

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nataša ŠVENT-KUČINA

**ODPORNOST PROTI METICILINU, VIRULENTNI
DEJAVNIKI IN GENETSKA RAZNOLIKOST
IZOLATOV *Staphylococcus aureus*, OSAMLJENIH PRI
BOLNIKI Z OKUŽBO MEHKIH TKIV IN KOŽE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIOMEDICINA
ZNANSTVENO PODROČJE MIKROBIOLOGIJA

Nataša ŠVENT-KUČINA

**ODPORNOST PROTI METICILINU, VIRULENTNI DEJAVNIKI IN
GENETSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV *Staphylococcus aureus*,
OSAMLJENIH PRI BOLNIKIHZ OKUŽBO MEHKIH TKIV IN KOŽE**
DOKTORSKA DISERTACIJA

**METHICILLIN RESISTANCE, VIRULENCE FACTORS AND GENETIC
DIVERSITY OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM PATIENTS
WITH A SKIN AND SOFT-TISSUE INFECTION**
DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 28. seje Komisije za doktorski študij z dne 16.05.2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20.01.2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na **Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, znanstveno področje mikrobiologije**. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Katja Seme, dr. med., in za somentorico prof. dr. Dragica Maja Smrke, dr. med.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani (IMI). Statistične analize so bile opravljene na Inštitutu za biostatistiko in medicinsko informatiko Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, in na IMI. Odvzem vzorcev pri bolnikih z okužbo kože in mehkih tkiv (bris nosu in bris rane) je bil opravljen na Kliničnem oddelku za kirurške okužbe Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Odvzem vzorcev (bris nosu) pri zdravih osebah je bil opravljen na Zavodu za varstvo pri delu v Ljubljani.

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

Somentorica: prof. dr. Dragica Maja SMRKE, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN, univ. dipl. biolog
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIČ-SABLJIČ, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Članica: doc. dr. Irena ZDOVC, dr. vet. med.
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora: 15.07.2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nataša Švent-Kučina

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK 579.61:615.33.051.8:557.2.08(043)=163.6
 KG *Staphylococcus aureus*/ okužbe kože in mehkih tkiv/ MLST/ *spa*-tip/ virulentni dejavniki/ toksini/ *pvl*/ *lukSF-PV*/ antibiotiki/ odpornost proti antibiotikom
 AV ŠVENT-KUČINA, Nataša, dr. med.
 SA SEME, Katja (mentorica)/ SMRKE, Dragica Maja (somentorica)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje mikrobiologije
 LI 2016
 IN ODPORNOST PROTI METICILINU, VIRULENTNI DEJAVNIKI IN GENETSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV *Staphylococcus aureus*, OSAMLJENIH PRI BOLNIKIHZ OKUŽBO MEHKIH TKIV IN KOŽE
 TD Doktorska disertacija
 OP XII, 104 str., 11 pregl., 12 sl., 4 pril., 151 vir.
 IJ SI
 JI sl/en
 AI *Staphylococcus aureus* spada med poglavitne povzročitelje okužb kože in mehkih tkiv (OKMT). V zadnjih dveh desetletjih proti meticilinu odporen *S. aureus* iz domačega okolja (CA MRSA) povzroča večje število in epidemije OKMT. V tem doktorskem delu smo želeli ugotoviti prevalenco CA MRSA pri OKMT v Sloveniji, razlike med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz ran pri bolnikih z OKMT (SAb), in izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (SAk), ter sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz ran in nosu pri istem bolniku. V ta namen smo prospektivno odvzeli brise ran in nosu 461 bolnikom z OKMT in brise nosu 451 zdravim osebam ter tako zbrali 344 izolatov *S. aureus*. Izolatom smo določili občutljivost za antibiotike, sekvenčne tipe/klonalne komplekse (CC), *spa*-tipe in toksinski profil, slednjega z ugotavljanjem prisotnosti genov za Panton-Valentinov leukocidin (*pvl* (*lukSF-PV*)), toksin toksičnega šoka 1, stafilokokne enterotoksine od A do G, stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J in toksin alfa. OKMT, povzročeno s *S. aureus*, smo dokazali pri 23,6 % bolnikov. Ugotovili smo, da je proti meticilinu odporen *S. aureus* redek (2,8 %) povzročitelj OKMT ter da je večina SAb in SAk odpornih le proti penicilinu. Med SAb in SAk smo našli zelo heterogene izolate, ki so pripadali številnim CC in *spa*-tipom, večina pa je spadala med sedem poglavitnih humanih CC. Z izjemo CC121 in CC15 so bili CC enakomerno zastopani med SAb in SAk. CC121 smo pogosteje dokazali med SAb (22,0 % SAb proti 3,0 % SAk, p-vrednost < 0,0001), CC15 smo pogosteje dokazali med SAk (0,9 % SAb proti 3,0 % SAk, p-vrednost 0,0294). Podobno kot drugod po svetu je tudi pri nas med povzročitelji OKMT najpogostejši *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven za meticilin občutljiv *S. aureus*, ki spada v CC121. Med SAk je bil najpogostejši zelo hetrogen CC45. Poglavitni *spa*-tip med SAb in SAk je bil t091. Med SAb smo pogosteje dokazali *pvl* (*lukSF-PV*) (31,2 % SAb proti 3,6 % SAk, p-vrednost < 0,0001), gen za stafilokokni enterotoksin C pa med SAk (1,6 % SAb proti 17,0 % SAk, p-vrednost 0,0006). Pri 64,3 % bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz obeh kužnin, smo dokazali sorodna seva. Z analizo demografskih, epidemioloških in kliničnih podatkov o bolnikih smo ugotovili, da so bile med OKMT najpogostejše okužbe podkožja ter da na razvoj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, pomembno vplivajo starost in število družinskih članov v gospodinjstvu. Verjamemo, da bodo zbrani podatki koristni za oblikovanje smernic za predpisovanje protimikrobnih zdravil v Sloveniji ter za razumevanje populacijske strukture in širjenja *S. aureus* na nacionalni in mednarodni ravni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC 579.61:615.33.051.8:557.2.08(043)=163.6
 CX *Staphylococcus aureus*/ skin and soft-tissue infections/ MLST/ *spa* type/ virulence factors/ toxins/ *pvl*/ *lukSF-PV*/ antibiotics/ antimicrobial susceptibility
 AU ŠVENT-KUČINA, Nataša
 AA SEME, Katja (supervisor)/ SMRKE, Dragica Maja (co-advisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field Microbiology
 PY 2016
 TI METHICILLIN RESISTANCE, VIRULENCE FACTORS AND GENETIC DIVERSITY OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM PATIENTS WITH A SKIN AND SOFT-TISSUE INFECTION
 DT Doctoral dissertation
 NO XII, 104 p., 11 tab., 12 fig., 4 ann., 151 ref.
 LA Sl
 AL sl/en
 AB *Staphylococcus aureus* is one of the leading causes of skin and soft-tissue infections (SSTIs). In the last two decades community associated methicillin resistant *S. aureus* (CA MRSA) has been causing an increase in SSTI incidence and epidemics. The aim of the doctoral thesis is to determine the prevalence of CA MRSA in SSTIs in Slovenia and differences between *S. aureus* isolates from wound samples of SSTI patients (SA_{pg}) and *S. aureus* isolates from nasal samples of healthy carriers (SA_{cg}), as well as relatedness of *S. aureus* isolates from wound and nasal samples in the same patient. To this end we prospectively took wound and nasal samples from 461 SSTI patients and 451 nasal samples from healthy individuals, collecting 344 *S. aureus* isolates. We determined the antimicrobial susceptibility, sequence types/clonal complexes (CC), *spa* types and the toxin profile, the latter by detecting the presence of genes for Pantone-Valentine leukocidin (*pvl* (*lukSF-PV*)), toxic shock syndrome toxin 1, staphylococcal enterotoxins A to G, staphylococcal enterotoxins like proteins H to J and alpha toxin. SSTIs caused by *S. aureus* were confirmed in 23.6% of patients. We observed that methicillin resistant *S. aureus* was a rare (2.8%) cause of SSTIs and that the majority of SA_{pg} and SA_{cg} were resistant only to penicillin. Among SA_{pg} and SA_{cg} we found highly heterogeneous isolates belonging to numerous CCs and *spa* types, but nevertheless the majority belonged to seven main human CCs. With the exception of CC121 and CC15, all CCs were evenly represented among SA_{pg} and SA_{cg}. CC121 was more often determined among SA_{pg} (22.0% SA_{pg} vs. 3.0% SA_{cg}, p-value < 0.0001), CC15 was more often determined among SA_{cg} (0.9% SA_{pg} vs. 3.0% SA_{cg}, p-value 0.0294). Similarly as elsewhere in the world, the most frequent cause of SSTIs in our country is the *pvl* (*lukSF-PV*)-positive methicillin susceptible *S. aureus* belonging to CC121. Among SA_{cg} the very heterogeneous CC45 was most common. The main *spa* type among SA_{pg} and SA_{cg} was t091. Among SA_{pg} *pvl* (*lukSF-PV*) was most frequently identified (31.2% SA_{pg} vs. 3.6% SA_{cg}, p-value < 0.0001), and the staphylococcal enterotoxin C gene was more often identified among SA_{cg} (1.6% SA_{pg} vs. 17.0% SA_{cg}, p-value 0.0006). In 64.3% patients with *S. aureus* isolated from both samples related strains were confirmed. The analysis of demographic, epidemiological and clinical data on patients has shown that subcutaneous tissue infections were most common among SSTIs, and the development of SSTIs caused by *S. aureus* is significantly affected by age and number of household members. We believe that collected data will be useful for developing antimicrobial drug prescription guidelines in Slovenia, and understanding the population structure and spread of *S. aureus* at the national and international level.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 <i>S. aureus</i> kot patogen	4
2.1.2 Občutljivost <i>S. aureus</i> za antibiotike	5
2.1.3 Populacijska genetika in epidemiologija	7
2.1.3.1 Populacijska genetika.....	7
2.1.3.2 Epidemiologija.....	8
2.1.4 Virulentni dejavniki <i>S. aureus</i>	9
2.1.4.1 Citolizini.....	10
2.1.4.1.1 Hla.....	10
2.1.4.1.2 PVL.....	10
2.1.4.2 Superantigeni.....	11
2.1.4.3 Eksfoliativni toksini.....	12
2.2 MOLEKULARNE GENOTIPIZACIJSKE METODE.....	12
2.2.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST)	13
2.2.2 Tipizacija <i>spa</i>	16
2.2.3 Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)	17
2.3 OKUŽBE KOŽE IN MEHKIH TKIV.....	18
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 IZJAVA O ETIKI.....	21
3.2 PREISKOVANCI IN BAKTERIJSKI IZOLATI.....	21
3.2.1 Izvor izolatov MRSA	22
3.3 KULTIVACIJA, IDENTIFIKACIJA IN SHRANJEVANJE BAKTERIJSKIH IZOLATOV.....	23
3.4 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE.....	23
3.4.1 Disk difuzijska metoda po Kirby-Bauerju	23
3.4.2 Določanje odpornosti proti meticilinu	24
3.4.3 Ugotavljanje odpornosti izolatov MRSA proti glikopeptidnim antibiotikom s predifuzijsko metodo	24
3.4.4 D-test	25
3.4.5 Ugotavljanje prisotnosti beta laktamaze	25
3.4.6 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)	25
3.5 MOLEKULARNE METODE.....	25
3.5.1 Osamitev bakterijske DNA	25
3.5.2 Elektroforeza v gelu	26
3.5.3 Molekularne genotipizacijske metode	26
3.5.3.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST).....	26
3.5.3.1.1 PCR pri MLST.....	27
3.5.3.1.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri MLST.....	27

