijn I., van Belkum A., Willemse P., van Keulen P., Kluytmans J. 2005. Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4: 1925-1927
- Duckworth G. 2003. Controlling methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *British Medical Journal*, 327: 1177-1178
- EARSS. 2005. EARSS annual report 2004. Bilthoven, Nizozemska, the European Antimicrobial Resistance Surveillance System.  
[http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/Annual\\_reports.jsp](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/Annual_reports.jsp) (24. maj 2006): 136 str.
- von Eiff C., Peters G., Heilmann C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infectious Diseases*, 2: 677-685
- Eigner U., Weizenegger M., Fahr A.M., Witte W. 2005. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5256-5262
- Elsayed S., Chow B.L., Hamilton N.L., Gregson D.B., Pitoud J.D.D., Church D.L. 2003. Development and validation of a molecular beacon probe-based real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127: 845-849
- Eveillard M., de Lassence A., Barnaud G., Ricard J-D., Joly-Guillou M-L. 2006.

- Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27, 2: 181-184
- Fang H., Hedin G. 2003. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 7: 2894-2899
- Francois P., Pittet D., Bento M., Pepey B., Vaudaux P., Lew D., Schrenzel J. 2003. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular method. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1: 254-260
- Gould I.M. 2005. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 61: 277-282
- van Griethuysen A., Bes M., Etinne 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
- Grisold A.J., Leitner E., Mühlbauer G., Marth E., Kessler H.H. 2002. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 7: 2392-2397
- Grmek-Košnik I., Ihan A., Dermota U., Rems M., Košnik M., Kolmos H.J. 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* from clinical specimens. *Journal of Hospital Infection*, 61: 155-161

- 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
- Hain-Lifescience. 2002. GenoType<sup>®</sup> MRSA combined molecular biological test system for the rapid identification of multiresistant staphylococci. Nehrem, Nemčija, Hain-Lifescience [http://www.hain-lifescience.com/pdf/305xx\\_infoheft.pdf](http://www.hain-lifescience.com/pdf/305xx_infoheft.pdf) (15. mar. 2006): 12 str.
- Hain-Lifescience. 2006. GenoType<sup>®</sup> MRSA Direct molecular genetic assay for the direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patient specimens. Nehren, Nemčija, Hain-Lifescience. [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de) (06. jan. 2006): 88 str.
- van Hal S.J., 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 GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2486-2490
- Hallin M., Maes N., Byl B., Jacobs F., Gheldre Y. D., Struelens M.J. 2003. Clinical impact of a PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3942-3944
- Harbarth S., Masuet-Aumatell C., Schrenzel J., Francois P., Akakpo C., Renzi G., Pugin J., Ricou B., Pittet D. 2006. Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study. *Critical Care*, 10, 1: R25 <http://ccforum.com/content/10/1R25> (15. mar. 2006): 8 str.

Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511

Huletsky A., Giroux R., Rossbach V., Gagnon M., Vaillancourt M., Bernier M., Gagnon F., Truchon K., Bastien M., Picard F.J., van Belkum A., Ouellette M., Roy P.H., Bergeron M.G. 2004. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5: 1857-1884

Jaffe R.I., Lane J.D., Albury S.V., Niemeyer D.M. 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

Jonas D., Speck M., Daschner F.D., Grundmann H. 2002. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 5: 1821-1823

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

Katayama Y., Robinson D.A., Enright M.C., Chambers H.F. 2005. Genetic background stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5: 2380-2383

Kearns A.M., Seiders P.R., Wheeler J., Freeman R., Seward M. 1999. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *Journal of Hospital Infection*, 43:



33-37

Kluytmans J. 2007. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the value of rapid tests. *Journal of Hospital Infections*, 65 (suppl. 2): 100-104

Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 3: 505-520

Krishnan P.U., Miles K., Shetty N. 2002. Detection of methicillin and mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates using conventional and molecular methods: a descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA. *Journal of Clinical Pathology*, 55: 745-748

Kohner P., Uhl J., Kolbert C., Persing D., Cockerill III F. 1999. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 9: 2952-2961

Kuehnert M.J., Hill H.A., Kupronis B.A., Tokars J.I., Solomon S.L., Jernigan D.B. 2005. Methicillin-resistant - *Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 6: 868-872

Levi K., Towner K.J. 2003. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood with the EVIGENE MRSA detection kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3890-3892

Louie L., Goodfellow J., Mathieu P., Glatt A., Louie M., Simor A.E. 2002. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex

- PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 8: 2786-2790
- Louie L., Matsumura S.O., Choi E., Louie M., Simor A.E. 2000. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 6: 2170-2173
- Lowy F. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 9: 1265-1273
- Lu P-L., Chin L-C., Peng C-F., Chiang Y-H., Chen T-P., Ma L., Siu L.K. 2005. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1: 132-139
- Maltezou H.C., Giamarellou H. 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 87-96
- Mellmann A., Friedrich A.W., Rosenkötter N., Rothgänger J., Karch H., Reintjes R., Harmsen D. 2006. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Medicine*, 3: e33: 348-355
- Nilsson P., Alexandersson H., Ripa T. 2005. Use of broth enrichment and real-time PCR to exclude the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical samples: a sensitive screening approach. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 1027-1034
- Paule S.M., Pasquariello A.C., Hacek D.M., Fisher A.G., Thomson Jr. R.B., Kaul K.R., Peterson L.R. 2004. Direct detection of *Staphylococcus aureus* from adult and neonate nasal swab specimens using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6, 3: 191-196

Pérez-Roth E., Claverie-Martín F., Villar J., Méndez-Álvarez S. 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 11: 4037-4041

Powledge T.M. 2004. The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education*, 28: 44-50

Rao G.G., Michalczyk P., Nayeem N., Walker G., Wigmore L. 2007. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in adult emergency admissions – a case for screening all patients? *Journal of Hospital Infection*, 66: 15-21

Rubinovitch B., Pittet D. 2001. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic 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

Sakoulas G., Gold H.S., Venkataraman L., Degirolami P.C., Eliopoulos G.M., Qian Q. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 11: 3946-3951

Salgado C.D., Farr B.M. 2006. What proportion of hospital patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are identified by clinical microbiological cultures? *Control and Hospital Epidemiology*, 27, 2: 116-121

Schuenck R.P., Lourenco M.C.S., Iório N.L.P., Ferreira A.L.P., Nouér S.A., Santos K.R.N. 2006. Improved and rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage using selective broth and multiplex PCR. *Research in Microbiology*, 157: 971-975

Seme K. 2002. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-146

Skov R.L., Pallesen L.V., Poulsen R.L., Espersen F. 1999. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 467-475

Smyth R.W., Kahlmeter G., Liljequist B.O., Hoffman B. 2001. Methods for identifying methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 48: 103-107

Strachan T., Read A.P. 1999. *Nucleic acid hybridization assays*. V: *Human molecular genetics* 2. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & sons Inc. Oxford, Bios Scientific Publishers ltd.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg> (11. maj 2006) str. 95-119

Stratidis J., Bia F.J., Edberg S.C. 2007. Use of real time polymerase chain reaction for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58: 199-202

Swenson J.M., Williams P.P., Killgore G., O'Hara C.M., Tenover F.C. 2001. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 10: 3785-3788

- Tiemersma E.W., Bronzwaer S.L.A.M., Lyytikäinen O., Degener J.E., Schrijnemakers P., Bruinsma N., Monen J., Witte W., Grundmann H. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 9: 1627-1634
- Vannuffel P., Laterre P.F., Bouyer M., Gigi J., Vandercam B., Reynaert M., Gala J.L. 1998. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 8: 2366-2368
- 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
- Wernitz M.H., Keck S., Swidsinski S., Schulz S., Veit S.K. 2005. Cost analysis of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers in the context of diagnosis related groups (DRG) payment. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 466-471
- Wernitz M.H., Swidsinski S., Weist K., Sohr D., Witte W., Franke K-P., Roloff D., Rüdén H., Veit S.K. 2005. Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 457-465
- Whalley K.F., Modrusan Z., McNevin J.P., Marostenmaki J., Zin B., Bekkaoui F. 2000. Rapid solid-phase immunoassay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 7: 2525-2529

Wichelhaus T.A., Kern S., Scäfer V., Brade V. 1999. Rapid detection of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3: 690-693

Wielders C.L.C., Fluit A.C., Brisse S., Verhoef J., Schmitz F.J. 2002. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 11: 3970-3975

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

Wyllie D.H., Peto T.E.A., Crook D. 2005. MRSA bacteraemia in patients on arrival in hospital: a cohort study in Oxfordshire 1997-2003. *British Medical Journal*, 331: 992-997

## ZAHVALA

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med. za pomoč, spodbudo, nasvete, usmerjanje in potrpežljivost pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi prof. Mariu Poljaku, dr. med. za recenzijo diplomskega dela.

Za pomoč in usmerjanje pri laboratorijskem delu se zahvaljujem mag. Tjaši Čretnik dr. med., mag. Borutu Juteršku, univ. dipl. mikrobiol. in Špeli Justin, univ. dipl. mikrobiol. Zahvaljujem se tudi Oddelku za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Celje, da so mi omogočili delo v laboratoriju in vsem, ki so pripomogli k temu, da sem se v laboratoriju dobro počutila.

Posebna zahvala pa velja družini in prijateljem, ki so mi ves čas študija in nastajanja diplomskega dela stali ob strani, me podpirali in spodbujali ter verjeli vame. Najlepša hvala!