3.5.3.1.3	Sekvenciranje	28
3.5.3.1.4	Določanje sekvenčnega tipa (ST)	28
3.5.3.2	Tipizacija <i>spa</i>	28
3.5.3.2.1	PCR pri tipizaciji <i>spa</i>	29
3.5.3.2.2	Dokazovanje pridelkov PCR pri tipizaciji <i>spa</i>	29
3.5.3.2.3	Sekvenciranje	29
3.5.3.2.4	Določanje <i>spa</i> -tipa	30
3.5.3.3	Tipizacija <i>SCCmec</i>	30
3.5.3.3.1	PCR pri tipizaciji <i>SCCmec</i>	30
3.5.3.3.2	Dokazovanje pridelkov PCR pri tipizaciji <i>SCCmec</i>	31
3.5.3.4	Določanje <i>mecC</i>	32
3.5.3.4.1	PCR pri določanju <i>mecC</i>	32
3.5.3.4.2	Dokazovanje pridelkov PCR pri določanju <i>mecC</i>	33
3.5.3.5	Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom <i>SmaI</i>	33
3.5.3.5.1	Osamitev DNA iz čiste bakterijske kulture <i>S. aureus</i> z metodo vključitve v gel	33
3.5.3.5.2	Makrorestrikcija z encimom <i>SmaI</i>	34
3.5.3.5.3	Postopek elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE)	35
3.5.3.5.4	Ugotavljanje sorodnosti izolatov	35
3.5.4	Določanje genov za virulentne dejavnike	35
3.5.4.1	Določanje genov za citolizin Hla	35
3.5.4.1.1	PCR v realnem času pri določanju genov za Hla	36
3.5.4.1.2	Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za Hla	36
3.5.4.2	Določanje genov za superantigen TSST-1	37
3.5.4.2.1	PCR v realnem času pri določanju genov za TSST-1	38
3.5.4.2.2	Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za TSST-1	38
3.5.4.3	Določanje genov za citolizin PVL	39
3.5.4.3.1	PCR v realnem času pri določanju genov za PVL	39
3.5.4.3.2	Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za PVL	40
3.5.4.4	Določanje genov za enterotoksine	41
3.5.4.4.1	PCR pri določanju genov za enterotoksine	42
3.5.4.4.2	Dokazovanje pridelkov PCR pri določanju genov za enterotoksine	43
3.5.4.5	Določanje genov za eksfoliativna toksina A in B	44
3.6	STATISTIČNE METODE	44
3.6.1	Primerjava SAb in SAK	44
3.6.2	Analiza demografskih, epidemioloških in kliničnih podatkov o bolnikih	45
4	REZULTATI	47
4.1	SPLOŠNI PODATKI O PREISKOVANCIH IN BAKTERIJSKIH IZOLATIH	47
4.2	OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE	48
4.3	TIPIZACIJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)	50
4.4	TIPIZACIJA <i>spa</i>	55
4.5	TIPIZACIJA <i>SCCmec</i>	56
4.6	MOLEKULARNA ANALIZA MRSA	57
4.7	ELEKTROFOREZA V PULZIRAJOČEM ELEKTRIČNEM POLJU (PFGE)	57
4.8	GENI ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE	59
4.8.1	Geni za citolizin Hla	59
4.8.2	Geni za citolizin PVL	59
4.8.3	Superantigeni	59
4.8.3.1	Superantigenski vzorci	60
4.9	PREGLED CC	61
4.9.1	CC45-ST45	62

4.9.2 CC7-ST7	62
4.9.3 CC121-ST121 in CC121-ST946	63
4.9.4 CC22-ST22 in CC22-ST867	63
4.9.5 CC15-ST15	64
4.9.6 CC30-ST30	64
4.9.7 CC34-ST34	68
4.9.8 Ostali CC	68
4.9.8.1 CC5-ST5.....	68
4.9.8.2 CC8-ST8.....	69
4.9.8.3 CC12-ST12.....	69
4.9.8.4 CC25-ST26.....	69
4.9.8.5 CC398-ST398.....	70
4.10 ANALIZA DEMOGRAFSKIH, EPIDEMIOLOŠKIH IN KLINIČNIH PODATKOV O BOLNIKI	70
4.10.1 Demografski podatki	70
4.10.2 Klinični podatki	70
4.10.3 Epidemiološki podatki	74
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	75
5.1 DELEŽ OKUŽB S <i>S. aureus</i>	75
5.2 PRIMERJAVA SAb IN SAK.....	76
5.2.1 Primerjava SAb in SAK na osnovi občutljivosti za antibiotike	77
5.2.2 Primerjava SAb in SAK na osnovi MLST	77
5.2.3 Primerjava SAb in SAK na osnovi tipizacije <i>spa</i>	78
5.2.4 Primerjava SAb in SAK na osnovi genov za virulentne dejavnike	79
5.2.4.1 <i>pvl</i> (<i>lukSF-PV</i>).....	80
5.2.4.2 <i>hla</i>	80
5.2.4.3 <i>sec</i>	81
5.2.4.4 <i>sea, seb, sed, see, seh</i> in <i>selj</i>	81
5.2.4.5 <i>tst</i>	82
5.2.4.6 Superantigenski vzorci.....	82
5.3 UGOTAVLJANJE SORODNOSTI IZOLATOV <i>S. aureus</i>, OSAMLJENIH IZ RANE IN NOSU PRI ISTEM BOLNIKU Z OKMT	83
5.4 ANALIZA DEMOGRAFSKIH, EPIDEMIOLOŠKIH IN KLINIČNIH PODATKOV O BOLNIKI	84
5.5 SKLEPI	85
6 POVZETEK (SUMMARY)	87
6.1 SUMMARY.....	88
7 VIRI	90
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje sedmih hišnih genov, in velikosti pridelkov PCR.....	28
Pregl. 2: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje tipov SCC <i>mec</i> , in velikosti pridelkov PCR.....	31
Pregl. 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje genov <i>mecA</i> in <i>femB</i> , <i>mecI</i> in <i>mecR1</i> , <i>ccrA</i> in <i>ccrB</i> ter <i>blaZ</i> , in velikosti pridelkov PCR.....	33
Pregl. 4: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje genov <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> in <i>selj</i> , velikosti pridelkov PCR in seznam pozitivnih kontrol.....	43
Pregl. 5: Prikaz vzorcev občutljivosti za in odpornosti proti različnim antibiotikom (rezistotipov) pri izolatih <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenih iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.....	49
Pregl. 6: Prikaz deleža za antibiotike občutljivih izolatov <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenih iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.....	50
Pregl. 7: Prevalenca klonalnih kompleksov, sekvenčnih tipov in <i>spa</i> -tipov med izolati <i>S. aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.....	52
Pregl. 8: Prevalenca genov za posamezne toksine med izolati <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.....	60
Pregl. 9: Pregled superantigenskih vzorcev, ki smo jih našli med izolati <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.....	61
Pregl. 10: Razporeditev klonalnih kompleksov, sekvenčnih tipov, <i>spa</i> -tipov (z označenimi novimi <i>spa</i> -tipi), tipov SCC <i>mec</i> , virulentnih genov (s superantigenskimimi vzorci) ter vzorci občutljivosti za in odpornosti proti antibiotikom (rezistotipi) med izolati <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev, in diagnoze bolnikov.	65
Pregl. 11: Primerjava demografskih, kliničnih in epidemioloških podatkov o bolnikih, zbranih iz vprašalnikov in spremnih listov za mikrobiološke preiskave.....	72

KAZALO SLIK

Sl. 1: Mikroskopski preparat <i>Staphylococcus aureus</i> z metodo barvanja po Gramu, 1000-kratna povečava (Foto: Pirš M., 2008).....	3
Sl. 2: <i>Staphylococcus aureus</i> , rast na krvnem agarju (Foto: Pirš M., 2008).....	4
Sl. 3: Princip tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (ang. multilocus sequence typing, MLST) (Chambers in Deleo, 2009: 633).....	15
Sl. 4: Princip tipizacije <i>spa</i> (Applied Maths, 2016).....	17
Sl. 5: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za Hla z metodo PCR v realnem času.....	37
Sl. 6: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za TSST-1 z metodo PCR v realnem času.....	39
Sl. 7: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za PVL z metodo PCR v realnem času.....	41
Sl. 8: Primer rezultatov metode multipleks PCR za določanje <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> in <i>selj</i>	44
Sl. 9: Prikaz deležev (%) <i>S. aureus</i> pozitivnih in negativnih bolnikov (zgoraj) ter zdravih oseb (spodaj).....	48
Sl. 10: Razporeditev klonalnih kompleksov (CC)/sekvenčnih tipov (ST) med izolati <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv (SAb) ter iz nosu zdravih nosilcev (SAk).....	51
Sl. 11: Primerjava razporeditve klonalnih kompleksov (CC)/sekvenčnih tipov (ST) in <i>spa</i> -tipov med izolati <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv (A), ter izolati <i>S. aureus</i> , osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (B).....	56
Sl. 12: Drevo sorodnosti in makrorestriksijski vzorci (pulzotipi) po metodi gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom <i>Sma</i> I, klonalni kompleksi (CC), <i>spa</i> -tipi in toksinski profil 39 izolatov <i>Staphylococcus aureus</i> , osamljenih iz primarnih plošč (tri ali štiri kolonije na vzorec) pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb z namenom ugotavljanja možne pristranosti.....	58

KAZALO PRILOG

Pril. A: Vprašalnik za bolnike.

Pril. B: Vprašalnik za zdrave osebe.

Pril. C: Prikaz molekularnih značilnosti 39 izolatov *Staphylococcus aureus*, osamljenih pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb, pri katerih smo iz primarne plošče osamili tri do štiri kolonije *S. aureus* z namenom ugotavljanja možne pristranosti, ker smo pri ostalih vzorcih iz primarnih plošč osamili le po eno kolonijo *S. aureus*.

Pril. D: Drevo sorodnosti po metodi gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*, klonalni kompleksi (CC) in *spa*-tipi izolatov *Staphylococcus aureus*, ki smo jih osamili iz vzorcev rane in nosu pri 70 bolnikih.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CA MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> iz domačega okolja (ang. community-associated methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
CC	klonalni kompleks (ang. clonal complex)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
ETA	eksfoliativni toksin A
<i>eta</i>	gen za ekxfoliativni toksin A
ETB	eksfoliativni toksin B
<i>etb</i>	gen za ekxfoliativni toksin B
ETD	eksfoliativni toksin D
<i>etd</i>	gen za ekxfoliativni toksin D
HA MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> iz bolnišničnega okolja (ang. hospital-associated methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
HGT	horizontalni prenos genov (ang. horizontal gene transfer)
Hla	toksin alfa, hemolizin alfa (ang. alpha-toxin, hemolysin alpha)
<i>hla</i>	gen za toksin alfa
LA MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> rejnih živali (ang. livestock-associated methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MGE	mobilni genetski elementi (ang. mobile genetic elements)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (ang. multilocus sequence typing)
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MSSA	za meticilin občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)
mSTŠ	menstrualni sindrom toksičnega šoka
OKMT	okužbe kože in mehkih tkiv
OSR	Osrednjeslovenska regija
PVL	Panton-Valentinov leukocidin
<i>pvl</i> (<i>lukSF-PV</i>)	gen za Panton-Valentinov leukocidin
rezistotip	vzorec občutljivosti za in odpornosti proti različnim antibiotikom
SAb	izolati <i>S. aureus</i> , osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov
SAk	izolati <i>S. aureus</i> , osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev

SCC <i>mec</i>	stafilokokni kasetni kromosom <i>mec</i> (ang. staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>)
SE A-G	stafilokokni enterotoksini od A do G (ang. staphylococcal enterotoxins A-G)
<i>sea, seb, sec, sed, see, seg</i>	geni za stafilokokne enterotoksine od A do G
SE-1 H-J	stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J (ang. staphylococcal enterotoxin-like proteins H-J)
<i>seh, sei, selj</i>	geni za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J
SSR	kratka nukleotidna zaporedja polimorfnega odseka X gena za protein A (<i>spa</i>), ki ga sestavlja spremenljivo število 24 bp velikih ponovitev nukleotidnih zaporedij (ang. short sequence repeat)
ST	sekvenčni tip (ang. sequence type)
STŠ	sindrom toksičnega šoka
tipizacija <i>spa</i>	sekvenčna analiza spremenljivega polimorfnega odseka gena X za protein A (lokus <i>spa</i>)
TSST-1	toksin toksičnega šoka 1 (ang. toxic shock syndrome toxin-1)
<i>tst</i>	gen za toksin toksičnega šoka 1
ZPO	z zdravstvom povezane okužbe

1 UVOD

Staphylococcus aureus je za človeka pomembna bakterijska patogena vrsta in pomemben komezal, saj je pri približno tretjini ljudi stalno prisoten v nosu kot del normalne mikrobiote. Pri človeku lahko povzroči različne okužbe tako v domačem kot tudi bolnišničnem okolju in spada med poglavitne povzročitelje okužb kože in mehkih tkiv (OKMT). V zadnjih dveh desetletjih smo priča večjemu številu OKMT v domačem okolju, ki jih povzročajo izolati *S. aureus*, odporni proti meticilinu, iz domačega okolja (ang. community-associated methicillin-resistant *S. aureus*, CA MRSA), ki so se v nekaterih območjih razširili tudi v bolnišnično okolje (Chambers in Deleo, 2009). Nosilstvo *S. aureus* je pomemben dejavnik tveganja za nastanek okužbe (Schlievert in sod., 2010; Xie in sod., 2011). Nastanek in obseg okužbe sta povezana tudi z imunskim odgovorom gostitelja ter sposobnostjo hitrega prilagajanja *S. aureus* na neugodne razmere v okolju s pridobivanjem genov za virulentne dejavnike in razvojem odpornosti proti antibiotikom (Peacock in sod., 2002; Otter in French, 2010; Schlievert in sod., 2010).

Z molekularnimi genotipizacijskimi metodami so ugotovili veliko genetsko raznolikost izolatov *S. aureus*, ki pripadajo različnim klonalnim kompleksom (CC), kakor tudi njihovo razširjenost v posameznih geografskih področjih (Deleo in Chambers, 2009; Lindsay, 2013). Za molekularne in epidemiološke raziskave *S. aureus* se, zaradi dobre ponovljivosti in medlaboratorijske primerljivosti, pogosto uporabljata tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (ang. multilocus sequence typing, MLST) in sekvenčna analiza spremenljivega polimorfnega odseka X gena za protein A (tipizacija *spa*). Izbrane genotipizacijske metode zaradi prosto dostopnih podatkov na svetovnem medmrežju omogočajo primerjavo podatkov na svetovni ravni, kar pripomore h globalnemu raziskovanju širjenja uspešnih klonov in raziskovanju porazdelitve posameznih klonov (Strommenger in sod., 2008; Grundmann in sod., 2014).

Pri večini nezapletenih OKMT se ne izvaja rutinski odvzem vzorcev za mikrobiološke preiskave za dokaz povzročitelja, zato nimamo natančnih podatkov o prevalenci CA MRSA (Pulia in sod., 2014). Po do sedaj dostopnih podatkih iz literature ni poznana razširjenost CA MRSA pri OKMT v Sloveniji. Ravno tako skopi so podatki o občutljivosti proti antibiotikom, virulentnem potencialu in molekularni epidemiologiji izolatov *S. aureus*, ki povzročajo OKMT v Sloveniji. Zbranih je nekaj podatkov o kliničnih izolatih CA MRSA in izolatih *S. aureus*, osamljenih iz hemokultur (Müller-Premru in sod., 2005; Grmek-Košnik in sod., 2005; Cvitković-Špiš in sod., 2009; Dermota in sod., 2015).

1.1 NAMEN DELA

Z raziskovalnim doktorskim delom smo želeli prospektivno zbrati izolate *S. aureus* iz ran in nosu pri bolnikih z OKMT in izolate *S. aureus* iz nosu zdravih oseb ter ugotoviti prevalenco

CA MRSA pri OKMT v Sloveniji. Hoteli smo opredeliti in primerjati izolate *S. aureus*, osamljene iz vzorcev ran v skupini bolnikov (SAb), in izolate *S. aureus*, osamljene iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev (SAk). Za namene primerjalne analize smo želeli SAb in SAk določiti občutljivost za antibiotike, sekvenčni tip (ST) in CC, *spa*-tip in toksinski profil oziroma prisotnost genov za naslednje virulentne dejavnike: Panton-Valentinov leukocidin (PVL), *pvl* (*lukSF-PV*); toksin toksičnega šoka 1 (TSST-1), *tst*; stafilokokne enterotoksine od A do G (SE A-G), *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*; stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J (SE-I H-J), *seh*, *sei*, *selj*; toksin alfa (Hla), *hla* in eksfoliativna toksina A in B (ETA in ETB), *eta* in *etb*. Pri izolatih *S. aureus*, odpornih proti meticilinu (MRSA), smo želeli določiti tudi tip SCC*mec* (stafilokokni kasetni kromosom *mec*). Hoteli smo ugotoviti sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz rane in nosu pri istem bolniku z OKMT, z metodo gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (ang. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *Sma*I. Želeli smo analizirati demografske, epidemiološke in klinične značilnosti bolnikov z OKMT ter ugotoviti morebitno povezavo teh značilnosti z nastankom OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

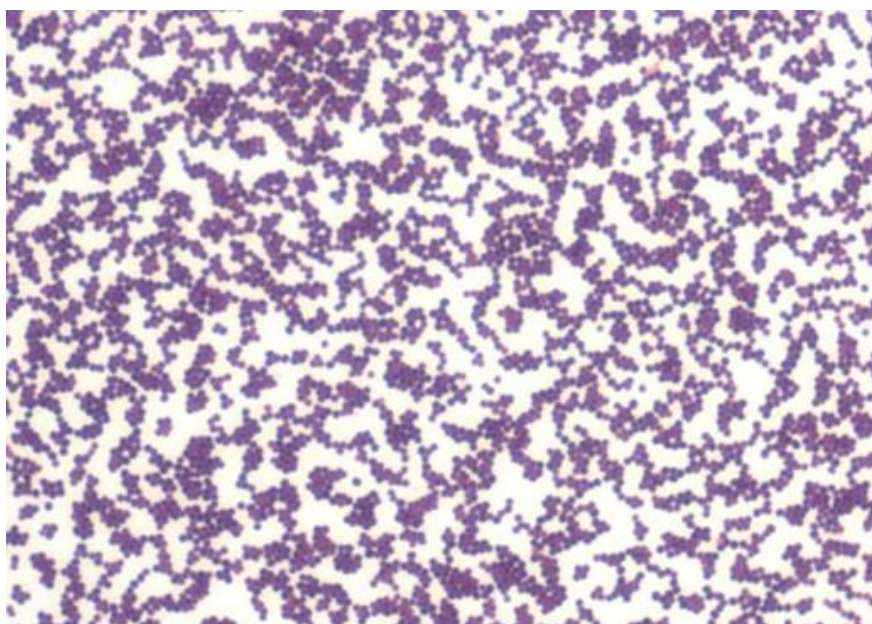
V doktorskem delu smo preverjali naslednje hipoteze:

- V Sloveniji med SAb in SAk prevladujejo za meticilin občutljivi *S. aureus* (MSSA).
- SAk so genetsko bolj raznoliki in pripadajo več različnim CC kot SAb.
- Pri SAb so pogosto prisotni *pvl* (*lukSF-PV*), *hla* in redko *eta*, *etb*, medtem ko so *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* in *selj* enako razporejeni med SAb in SAk.
- Izolati *S. aureus*, osamljeni iz brisov ran in nosu pri istem bolniku z OKMT, so enaki.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Staphylococcus aureus*

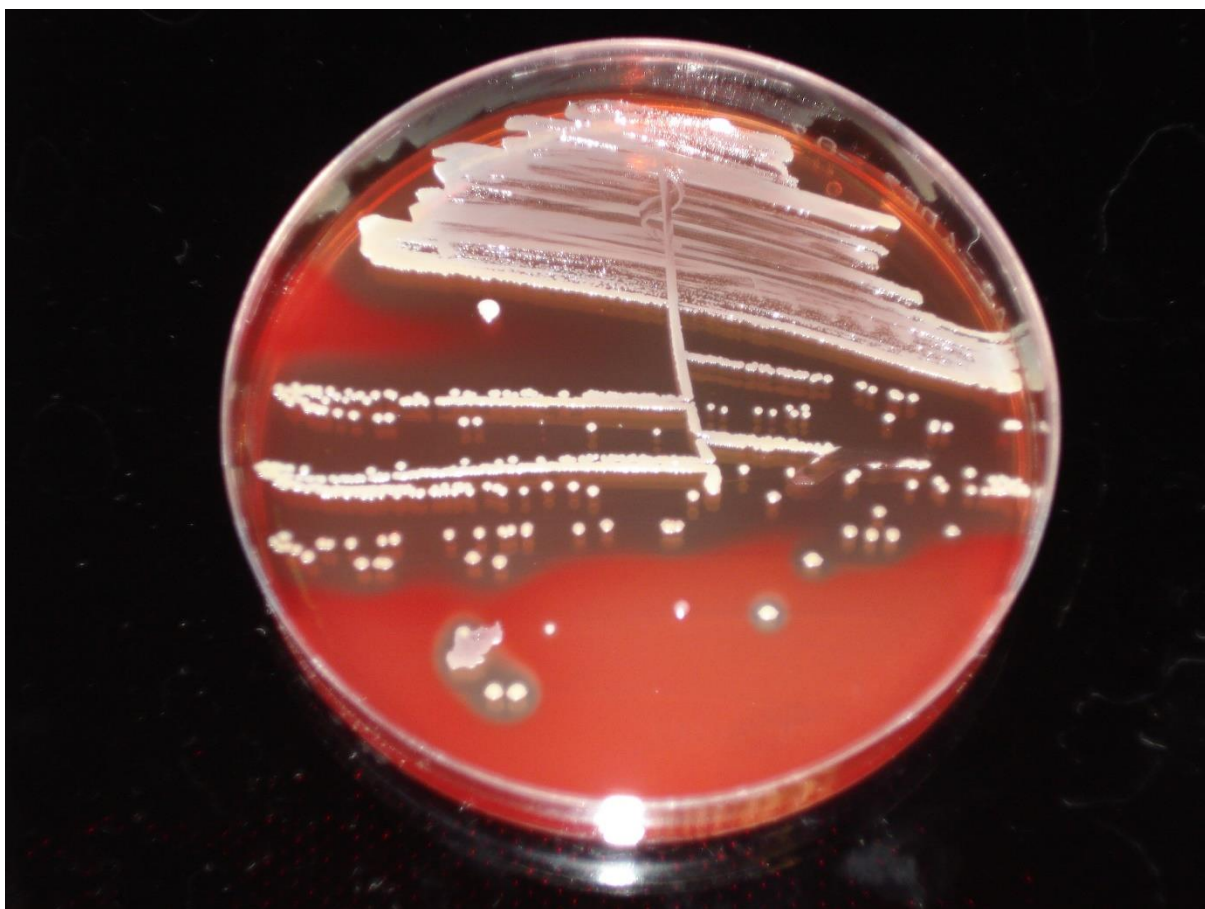
V rod *Staphylococcus* uvrščamo po Gramu pozitivne koke s premerom približno 1 µm, ki se urejajo v nepravilne gruče (Slika 1). Odkrili so jih leta 1880, delitev na koagulazno pozitivne in koagulazno negativne stafilokoke (KNS), ki temelji na prisotnosti plazemske koagulaze, so uvedli leta 1925 (Chambers in Deleo, 2009; Deurenberg in Stobbering, 2009; Xie in sod., 2011).



Slika 1: Mikroskopski preparat *Staphylococcus aureus* z metodo barvanja po Gramu, 1000-kratna povečava (Foto: Pirš M., 2008).

Figure 1: Microscopic slide of *Staphylococcus aureus* with Gram staining method, 1000x magnification (Photo: Pirš M., 2008).

Stafilokoki so negibljivi fakultativni anaerobi, ki bolje rastejo v aerobnem okolju, z izjemo *Staphylococcus saccharolyticus* in *S. aureus* subsp. *anaerobius*, ki sta anaerobna. *S. aureus* tvori encim koagulazo, ki fibrinogen pretvori v fibrin, zato ga uvrščamo med koagulazno pozitivne stafilokoke. Poleg koagulaze tvori še številne druge encime, med katerimi so pomembnejši katalaza, deoksiribonukleaza, hemolizin, stafilokinaza, hialuronidaza in fosfolipaza. Na neselektivnem krvnem agarju (KA) *S. aureus* po 24 urah inkubacije pri 37 °C zraste v obliki do 3 mm velikih, gladkih, rahlo izbočenih, belih ali zlatorumenih klonij, ki so lahko obdane z ozkim pasom popolne hemolize (Deurenberg in sod., 2007; Becker in von Eiff, 2011) (Slika 2).



Slika 2: *Staphylococcus aureus*, rast na krvnem agarju (Foto: Pirš M., 2008).
Figure 2: *Staphylococcus aureus*, growth on blood agar (Photo: Pirš M., 2008).

2.1.1 *S. aureus* kot patogen

Stafilokoki večinoma naseljujejo kožo in sluznice sesalcev in ptičev. Pri približno eni tretjini človeške populacije je *S. aureus* stalno prisoten kot komenzal, največkrat v nosni sluznici, lahko tudi na sluznici žrela ali na površini kože (Peacock in sod., 2001; Wertheim in sod., 2005a; van Belkum in sod., 2006; Willems in sod., 2011). Ljudje smo v stalnem stiku s *S. aureus*, zato smo razvili humoralni in verjetno tudi celični imunski odgovor na številne stafilokne antigene (npr. na različne virulentne dejavnike) (van Belkum in Schrenzel, 2014). Poglavitni način imunskega odgovora je nevtralizacija toksinov skupaj z opsonizacijo s pomočjo komplemента in fagocitozo bakterijskih celic (Spaulding in sod., 2013). Nosilstvo *S. aureus* je pomemben dejavnik tveganja za nastanek okužbe, ki je lahko posledica padca imunosti ali prekinjene integritete kože (Deleo in sod., 2010; Lindsay, 2014b).

S. aureus je poglaviti človeški bakterijski patogen. Kot patogen je lahko zelo uspešen, ker je pri človeku prisoten kot komenzal, je pogosto odporen proti antibiotikom in poseduje številne virulentne dejavnike (Uhlemann in sod., 2014). Povzroči lahko različne okužbe od površinskih do zapletenih okužb, kot so bakteriemija, vnetje spodnjih dihal, okužbe kosti in

sklepov, OKMT in življenje ogrožajoča stanja, kot sta nekrozantna pljučnica in nekrozantni fasciitis (Deleo in Chambers, 2009; Lindsay, 2014b; Tong in sod., 2015). V zadnjih petnajstih letih se je spremenila tudi vrsta kliničnih stanj, ki jih *S. aureus* najpogosteje povzroča. V bolnišnicah se je povečalo število infektivnih endokarditisov in okužb vsadkov, povzročenih z bolnišničnimi sevi proti meticilinu odpornih *S. aureus* (ang. hospital-associated methicillin-resistant *S. aureus*, HA MRSA), v domačem okolju je več OKMT, ki jih je povzročil CA MRSA (Tong in sod., 2015). Povzroča tudi bolezni in klinična stanja, ki so posledica izločanja in delovanja njegovih toksinov (npr. sindrom toksičnega šoka (STŠ), nekrozantna pljučnica in težji potek OKMT, bulozni impetigo in zastrupitve s hrano) (Lindsay in sod., 2006; Grundmann in sod., 2014). MRSA spada med poglavitne povzročitelje z zdravstvom povezanih okužb (ZPO). Povzroča predvsem bakteriemije in infektivne endokarditise, pljučnice, okužbe kirurškega mesta in okužbe vsadkov (Calfee, 2012; Tong in sod., 2015). Manjšina (do 10 %) teh okužb je življenje ogrožajočih (npr. sepsa in nekrozantna pljučnica) (Knox in sod., 2015). *S. aureus* lahko povzroči okužbe tudi pri govedu in prašičih (van Cleef in sod., 2011). Ljudje, ki so pogosto v stiku z rejnimi živalmi, so velikokrat nosilci sevov MRSA rejnih živali (ang. livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus*, LA MRSA), ki redko povzročijo okužbe pri človeku (Wulf in sod., 2008). Prenos LA MRSA s človeka na človeka sicer še ni dobro raziskan, vendar prenos med ljudmi nakazujejo številni primeri nosilstva LA MRSA pri osebah, ki so v stalnem stiku s prašiči, in njihovih družinskih članih (Bosch in sod., 2015). Znani so tudi primeri okužb z LA MRSA pri ljudeh, ki niso imeli nobenega stika z živalmi (Cuny in sod., 2015) in pojavljanje LA MRSA kot patogena v bolnišnicah (van de Sande-Bruinsma in sod., 2015).

Stafilokokne okužbe se pojavljajo posamično ali epidemično. Breme stafilokoknih okužb v številnih državah narašča tako v bolnišničnem kot v domačem okolju. Izvor bakterije je okužen človek ali nosilec (Chambers in Deleo, 2009). Prenos je v glavnem z neposrednim stikom, najpogosteje preko rok oziroma kože kolonizirane ali okužene osebe, možen je tudi prenos preko kontaminiranih površin in predmetov (Chambers in Deleo, 2009).

2.1.2 Občutljivost *S. aureus* za antibiotike

S. aureus lahko razvije odpornost proti številnim antibiotikom. Pred uvedbo penicilina v zdravljenje okužb leta 1940, je bila smrtnost zaradi okužb, povzročenih s *S. aureus*, 80 % (Deurenberg in sod., 2007). Antibiotiki domnevno predstavljajo največji selekcijski pritisk na *S. aureus*, zato se odporni sevi pogosto najprej pojavijo v bolnišnicah, kasneje pa lahko z dodatnimi prilagoditvami povzročajo okužbe tudi v domačem okolju. Število učinkovitih antibiotikov za zdravljenje okužb, povzročenih s *S. aureus*, se je zmanjševalo zaradi naraščajoče odpornosti proti penicilinu, meticilinu in nazadnje vankomicinu (Holden in sod., 2004; Otto, 2012).

Izolati, odporni proti penicilinu, so se začeli pojavljati kot povzročitelji okužb v domačem okolju od leta 1942 dalje. Po letu 1950 je bilo 80 % vseh izolatov *S. aureus* odpornih proti penicilinu. Večino okužb v domačem in bolnišničnem okolju je povzročil proti penicilinu odporen klon, ki so ga poimenovali fagotip 80/81. Pandemija okužb s fagotipom 80/81 se je umirila z uvedbo zdravljenja z meticilinom, vendar so kot povzročitelji okužb še vedno pogosti drugi sevi *S. aureus*, odporni proti penicilinu (Deurenberg in sod., 2007; Chambers in Deleo, 2009).

Prvi izolati MRSA so se pojavili po letu 1961, kmalu po uvedbi zdravljenja z meticilinom (Deurenberg in Stobberingh, 2009). Odpornost *S. aureus* proti meticilinu je posledica pridobitve *SCCmec*, na katerem se nahaja gen *mec*, ki nosi zapis za odpornost proti betalaktamskim antibiotikom (Chambers in Deleo, 2009). Poznanih je več različnih tipov *SCCmec* (od I do X), na katerih se, poleg gena *mecA*, nahajajo tudi geni za odpornost proti drugim antibiotikom (npr. aminoglikozidom, makrolidom) (Monecke in sod., 2011; Alibayov in sod., 2014). *SCCmec* I, II in III se pojavljajo predvsem pri bolnišničnih sevih, *SCCmec* IV in V pa sta večinoma prisotna pri sevih iz domačega okolja (Monecke in sod., 2011). Po letu 2011 so opisali nov, precej drugačen *SCCmec*, *SCCmec* XI, na katerem se nahaja gen *mecC*, kar potrjuje evolucijo na področju odpornosti (García-Álvarez in sod., 2011; Monecke in sod., 2011; Alibayov in sod., 2014). Po letu 1970 so se izolati MRSA pogosteje pojavljali kot patogeni v bolnišničnem okolju, predvsem omejeno število proti antibiotikom večkratno odpornih uspešnih klonov HA MRSA. Zaradi večjega števila okužb, povzročenih z večkratno odpornimi izolati MRSA, se je povečala uporaba vankomicina, kar je ponovno predstavlja selekcijski pritisk na *S. aureus*. Posledica so bili izolati MRSA z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin ali glikopeptidne antibiotike (ang. vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA; glycopeptide intermediate *S. aureus*, GISA) in celo nekateri izolati z visoko stopnjo odpornosti proti vankomicinu ali glikopeptidnim antibiotikom (ang. vancomycin resistant *S. aureus*, VRSA; glycopeptide resistant *S. aureus*, GRSA), ki so nastali zaradi prenosa genov *vanA* iz enterokokov in so ostali zamejeni le na nekaterih geografskih področjih (Chambers in Deleo, 2009; Calfee, 2012).

Po letu 1990 so se kot patogeni v domačem okolju prvič pojavili izolati MRSA, ki so bili bolj virulentni in odporni večinoma le proti beta laktamom (kloni CA MRSA) (Chambers in Deleo, 2009). Kasneje so se kloni CA MRSA v nekaterih območjih razširili tudi v bolnišnično okolje (Deurenberg in Stobberingh, 2009; Lindsay, 2013). V letu 2003 so prvič opisali kolonizacijo in okužbe z LA MRSA pri človeku. Prvi sevi LA MRSA so pripadali CC398, njihov izvor pa so bili prašiči in govedo (van Cleef in sod., 2011).

Chambers in Deleo (2009) sta pojav odpornosti pri *S. aureus* opisala kot štiri valove odpornosti, ki so se pojavili vsakih deset let; prvi z odpornostjo proti penicilinu; drugi z odpornostjo proti meticilinu in uspešnimi kloni HA MRSA; tretji z odpornostjo proti vankomicinu in četrti s pojavom klonov CA MRSA. Po letu 2003 smo s pojavom LA MRSA

in po letu 2011 s pojavom *mecC* priča dvema novima valovoma odpornosti (Monecke in sod., 2011; Van Cleef in sod., 2011).

2.1.3 Populacijska genetika in epidemiologija

Populacijsko strukturo in epidemiologijo *S. aureus* raziskujejo s pomočjo različnih genotipizacijskih metod (PFGE, MLST, tipizacija *spa*). Več je znanega o populacijski genetiki, epidemiologiji in širjenju MRSA kot MSSA, saj MRSA zaradi odpornosti proti antibiotikom in širjenja v bolnišničnem okolju predstavlja večji javno zdravstveni in ekonomski problem (Chua in sod., 2014).

2.1.3.1 Populacijska genetika

Večino (75 %) genoma *S. aureus* predstavlja zelo konzervativen del (temeljni genom) (ang. core genome), ki ga sestavljajo hišni (ang. housekeeping) geni, potrebni za rast in preživetje bakterije (Lindsay in Holden, 2004). Stafilokokne linije so relativno stabilne, saj se ta del genoma spreminja le zaradi točkovnih sprememb zaporedij nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphism; SNP) oziroma točkovnih mutacij, kar je zelo počasen proces. Majhen del (25 %) genoma je spremenljiv, sestavljajo ga mobilni genetski elementi (ang. mobile genetic elements, MGE). To so različni bakteriofagi, plazmidi, transpozoni in patogeni otoki, na katerih se najpogosteje nahajajo geni za odpornost proti antibiotikom (npr. *SCCmec*) in geni za različne virulentne dejavnike (npr. *pvl* (*lukSF-PV*), enterotoksinski genski klaster *egc*).

S. aureus je torej, kljub stabilnosti posameznih linij, občasno sposoben na hitro izgubiti ali pridobiti gene za odpornost proti antibiotikom in gene za virulentne dejavnike s pomočjo MGE, ki se med vrstami prenašajo z vertikalnim prenosom na hčerinske celice in s horizontalnim prenosom (ang. horizontal gene transfer, HGT), pri slednjem je najpogostejša transdukcija preko bakteriofagov (Grundmann in sod., 2010; Chua in sod., 2014; Grumann in sod., 2014; Lindsay, 2014a). Pri *S. aureus* je HGT nadzorovan in omejen z restriktivno modifikacijskim sistemom, ki ščiti celico pred tujo DNA (Waldron in Lindsay, 2006). HGT *S. aureus* omogoča hitro prilagoditev na nove razmere v okolju (npr. preživetje v okolju z antibiotiki) in lahko poteka celo med različnimi vrstami (npr. prenos genov *vanA* z enterokokov na stafilokoke) (Noble in sod., 1992). Posledica so lahko velike razlike v virulenci in odpornosti proti antibiotikom med predstavniki iste stafilokne linije in hiter nastanek uspešnih klonov. Tako so lahko med invazivnimi izolati in izolati zdravih nosilcev prisotni izolati, ki spadajo v isti CC, medtem ko večinoma izolati z večjim virulentnim potencialom povzročijo invazivno okužbo (npr. sevi s *pvl* (*lukSF-PV*)) (Feil in sod., 2003; Turner in Feil, 2007).

Zaradi skupnih prednikov je za vsak CC značilna določena kombinacija toksinov. Genski zapisi v obliki patogenih otokov ali klastrov nakazujejo evolucijo genov za toksine. Patogeni otoki se lahko vgradijo na različna mesta v kromosomu *S. aureus* in so zelo mobilni (Novick in sod., 2010). Značilni so za družine superantigenov in eksfoliativnih toksinov. Poznamo superantigenske klastre oziroma superantigenske vzorce (ang. superantigenes patterns) *seb+selk+seq*, *selk+selq*, *sed+selj+ser*, *tst+sec+sell*, *sec+sell* in enterotoksinski genski klaster *egc seg+sei+selm+seln+selo+selu/y*, ki je zelo spremenljiv in pogost tako med patogenimi kot med komenzalnimi izolati *S. aureus* (Monecke in sod., 2008; Grumann in sod., 2014). Večina *egc*-pozitivnih izolatov poseduje *seg*, *sei*, *selm*, *seln* in *selo* (Jaraud in sod., 2001).

Večina MGE se torej najlažje prenaša znotraj posameznega klona, zato so posamezni virulentni dejavniki značilni za specifične stafilokokne linije, tako je enterotoksinski genski klaster *egc* prisoten pri izolatih, ki pripadajo CC5, CC22, CC25, CC30, CC45 in CC121, medtem ko ga ne najdemo pri izolatih CC1, CC8, CC15 in CC395, *tst* je značilen za CC30 in CC45 ter *sed*, *selj* in *ser* za CC8 (Peacock in sod., 2002; Grumann in sod., 2014). Med več različnih stafiloknih linij sta razporejena *sea* in *seb*, ker se nahajata na fagih. Prav tako je med več stafiloknih linij razporejen *pvl* (*lukSF-PV*), ker je genski zapis za obe beljakovini *lukF-PV* in *lukS-PV* zaporedno nanizan na bakteriofagu. Pri izolatih CC45 in izolatih podrazreda CC121, ki posedujejo *eta* in *etb*, ne najdemo *pvl* (*lukSF-PV*). Genski zapis za eksfoliativni toksin D (ETD; *etd*) se nahaja na genomskem otoku, *eta* na fagu in *etb* na plazmidu (Yamaguchi in sod., 2002). Invazivnim izolatom, ki spadajo v CC25, so pogosto določili *etd* (Grumann in sod., 2014). Genski zapis za nekatere toksine, kot je Hla, ki je prisoten pri večini izolatov *S. aureus*, pa se nahaja na konzervativnem delu kromosoma (Grumann in sod., 2014). Tudi zapis za SE-1 X se nahaja na konzervativnem delu kromosoma *S. aureus* (Spaulding in sod., 2013).

MGE so ključni tudi za nastanek novih stafilokoknih linij, kot so HA MRSA, CA MRSA, LA MRSA, ki so se prilagodile na nove ekološke niše in so razlog za nove klinične in ekonomske izzive. Največjo skrb za človeštvo bi predstavljale proti antibiotikom popolnoma odporne stafilokokne linije v bolnišnicah, bolnišnični kloni, ki bi povzročali okužbe pri zdravih, imunsko kompetentnih osebah, ali kloni rejnih živali, ki bi pogosto povzročali okužbe pri živalih in ljudeh. Z molekularnimi opredelitvami in raziskovanjem MGE posameznih klonov lahko predvidimo, kateri sevi bodo uspešni v prihodnosti (Lindsay in Holden, 2006; Lindsay, 2014b).

2.1.3.2 Epidemiologija

Populacija *S. aureus* je izrazito poliklonalna, sestavljajo jo namreč številni ST, ki jih uvrščamo v CC. Večina izolatov, ki povzročajo okužbe pri človeku, spada med enajst poglavitnih (dominantnih) humanih stafilokoknih linij, manjšina pa med številne manjše

linije. Stafio kokne linije najpogosteje poimenujemo s CC, čeprav jih lahko opredelimo tudi drugače (npr. s ST ali *spa*-tipi) (Lindsay, 2010). Prevladujoče humane stafio kokne linije so CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45 in CC51/CC121 (Feil in sod., 2003; Chambers in DeLeo, 2009). Največ izolatov pripada CC30, medtem ko so večino epidemij do sedaj povzročili izolati, ki so spadali v CC8 in CC30 (Chambers in DeLeo, 2009). Prevladujoče humane linije HA MRSA so omejene na nekaj uspešnih klonov, ki so se razširili po vsem svetu: CC5, CC8, CC22, CC30 in CC45. Humane linije CA MRSA so zelo raznolike, med pomembnejše pa spadajo CC1 (ST1-IV, PFGE-tip USA400) in CC8 (ST8-IV, PFGE-tip USA300) v Ameriki, CC30 (ST30-IV) na Pacifiku in Oceaniji, CC59 (ST59-IV in ST59-V, PFGE-tip USA1000) na Tajskem, CC80 (ST80-IV), ki je dolgo prevladoval v Evropi, kjer je sedaj pogost CC8 (ST8), in CC398, ki je razširjen po vsem svetu (Enright in sod., 2002; Chambers in DeLeo, 2009; Skov in Jensen, 2009; Otter in French, 2010; Rolo in sod., 2012; Chua in sod., 2014; Dryden in sod., 2015). Izbruhe v bolnišničnem okolju povzročajo tudi raznolike humane linije MSSA. Nekatere humane stafio kokne linije najdemo tudi pri živalih (CC1, CC8, CC22, CC398). Živali lahko predstavljajo izvor teh sevov za človeka (Sung in sod., 2008; Lindsay, 2014b).

2.1.4 Virulentni dejavniki *S. aureus*

Virulenca pomeni prisotnost in izražanje oziroma prepisovanje genov za posamezne virulentne dejavnike. Prepisovanje ne poteka stalno, pač pa ga uravnavajo regulatorji prepisovanja, kar je eden od razlogov, da je *S. aureus* lahko poglavitni komenzal in najpomembnejši bakterijski patogen pri človeku (Schlievert in sod., 2010; Chua in sod., 2014). *S. aureus* lahko izloča številne virulentne dejavnike, med katere štejemo površinske beljakovine, imenovane mikrobne površinske komponente, ki v matriksu prepoznavajo adhezivne molekule (ang. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules; MSCRAMMs), da se *S. aureus* lahko pritrudi na poškodovano tkivo in lažje prevzema železo ter se izmika imunskemu sistemu. Mednje sodijo beljakovine, ki zavirajo kemotakso, polisaharidna ovojnica in protein A. Izločajo se v eksponencialni fazi rasti (Lowy, 1998; Holden in sod., 2004; Bartlett in Hulten, 2010; Schlievert in sod., 2010; Spaulding in sod., 2013; Otto, 2014). *S. aureus* izloča tudi številne sekretorne virulentne dejavnike, med katere spadajo encimi (proteaze, lipaze, nukleaze) in pravi eksotoksini, med katere uvrščamo toksine, ki v celični steni povzročijo nastanek por (citolizini, kot sta Hla in PVL), eksotoksine s superantigenim delovanjem (superantigeni), kot so TSST-1, SE in SE-1, ETA, ETB in ETD (Lowy, 1998; Holden in sod., 2004; Bartlett in Hulten, 2010; Schlievert in sod., 2010; Spaulding in sod., 2013; Otto, 2014). Številni virulentni dejavniki *S. aureus* so torej toksini, ki se izločajo v pozni eksponencialni ali stacionarni fazi rasti. Za toksine je značilno, da neposredno vplivajo na gostitelja. Superantigeni, ki delujejo sistemsko in neposredno vplivajo na imunski odgovor gostitelja, so prva obrambna linija *S. aureus*. Druga obrambna linija *S. aureus* so citolizini, ki lokalno (na mestu okužbe) uničujejo predvsem gostiteljeve imunske celice, tretja obrambna linija *S. aureus* pa so površinske beljakovine,

ki delujejo na ravni posamezne bakterijske celice. Posamezen izolat *S. aureus* lahko izloča številne virulentne dejavnike, zato je težko le enemu pripisati vlogo pri razvoju bolezni (Schlievert in sod., 2010).

2.1.4.1 Citolizini

2.1.4.1.1 Hla

Med citolizini je najbolj znan Hla, hemolizin, ki se preko specifičnega receptorja (ADAM10) veže na površino membrane gostiteljeve celice, kar povzroči nastanek por in poškodbe tarčnih celic (epitelnih celic, eritrocitov in številnih levkocitov, razen nevtrofilcev) (Otto, 2014). Hla izloča 95 % izolatov *S. aureus* in je neposredno povezan z nastankom furunklov, abscesov mehkih tkiv, ponavljajočimi se OKMT, razvojem hemoragične pljučnice in težjim potekom okužb, povzročenih s CA MRSA (Berube in Bubeck, 2013; Spaulding in sod., 2013; Grumann in sod., 2014; Sampedro in sod., 2014). Kadar se izloča v nizkih koncentracijah, ima izrazito provnetno delovanje na epiteljske in endoteljske celice, kar pripomore k razvoju OKMT ali pospeši razvoj s superantigeni pogojenega akutnega sindroma dihalne stiske (ang. acute respiratory distress syndrome, ARDS) (Schlievert in sod., 2010). Protitelesa proti Hla, ki jih človek razvije med okužbo, ga ščitijo pred ponovnimi okužbami (Berube in Bubeck, 2013).

2.1.4.1.2 PVL

Med citolizine spadajo tudi dvokomponentni toksini, med katerimi je pri *S. aureus* pomemben PVL. Sestavljen je iz dveh sinergistično delujočih beljakovin F in S. Obe beljakovini se v celični steni monocitov, makrofagov in nevtrofilcev spojita, tako nastane pora, ki prepušča katione, kar povzroči smrt celice (Labandeira-Rey in sod., 2007). PVL je virulentni dejavnik, ki uničuje celice gostitelja, ki so pomembne za obrambo pred okužbo s *S. aureus* (Grumann in sod., 2014; Otto, 2014). Pogost je pri nekaterih klonih CA MRSA, kot tudi pri številnih izolatih MSSA, in je neposredno povezan z nekrozantnimi okužbami, njegova vloga pri resnih kliničnih stanjih pa je povezana z vrsto okužbe (Otto, 2013; Grumann in sod., 2014).

2.1.4.2 Superantigeni

Superantigeni so beljakovine z majhno molekulsko maso, ki sodijo med najbolj učinkovite aktivatorje celic T pomagalk. Poleg *S. aureus* jih pogosto izloča tudi *Streptococcus pyogenes*. Klasične peptidne antigene požirajo antigen predstavitvene celice (APC), jih encimsko razgradijo do beljakovinskih fragmentov in preko molekul poglobitnega histokompatibilnega kompleksa II (MHCII) prenesejo na površino APC ter na ta način

predstavijo celicam T-pomagalkam, ki se aktivirajo, če prepoznajo tujek. Superantigeni imajo podobno zgradbo kot deli T-celičnih receptorjev (TCR) na površini celic T-pomagalk, zato se, za razliko od klasičnih peptidnih antigenov, v velikih količinah vežejo na MHCII na površini APC. Zaradi velike koncentracije superantigenov sledi vezava številnih TCR in hkratna aktivacija velikega števila celic T-pomagalk (tudi do 20 %), ki sproščajo zelo velike količine mediatorjev (t. i. citokinska nevihta) (Fraser in Proft, 2008). Poleg vezavnih mest MCHII imajo superantigeni dodatna vezavna mesta, ki jim omogočajo pritrjevanje na epiteljske in endoteljske celice (npr. TSST-1 se lahko pritrdi na sluznico nožnice, črevesja in dihal). *S. aureus* se nahaja na površini sluznic ali v rani, medtem ko superantigeni delujejo sistemsko. Posledica sproščanja velike količine citokinov v krvni obtok je razvoj STŠ (Spaulding in sod., 2013; Grumann in sod., 2014). Nekateri superantigeni so zelo učinkoviti, saj aktivirajo celice T-pomagalk tudi, če so prisotni v zelo nizkih koncentracijah (10^{15} g/ml). V okolju so zelo stabilni, saj so odporni na toploto (npr. prekuhanje), proteolizo, izsušitev in kisline, kot je želodčna. Zaradi obstojnosti SE v okolju in njihove emetične aktivnosti so nekatere uvrstili v skupino bioterorističnih agensov in toksinov (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) (Spaulding in sod., 2013; CDC, 2014). Poleg TSST-1, ki nima emetične aktivnosti, v skupini superantigenov poznamo še vsaj 23 serološko različnih SE. Serotipe A, B, C, D, E in G so poimenovali enterotoksini, ker pri človeku po zaužitju sprožijo bruhanje in drisko. Kasneje odkritim serotipom niso dokazali emetičnega delovanja, zato so jih poimenovali SE-I. Poznamo različne serotipe SE-I: H, I in od J do X (Fraser in Proft, 2008; Spaulding in sod., 2013). Serotip SEF ali SE-I F ne obstaja, saj so s tem imenom do leta 1984 poimenovali TSST-1. *S. aureus* lahko izloča od enega do 24 serološko različnih superantigenov, kar še poveča njegovo toksičnost (Spaulding in sod., 2013). Večina (80 %) izolatov *S. aureus* izloča pet do šest superantigenov (Grumann in sod., 2014). Nekateri superantigeni delujejo samozaviralno (do sedaj so to dokazali pri *tst* in *seb*) (Fraser in Proft, 2008).

Po zgradbi superantigene stafilokokov in streptokokov uvrščamo v pet skupin. V nadaljevanju so navedeni le stafilokokni superantigeni. V skupino I spadata TSST-1 in SE-I X. V skupino II spadajo SEB, SEC (pri obeh je možnih več različic), SEG, SE-I U in SE-I W. V skupino III spadajo SEA, SED, SEE, SE-I H, SE-I J in serotipi od SE-I N do SE-I P. V skupini IV ni stafilokonih antigenov. V skupino V spadajo nazadnje odkriti superantigeni, serotipi od SE-I K do SE-I M, od SE-I Q do SE-I T in SE-I V. Superantigeni iz skupine I in II se izločajo v večjih koncentracijah ter so povezani z resnimi kliničnimi stanji pri človeku, medtem ko superantigeni iz skupine III in V povzročajo zastrupitve s hrano, ali pa njihova vloga pri boleznih človeka ni znana (Spaulding in sod., 2013).

Klinična slika okužb, povzročenih z izolati *S. aureus*, ki izločajo superantigene, je zelo raznolika. Redko se izrazi kot klinična slika menstrualnega sindroma toksičnega šoka (mSTŠ), ki je vedno povezan z uporabo tamponov. Povzročijo ga izolati *S. aureus*, ki izločajo TSST-1, in le redko izolati, ki izločajo SEG. Tudi nemenstrualni STŠ je redek pojav,

povzročajo pa ga lahko izolati *S. aureus*, ki izločajo TSST-1, SEB, SEC; redko izolati, ki izločajo SEG in SEI. STŠ je posledica različnih stafilokonih okužb, kot so okužbe ran in abscesov, pljučnica po preboleli virusni okužbi in enterokolitis ob odsotnosti *C. difficile*. Za mSTŠ in STŠ so značilni visoka vročina, izpuščaji, bruhanje, driska in hipotenzija, s tem da lahko stanje hitro napreduje v večorgansko odpoved in smrt (Jarraud in sod., 2001; Spaulding in sod., 2013; Grumann in sod., 2014; Salgado-Pabón in sod., 2014). Večina (80 %) človeške populacije nad 12. letom starosti tvori nevtralizacijska protitelesa proti TSST-1, kar je tudi eden od razlogov, da klinične slike mSTŠ ali STŠ niso pogoste (Grumann in sod., 2014; Salgado-Pabón in sod., 2014). SE povzročajo zastrupitve s kontaminirano hrano in verjetno motijo delovanje črevesja zaradi aktivacije izločanja citokinov. Najbolj znane so zastrupitve s hrano, ki jih povzroči že zelo majhna količina (μg) SEA. Bolezen je samozamejujoča (Spaulding in sod., 2013; Otto, 2014). Izolati *S. aureus*, ki izločajo superantigene TSST-1, SEB in SEC, pri človeku povzročajo tudi okužbe mehkih tkiv in Kawasakijevi bolezni podobno stanje. Okužbe spodnjih dihal po preboleli virusni okužbi lahko povzročijo izolati, ki izločajo TSST-1, SEB, SEC in SE-I X, nekrozantno pljučnico pa povzročijo izolati, ki izločajo SEB in SEC. Endokarditis in anafilaksijo povzročajo izolati, ki izločajo TSST-1 in SEC. Fulminantno purpuro, hudo pireksijo, deskvamatozno vnetje nožnice, perinealni eritem in nenadno smrt novorojenca lahko povzročijo izolati *S. aureus*, ki izločajo katerikoli superantigen. Superantigeni imajo pomembno vlogo tudi pri alergičnih reakcijah. Pri bolnikih z atopičnimi dermatitisom so pogosto osamili *S. aureus*, ki je izločal SEA in SEB. Pri bolnikih z intrinzično bronhialno astmo in alergičnim rinitisom so pogosto dokazali *S. aureus*, ki je izločal TSST-1, SEA, SEB, SEC in SED. Vloga superantigenov pri sepsi ni še natančno pojasnjena. Prav tako ni še jasna vloga večine SE-I pri okužbah, med drugim pa pomagajo pri preživetju bakterij na površini sluznic. Vsako leto odkrijejo nove bolezni, ki so povezane s stafilokoknimi superantigeni (Fraser in Proft, 2008; Spaulding in sod., 2013; Grumann in sod., 2014; Salgado-Pabón in sod., 2014).

2.1.4.3 Eksfoliativni toksini

Poznamo tri različne eksfoliativne toksine ETA, ETB in ETD. Stafilokoki, ki izločajo ETA in ETB, povzročajo bulozni impetigo, stafilokokni kožni sindrom z luščenjem (ang. staphylococcal scalded-skin syndrome, SSSS) in Ritterjevo bolezen. Pri 3 % sevov MSSA sta prisotna *eta* in *etb*, medtem ko je pri približno 10 % sevov MRSA prisoten *eta*. Toksina se sproščata na mestu okužbe, se hematogeno širita in nato učinkujeta na granularno plast epidermisa, posledica pa je povrhnje luščenje kože. Omenjena klinična stanja so pogostejša pri otrocih in odraslih z okvarjeno imunostjo (Yamaguchi in sod., 2002).

2.2 MOLEKULARNE GENOTIPIZACIJSKE METODE

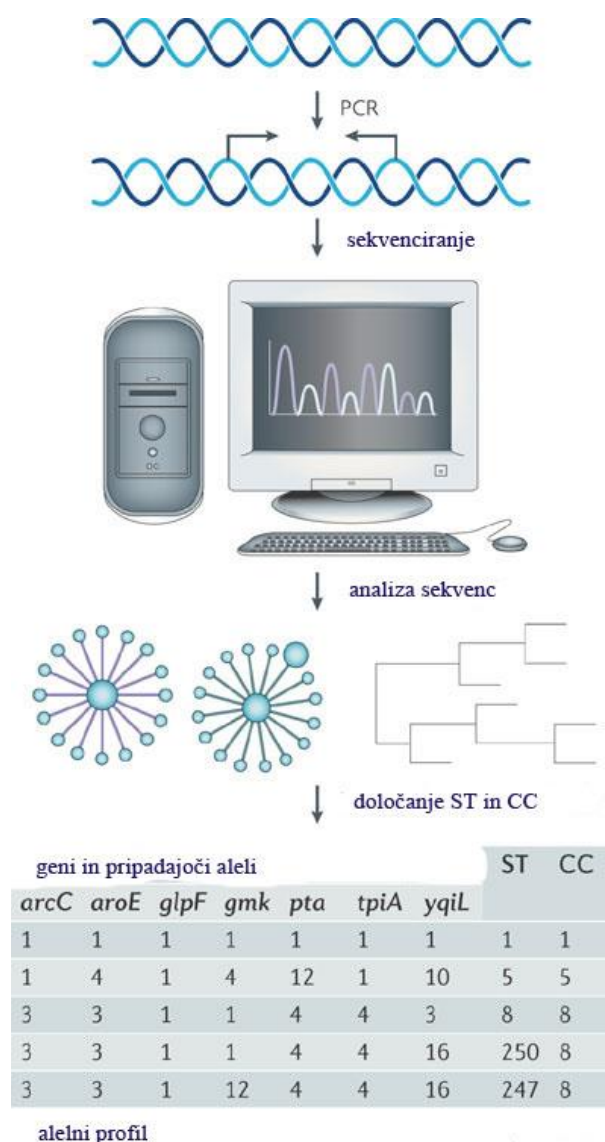
Z molekularnimi genotipizacijskimi metodami, ki temeljijo na sekvenciranju, kot sta MLST v kombinaciji z določitvijo SCC*mec* pri izolatih MRSA in tipizacija *spa*, so ugotovili veliko

genetsko raznolikost izolatov *S. aureus*, ki pripadajo različnim CC (Enright in sod., 2000; Harmsen in sod., 2003). Kljub veliki raznolikosti pa velika večina izolatov v populaciji pripada omejenemu številu tesno povezanih genotipov oziroma CC (Feil in sod., 2004). Pri obeh metodah gene (sedem pri MLST, enega pri tipizaciji *spa*) najprej pomnožimo s PCR, čemur sledi sekvenciranje in primerjava sekvenc z bazo podatkov na medmrežju saureus.mlst.net in www.spaserver.ridom.de (MLST, 2014; Ridom Spa Server, 2014). Z obema metodama zanesljivo določimo stafilokokno linijo, zato imata tudi epidemiološki pomen (Enright in sod., 2000; Harmsen in sod., 2003; Chambers in Deleo, 2009; Lindsay, 2010, 2014a). Prednost metod, pri katerih uporabljamo sekvenciranje, je v hitrosti, jasni interpretaciji rezultatov, dobri medlaboratorijski primerljivosti, ponovljivosti in enostavnem kreiranju baze podatkov. Slabost je visoka cena (Shopsin in sod., 1999; Foley in sod., 2009; Chua in sod., 2014). Za lokalno ugotavljanje epidemiologije *S. aureus*, kot je na primer analiza bolnišničnih izbruhov, povzročenih s *S. aureus*, pogosto uporabljamo analizo makrorestriksijskih vzorcev kromosomske DNA z metodo PFGE. S to metodo zaznamo spremembe na kromosomu, ki so posledica različnih genetskih procesov, kot so točkovne mutacije ali transpozicije oziroma premiki MGE. Metoda ima visoko ločljivost, zato še vedno velja za zlati standard pri ugotavljanju sorodnosti izolatov. Slabost metode je slabša medlaboratorijska primerljivost rezultatov in časovna zamudnost, saj traja dva do štiri dni (Tenover in sod., 1995; van Belkum in sod., 2007). Med novejšje in zelo natančne metode za analizo izbruhov, s katerimi ugotavljajo različice MGE oziroma premike MGE pri posameznih izolatih, spada sekvenciranje celotnega genoma (ang. whole genome sequencing, WGS) (Lindsay, 2014a).

2.2.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST)

MLST je visoko ločljiva metoda, s katero ugotavljamo podobnost izolatov *S. aureus* s pomočjo določanja nukleotidnih zaporedij (oziroma ugotavljanja točkovnih mutacij ali rekombinacij) 450 do 500 bp velikih notranjih odsekov sedmih hišnih genov *S. aureus*: *arcC* (karbamat kinaza), *aroE* (shikimat dehidrogenaza), *glpF* (glicerol kinaza), *gmk* (gvanilat kinaza), *pta* (fosfat acetil transferaza), *tpi* (trifosfat izomeraza) in *yqiL* (acetil koencim A acetil transferaza) (Enright in sod., 2000). Hišni geni, ki so potrebni za vzdrževanje osnovnih celičnih funkcij, so prisotni pri vseh izolatih določene vrste in niso podvrženi hitrim spremembam, kot so spremembe zaradi selekcijskih vplivov okolja, hkrati pa so dovolj spremenljivi, da lahko izolate razlikujemo. Z metodo MLST lahko določamo globalno epidemiologijo izolatov *S. aureus*, torej analiziramo daljše časovno obdobje. Z MLST ne pridobimo pomembnih kliničnih in epidemioloških podatkov o virulentnem potencialu in odpornosti konkretnega kliničnega izolata, zato ni primerna za razlikovanje izolatov, pri katerih je v kratkem časovnem obdobju prišlo do genetskih sprememb, kot je HGT (Enright in Spratt, 1999; Foley in sod., 2009). Zato je v primerih, ko želimo analizirati kratko časovno obdobje, v katerem pričakujemo majhne spremembe genoma (npr. bolnišnični izbruh), smiselno izbrati metodo, ki analizira gene, ki so pod večjim selekcijskim vplivom (npr. geni

za virulentne dejavnike, ki se nahajajo na MGE) (Cookson in sod., 2007; Turner in Feil, 2007). Pri metodi MLST ST posameznega izolata določimo s pomočjo podatkovne baze, ki je prosto dostopna na svetovnem medmrežju (MLST, 2014). Na ta način lahko svoje podatke tudi primerjamo s podatki različnih raziskav (Enright in sod., 2000). Vsakemu genu je na osnovi sekvence dodeljena številka oziroma alel. Tako iz sedmih odsekov dobimo zaporedje sedmih celih števil, ki določajo alelni profil izolata. Vsak alelni profil izolata enoznačno določa ST, ki je nedvoumen opis klona (Enright in Spratt, 1999) (Slika 3). Sekvencam, ki se razlikujejo že samo v enem nukleotidu, je dodeljena druga številka oziroma alel. Metoda je zaradi določanja nukleotidnih zaporedij na sedmih genskih odsekih zelo ločljiva, zato je zelo malo verjetno, da bi nesorodnim izolatom določili isti alelni profil. Izolati z istim ST so, po dosedaj zbranih podatkih, tudi pripadniki istega klona in imajo skupnega prednika (Enright in sod., 2000). V nadaljevanju lahko ugotavljamo sorodnost (ne le podobnost) izolatov s pomočjo algoritma eBURST (ang. based upon related sequence types; BURST), ki je dostopen na svetovnem medmrežju eburst.mlst.net (eBURST, 2014). Ta algoritem razporedi velike količine podatkov MLST v skupine sorodnih ST in jih na osnovi ujemanja alelov iz sedmih lokusov uvrsti v CC. V isti CC uvrsti izolate, ki se ujemajo v šestih ali sedmih alelih iz sedmih lokusov (Feil in sod., 2004). CC torej sestavljajo izolati prevladujočega (izvornega) genotipa in manjše število klastrov zelo sorodnih genotipov. Genotipe, ki se od izvornega genotipa razlikujejo le v enem od sedmih lokusov, imenujemo SLV (ang. single locus variants), iz katerih bodo izšli izolati, ki se bodo razlikovali v dveh in več lokusih. Kloni *S. aureus* imajo po večini enostavno strukturo z enim izvornim genotipom in nekaj sorodnimi genotipi (SLV), saj se spreminjajo le zaradi točkovnih mutacij. ST, ki jih ne moremo uvrstiti v nobeno skupino, imenujemo posamezni izolati (ang. singleton) (Feil in sod., 2004). Analizo lahko nadgradimo tako, da s pomočjo drugih genotipizacijskih metod (npr. tipizacijo *spa*) določimo podtipe znotraj posameznega CC (Chambers in Deleo, 2009).

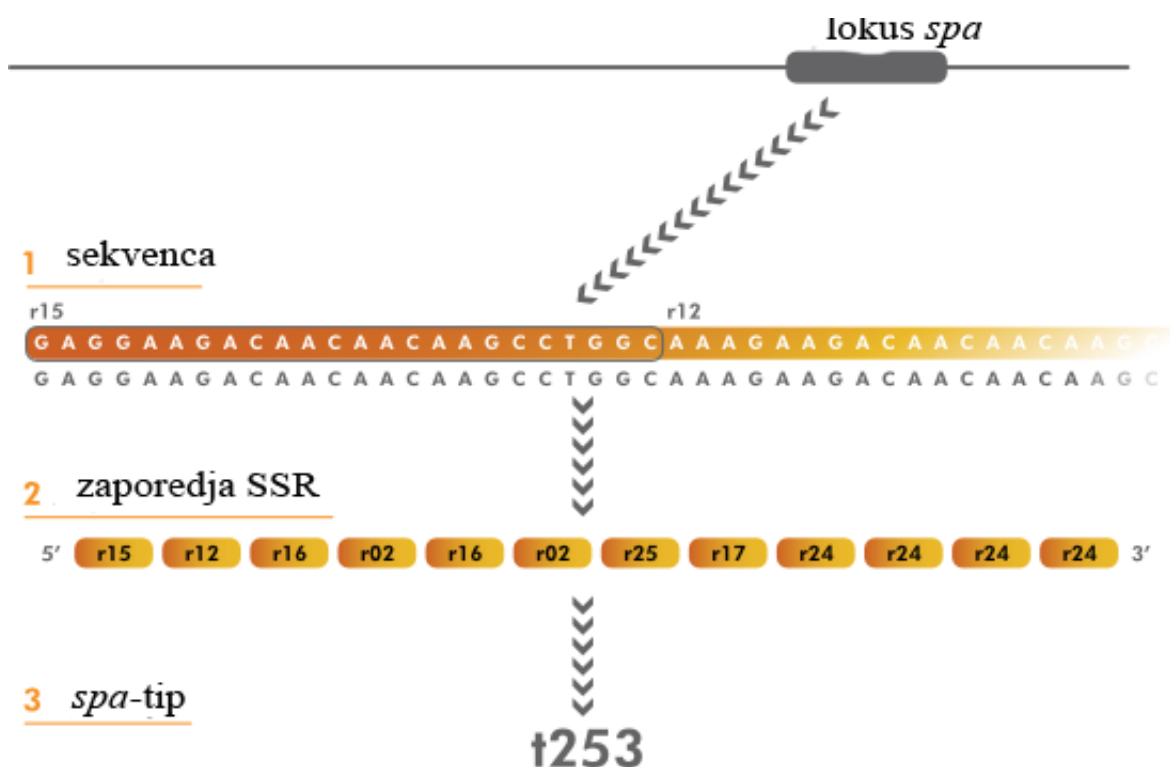


Slika 3: Princip tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (ang. multilocus sequence typing, MLST). Osamitvi bakterijske DNA sledi pomnoževanje bakterijske DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo. Sledi sekvenciranje s katerim določimo nukleotidna zaporedja genskih odsekov sedmih hišnih genov na kromosomu *Staphylococcus aureus*. Sekvence vnesemo v podatkovno bazo, ki je dostopna na svetovnem medmrežju (saureus.mlst.net). Program posameznim genskim odsekom dodeli številko. Tako dobimo zaporedje sedmih celih števil za določanje alelnega profila izolata, ki enoznačno opredeljuje sekvenčni tip (ST). S pomočjo algoritma eBURST (ang. based upon related sequence types, BURST), ki je dostopen na svetovnem medmrežju (eburst.mlst.net), izolat uvrstimo v klonalni kompleks (CC); *arcC*, karbamat kinaza; *aroE*, shikimat dehidrogenaza; *glpF*, glicerol kinaza; *gmk*, gvaniilat kinaza; *pta*, fosfat acetil transferaza; *tpiA*, trifosfat izomeraza; *yqiL*, acetil koencim A acetil transferaza (Chambers in Deleo, 2009: 633).

Figure 3: Principle of multilocus sequence typing (MLST). Bacterial DNA isolation is followed by bacterial DNA replication using the polymerase chain reaction. This is followed by sequencing to determine the nucleotide sequence of gene regions of seven housekeeping genes in the *Staphylococcus aureus* chromosome. The sequences are entered into the data base available on the world wide web (saureus.mlst.net). The program assigns a number to individual gene sections. This gives us a sequence of seven whole numbers for the determination of the allelic profile of the isolate which uniquely identifies a sequence type (ST). Using the eBurst algorithm (based upon related sequence types, BURST) available on the World Wide Web (eburst.mlst.net) the isolate is classified into a clonal complex (CC); *arcC*, carbamate kinase; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *glpF*, glycerol kinase; *gmk*, guanylate kinase; *pta*, phosphate acetyltransferase; *tpiA*, triphosphate isomerase; *yqiL*, acetyl-coenzyme A acetyltransferase (Chambers and Deleo, 2009: 633).

2.2.2 Tipizacija *spa*

Metoda tipizacije *spa* temelji na določanju nukleotidnega zaporedja spremenljivega polimorfnege odseka X gena za protein A (lokus *spa*) na kromosomu *S. aureus*, ki ga sestavlja spremenljivo število 24 bp velikih ponovitev nukleotidnih zaporedij (ang. short sequence repeat; SSR) (Shopsin in sod., 1999). Spremenljivost SSR je posledica pogostih točkovnih mutacij, izgube in pridobitve posameznih SSR, zato nastanejo razlike v številu kot tudi v nukleotidnem zaporedju posameznih SSR (Shopsin in sod., 1999; Grundmann in sod., 2010). Protein A nosi zapis za vrstno specifično beljakovino, ki se veže na IgG in s tem preprečuje fagocitozo (Shopsin in sod., 1999; Schlievert, 2014). Na osnovi specifičnega zaporedja SSR določimo *spa*-tip s pomočjo programske opreme Ridom StaphType (Ridom GmbH, Würzburg, Nemčija), ki zazna SSR in jim na osnovi specifičnih ponovitev dodeli številčno kodo, s pomočjo katere določi *spa*-tip (Shopsin in sod., 1999) (Slika 4). Sekvence lahko v nadaljevanju vnesemo tudi v podatkovno bazo na medmrežju (Ridom Spa Server, 2014), ki je prosto dostopna vsem uporabnikom. Program najprej preveri kakovost vnešenih sekvenc (samodejni nadzor kakovosti), nove *spa*-tipe doda v bazo podatkov (t. i. usklajevanje dobljenih *spa*-tipov) in uporabniku omogoča dostop do podatkov o globalni razširjenosti posameznega *spa*-tipa (Harmsen in sod., 2003). Z določitvijo *spa*-tipa lahko v splošnem predvidimo CC, ki mu izolat pripada (Cookson in sod., 2007). Z metodo tipizacije *spa* določamo nukleotidno zaporedje majhnega odseka kromosoma, zato obstaja določena verjetnost napačne določitve CC. Tako lahko za izolate z istim *spa*-tipom z drugimi genotipizacijskimi metodami (npr. MLST) ugotovimo, da niso sorodni (Enright in sod., 2000; Harmsen in sod., 2003; Chua in sod., 2014). Z metodo tipizacije *spa* torej določamo bolj spremenljiv odsek enega gena, zato je bolj ločljiva in cenejša kot MLST. Poleg ugotavljanja globalne epidemiologije je primerna tudi za kratkoročno in lokalno ugotavljanje epidemiologije *S. aureus*, na primer za analizo izbruhov znotraj posameznih zdravstvenih ustanov (Cookson in sod., 2007; Muthukrishnan in sod., 2013).



Slika 4: Princip tipizacije *spa*. Osamitvi bakterijske DNA sledi pomnoževanje bakterijske DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo. Sledi sekvenciranje s katerim določimo nukleotidno zaporedje spremenljivega polimorfnega odseka X gena za protein A (lokus *spa*) na kromosomu *Staphylococcus aureus*. Lokus *spa* je sestavljen iz spremenljivega števila 24 bp velikih ponovitev nukleotidnih zaporedij (ang. short sequence repeat, SSR). S pomočjo programske opreme Ridom StaphType (Ridom GmbH) zaznamo SSR posameznega izolata in jim dodelimo številčno kodo, na osnovi katere določimo *spa*-tip (Applied Maths, 2016).

Figure 4: Principle of *spa* typing. Bacterial DNA isolation is followed by bacterial DNA replication using the polymerase chain reaction. This is followed by sequencing to determine the nucleotide sequence of the variable polymorphic X region of the protein A gene (locus *spa*) in the *Staphylococcus aureus* chromosome. Locus *spa* is comprised of a variable number of 24 bp long nucleotide sequence repeats (short sequence repeat, SSR). Using the Ridom StaphType (Ridom GmbH) software the SSRs of individual isolates are detected and are assigned a numerical code on the basis of which the *spa* type is determined (Applied Maths, 2016).

2.2.3 Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)

Metoda PFGE je namenjena ločevanju večjih fragmentov DNA v agaroznem gelu. Temelji na ločevanju 20 do 600 kb velikih fragmentov DNA, ki jih dobimo po predhodni restrikciji kromosomske DNA z izbrano restrikcijsko endonukleazo (makrorestrikcija). Sledi elektroforeza v agaroznem gelu s spreminjajočim električnim poljem. Spreminjanje polaritete električnega polja v točno določenih časovnih intervalih omogoča natančno orientacijo in potovanje večjih fragmentov DNA v agaroznem gelu. Manjše molekule se hitreje odzovejo na spremembo polaritete s spremembo orientacije, zato hitreje potujejo po gelu (Herschleb in sod., 2007). Fragmenti DNA se v gelu po velikosti razvrstijo v obliki trakov in tako nastane makrorestrikcijski vzorec (pulzotip) (Tenover in sod., 1995; van Belkum in sod., 2007; Isenberg, 2010). Sledi primerjava in analiza pulzotipov posameznih izolatov. Posledica sprememb kromosomske DNA, ki nastanejo na primer zaradi točkovnih

mutacij, je spremenjeno število in položaj restrikcijskih mest, ki so tarčna mesta za endonukleaze, zato se spremeni pulzotip (Tenover in sod., 1995). Poleg Tenoverjevih kriterijev (1995) za interpretacijo rezultatov PFGE, ki uvrstijo pulzotipe v štiri skupine glede na položaj in število restrikcijskih fragmentov, za natančnejše ugotavljanje sorodnosti izolatov uporabljamo tudi metode filogenetske analize s pomočjo računalniških programov. Pulzotipe posameznih izolatov lahko fotografiramo pod ultravijolično (UV) svetlobo in shranimo s pomočjo dokumentacijskega sistema za zajem digitalne slike in analizo gelov ter na osnovi podobnosti makrostrekijskih vzorcev rekonstruiramo filogenetske odnose med izolati. Za rekonstrukcijo drevesa sorodnosti lahko uporabljamo neutežno metodo parnih skupin z aritmetično sredino (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA).

2.3 OKUŽBE KOŽE IN MEHKIH TKIV

Nepoškodovana koža je naravna strukturna ovira, ki preprečuje vdor bakterij v tkiva. Pri preprečevanju okužb ima pomembno vlogo tudi normalna mikrobiota kože in kislina vrednost pH kože. Večino OKMT povzročijo *S. aureus* in beta hemolitični streptokoki, pogosti povzročitelji pa so tudi enterokoki, po Gramu negativne bakterije in anaerobi (Swartz in Pastenack, 2005). Ko povzročitelj vdre skozi kožo, je razsoj okužbe odvisen od imunskega odgovora gostitelja in virulence povzročitelja, ta pa je odvisna od števila in kombinacije virulentnih dejavnikov, ki jih izloča. Za razsoj okužbe so pomembni virulentni dejavniki, ki poškodujejo komponente gostiteljevih tkiv in vplivajo na imunski odgovor gostitelja (Koerner in Johnson, 2011).

Okužbe kože so pri človeku zelo pogoste, medtem ko so okužbe mehkih tkiv redke. Klinična slika je zelo raznolika, od omejenih površinskih okužb kože do življenje ogrožajočih stanj, kot je nekrotizirajoči fasciitis s sepsa (Koerner in Johnson, 2011). Nastanejo lahko zaradi vdora patogenih bakterij od zunaj skozi mikroskopske ali makroskopske poškodbe kože (neposredna okužba). Koža je lahko prizadeta tudi v sklopu sistemskih bakterijskih okužb (najpogostejši je hematogeni razsoj, na primer pri meningokokni okužbi) ali zaradi učinka bakterijskih toksinov (škrlatinka, STŠ, sindrom, podoben toksičnemu šoku) (Swartz in Pastenack, 2005; Dryden, 2009).

Med okužbe kože spadajo impetigo, folikulitis, furunkel, karbunkel, kožni absces, šen in celulitis (Lotrič-Furlan, 2014; Swartz in Pastenack, 2005). Najpogostejši so kožni abscesi in celulitis (Kobayashi in sod., 2015; Tong in sod., 2015). Pri zdravih, imunsko kompetentnih osebah potekajo večinoma blago in trajajo kratek čas, če pa bolniki potrebujejo zdravniško pomoč, je obravnava največkrat ambulantna. Sistemske antibiotike predpisujemo pri celulitisu in razširjenem impetigu ali pri folikulitisu s pridruženim celulitisom. Večje furunkle, karbunkle in večje kožne abscese zdravimo kirurško z drenažnim vrezom, zdravljenje z antibiotiki pa je potrebno pri sistemskih znakih bolezni, pri sumu na sepsa,

priduženem celulitisu, oslABLjeni imunosti ter furniklih in karbunklih na obrazu. Pri abscesih je pomembna mikrobiološka diagnostika, saj je pogosto prisotnih več različnih povzročiteljev. Ravno tako pri sumu na sepo od vzamemo hemokulture za dokaz povzročitelja (Lotrič-Furlan, 2014; Swartz in Pastenack, 2005). Okužbe mehkih tkiv poleg kože prizadenejo tudi mišice in ali mišične ovojnice, mednje sodijo nekrotizirajoči fasciitis, Fournirjeva gangrena in plinska gangrena. Omenjena stanja pogosto ogrozijo bolnikovo življenje, zato je nujna pravilna ocena nevarnosti in pravočasno bolnišnično zdravljenje (Swartz in Pastenack, 2005).

Uporabljamo različne klasifikacije OKMT. Pogosto uporabljamo delitev po anatomskih mestih nastanka okužbe (Swartz in Pastenack, 2005), ki smo jo uporabili tudi v tem doktorskem delu:

- primarne piodermije (okužbe, ki se primarno razvijejo na koži): impetigo, celulitis, šen, folikulitis, furunkli, karbunkli, paronihija,
- sekundarne bakterijske okužbe kožnih lezij: opekline, travmatske lezije – ugriznine, piki insektov, diabetično stopalo,
- okužbe, ki se razvijejo v podkožju in fasciji: absces, flegmona, nekrotizirajoči fasciitis, Fournirjeva gangrena, atheroma inflamatum,
- okužbe, ki se razvijejo v mišičju: nekrozantni miozitis.

Poškodbe kože, kot so kirurške in travmatske rane, golenske razjede, diabetični ulkusi in preležanine, lahko vodijo v kolonizacijo z več različnimi bakterijami. Vsaka kolonizacija rane ne vodi v okužbo. Razlikovanje med kolonizacijo in okužbo rane ni vedno preprosto. Na število in raznolikost bakterij v rani vplivajo različni dejavniki: vrsta rane, globina, anatomsko mesto, prekrvljenost tkiva, gostiteljev imunski odgovor in pridružene bolezni, na primer sladkorna bolezen. Bakterijske okužbe ran in abscesi lahko nastanejo kot zapleti po operacijskih posegih ali zaradi poškodb in bolezenskih procesov, ki prizadenejo celovitost kože. Ločimo akutne rane, ki so posledica delovanja zunanje sile na nepoškodovano kožo, ter kronične rane, ki so lahko posledica dolgotrajnega celjenja in nastanejo na mestih, kjer se tkivo neprestano travmatizira, je slabo prekrvljeno in oksigenirano (Swartz in Pastenack, 2005; Dryden, 2009).

Večino OKMT pri človeku povzroči *S. aureus*, sledijo pa beta hemolitični streptokoki skupine A, B, C in G (Swartz in Pastenack, 2005; Dryden, 2009). *S. aureus* povzroča različne OKMT, od furunklov in karbunklov, impetiga, nezapletenega celulitisa do življenje ogrožajočih stanj, kot je osteomielitis, poleg tega pa je najpogostejši povzročitelj okužb kirurškega mesta (Tong in sod., 2015). V zadnjih dveh desetletjih CA MRSA povzroča epidemije OKMT po vsem svetu in je tudi razlog za povečano število teh okužb (Gu in sod., 2015; Tong in sod., 2015). V Ameriki je po letu 2000 večino OKMT s težjim potekom povzročil CC8 (ST8), *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven (PFGE tip USA300) klon CA MRSA, ki se je razširil tudi v bolnišnice (Lindsay in Holden, 2004; Chambers in Deleo, 2009; Otter in

French, 2010). Prevalenca CA MRSA v Severni Ameriki znaša 35,9 %, v Latinski Ameriki pa je nekoliko nižja, in sicer 29,4 % (Dryden, 2009). O OKMT, ki jih je povzročil CA MRSA, so poročali tudi iz Avstralije, Azije, Evrope in celo iz držav, ki so imele nizko prevalenco MRSA: Norveška, Danska in Finska (Chambers in Deleo, 2009). Prevalenca CA MRSA v Evropi, razen v Grčiji in Romuniji, po do sedaj dostopnih podatkih znaša 22,8 % (Dryden, 2009). Prav tako kot v ZDA je v Evropi sedaj pogost klon CC8 (ST8) (Rolo in sod., 2012; Dryden in sod., 2015). Ko se odločamo za antibiotično zdravljenje OKMT, je ključnega pomena pravilna izbira antibiotika. Pomembno je upoštevati in preveriti možnost okužbe z redkejšimi povzročitelji, bolj odpornimi izolati in sevi, ki izločajo toksine, kot so PVL, Hla in TSST-1. Betalaktamski antibiotiki niso učinkoviti pri zdravljenju okužb, povzročenih z MRSA. Kadar so betalaktamski antibiotiki v tkivih prisotni v subinhibitornih koncentracijah, povečajo izločanje PVL, Hla in TSST-1, medtem ko dodatek klindamicina, linezolida ali fusidne kisline zavre tvorbo teh toksinov (Dryden, 2009). Zato je pomembno, da pri pisanju smernic za predpisovanje protimikrobnih zdravil upoštevamo lokalno epidemiologijo in občutljivost povzročiteljev za antibiotike (Dryden, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZJAVA O ETIKI

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka 152/07/11). Preiskovance smo pred začetkom raziskave seznanili z namenom in potekom ter pridobili njihovo pisno privolitev.

3.2 PREISKOVANCI IN BAKTERIJSKI IZOLATI

V leto in pol trajajočem obdobju (od januarja 2011 do junija 2012) smo prospektivno zbrali brise ran in brise nosu pri 461 bolnikih z OKMT z namenom ugotavljanja prisotnosti *S. aureus*. Vzorci ran so bili odvzeti med kirurškim posegom. V raziskavo smo vključili zaporedne bolnike, ki so potrebovali drenažni vrez in so bili obravnavani v ambulanti Kliničnega oddelka za kirurške okužbe Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (KOKO UKCL). V raziskavo so bili vključeni bolniki z OKMT, obravnavani v KOKO UKCL, kar je bil kriterij za vključitev bolnikov. Kriteriji za izključitev bolnikov so bili predhodna okužba ali kolonizacija z MRSA in bolnišnično zdravljenje ali nastanitev v negovalni ustanovi v preteklem letu. Vsak bolnik je bil v raziskavo vključen le enkrat. Med bolniki je bilo 167 (36,2 %) žensk in 294 (63,8 %) moških. Povprečna starost bolnikov je bila 41,6 let (razpon 14–86 let). Vsi bolniki z OKMT, vključeni v raziskavo, so bili zdravljeni po uveljavljenem protokolu, dodatno smo jim odvzeli samo brise ran in brise nosu za mikrobiološke preiskave.

V kontrolno skupino smo vključili 451 zaporednih zdravih oseb. Kriterij za vključitev zdravih oseb je bil opravljen sistematski pregled na Zavodu za varstvo pri delu v Ljubljani (ZVD) in usklajenost po starosti in spolu z bolniki, pri katerih smo *S. aureus* osamili iz rane. Kriteriji za izključitev iz kontrolne skupine so, poleg kriterijev za izključitev bolnikov, vključevali OKMT v preteklem letu. Nosilstvo *S. aureus* v nosu smo ugotavljali z odvzemom brisa nosu. Vsaka zdrava oseba je bila v raziskavo vključena le enkrat. Med zdravimi osebami je bilo število žensk 201 (44,6 %) in moških 250 (55,4 %). Povprečna starost zdravih oseb je bila 39,1 let (razpon 13–92 let). Vzorce so odvzeli ustrezno usposobljeni zdravstveni delavci s transportnim sistemom z Amiesovim gojiščem (Meus s.r.l., Piove di Sacco, Italija) ter jih najkasneje v 24 urah po odvzemu dostavili na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani (IMI) v Laboratorij za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti (v nadaljevanju laboratorij). V KOKO UKCL in ZVD so bili obravnavani predvsem preiskovanci iz Osrednjeslovenske regije (OSR) (približno četrtnina slovenskega prebivalstva) (SURS, 2016).

Vsi preiskovanci so izpolnili anonimni vprašalnik, na podlagi katerega smo pridobili osnovne demografske in epidemiološke podatke (Prilogi A in B). Klinični podatki o bolnikih so bili navedeni na spremnem listu za mikrobiološke preiskave. Diagnoze bolnikov smo razvrstili v tri sklope: primarna piodermija, sekundarne okužbe kožnih lezij in okužbe podkožja (Swartz in Pastenack, 2005).

3.2.1 Izvor izolatov MRSA

Izvor izolatov MRSA (iz domačega ali bolnišničnega okolja) smo opredeli na osnovi epidemioloških podatkov po definiciji CDC, molekularnih značilnosti pri izbranih izolatih ter vzorcev občutljivosti za in odpornosti proti različnim antibiotikom (rezistotipov) (CDC, 1999; Otter in French, 2012).

Kot CA MRSA smo opredelili izolate, ki so bili osamljeni pri bolniku brez dejavnikov tveganja za ZPO (osamljeni izven bolnišnice ali osamljeni pri bolniku v bolnišnici v prvih 48 urah po sprejemu, s tem da bolnik ni bil predhodno okužen ali nosilec, ni bil zdravljen v bolnišnici, operiran, zdravljen s hemodializo, oskrbovan v domu za ostarele ter ni imel stalnih katetrov) oziroma pri bolnikih z dejavniki tveganja za kolonizacijo ali okužbo s CA MRSA (tesen kontakt z osebo, ki je kolonizirana ali okužena s CA MRSA, ukvarjanje s skupinskim športom, kjer so možni pogosti stiki in poškodbe kože, kjer je higiena slabša ter so površine in športni pripomočki lahko kontaminirani). Poleg tega so izolati, ki smo jih opredelili kot CA MRSA, po molekularnih značilnostih ustrezali CA MRSA (pogosto posedujejo tip *SCCmec* IV ali V in *pvl* (*lukSF-PV*), vendar pripadajo različnim CC in so iz različnih geografskih področij) in so bili občutljivi za več antibiotikov (Deurenberg in sod., 2007; Chambers in Deleo, 2009; Skov in Jensen, 2009; Otter in French, 2012).

Kot CA MRSA pri bolniku z dejavniki tveganja za nastanek ZPO smo opredelili izolate, ki so po molekularnih značilnostih ustrezali CA MRSA in so bili osamljeni pri bolniku z dejavniki tveganja za nastanek ZPO (Rossney in sod., 2007).

Kot HA MRSA smo opredelili izolate, ki so bili osamljeni pri bolniku z dejavniki tveganja za nastanek ZPO in so po molekularnih značilnostih ustrezali HA MRSA (pogosto posedujejo enega od tipov *SCCmec* I-III in dodatne gene za odpornost proti antibiotikom) (Otter in French, 2012).

Kot LA MRSA bi opredelili izolate, ki imajo ustrezne molekularne značilnosti (spadajo v CC398) in so poleg betalaktamov odporni tudi proti tetraciklinom (McCarthy in sod., 2012).

3.3 KULTIVACIJA, IDENTIFIKACIJA IN SHRANJEVANJE BAKTERIJSKIH IZOLATOV

Po sprejemu vzorcev v laboratorij smo vzorce zasejali v tekoče bogatitveno gojišče bujon Todd-Hewith (ang. Todd-Hewith broth, THBS; Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) in na KA (BD, Sparks, ZDA), ki smo ju pripravili po navodilih proizvajalca, ter na kromogeno gojišče Chrom ID MRSA agar (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) (CH MRSA). THBS ter primarni plošči KA in CH MRSA smo inkubirali v aerobnih pogojih pri $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 18 do 48 ur. THBS smo po 18 do 24 urah inkubacije subkultivirali na KA in CH MRSA. Vsakih 18 do 24 ur inkubacije smo pregledali trdna gojišča na prisotnost kolonij, sumljivih za *S. aureus* (rumeno bele kolonije z ali brez beta hemolize na KA in zelene ali rumene kolonije na CH MRSA) (Brown in sod., 2005). Kolonije, sumljive za *S. aureus*, smo identificirali s pomočjo masnega spektrometra v kombinaciji z analizatorjem časa potovanja (ang. matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Nemčija)) po navodilih proizvajalca. Pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb smo iz primarne plošče osamili, identificirali, določili občutljivost za antibiotike in v nadaljevanju molekularno opredelili tri do štiri kolonije *S. aureus* z namenom ugotavljanja možne pristranosti, ker smo v nadaljevanju tega doktorskega dela iz primarnih plošč identificirali, določili občutljivost za antibiotike in molekularno opredelili le po eno kolonijo *S. aureus*. Izolate *S. aureus* smo shranili v zamrzovalni omari (SANYO Electric Co., Ltd., San Diego, ZDA) pri temperaturi -80 °C v gojiščih za zamrzovanje, ki smo jih pripravili iz bujona Mueller-Hinton (BD), glicerola (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija), natrijevega citrata (Sigma-Aldrich), amonijevega sulfata (Merck Sharp & Dohme, Kanilworth, New Jersey, ZDA) in kalijevega dihidrogen fosfata (Sigma-Aldrich) po protokolu Feaversa in sod. (1992).

3.4 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

3.4.1 Disk difuzijska metoda po Kirby-Bauerju

Izolatom *S. aureus* smo določili občutljivost za penicilin, cefoksitin, eritromicin, klindamicin, ciprofloksacin, gentamicin, rifampin, trimetoprim sulfametoksazol, tetraciklin in mupirocin s standardizirano metodo z difuzijo v agarju z diski po smernicah Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI, 2012). Pri izolatih MRSA smo določili tudi občutljivost za linezolid z disk difuzijsko metodo ter občutljivost za vankomicin in teikoplanin z določanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z metodo difuzijskega gradienta, ki je opisana v poglavju 3.4.6. Občutljivost za mupirocin smo interpretirali po angleških smernicah za predpisovanje protimikrobnih zdravil (ang. British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC), po katerih so bili za mupirocin občutljivi izolati s premerom inhibicijske cone $\geq 27\text{ mm}$. Pri

izolatih s premerom inhibicijske cone ≤ 26 mm smo v nadaljevanju določili MIK (Andrews in sod., 2009). Za kontrolo kakovosti antibiograma smo pri vsaki novi seriji gojišča agar Mueller-Hinton (MHA; BD) vključili standardni sev ATCC 25923.

Iz čiste bakterijske kulture smo v 0,85-odstotni sterilni fiziološki raztopini (NaCl; MSD, Whitehouse Station, New Jersey, ZDA) pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarlanda. Gostoto suspenzije smo umerili s pomočjo nefelometra (CrystalSpec; BD). Na površino MHA, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca, smo z brisom in s pomočjo rotatorja nanесли enakomerno plast suspenzije. Na ploščo smo s polagalcem diskov (BD) položili papirnate diske s predpisano koncentracijo antibiotika (BD). Ploščo smo inkubirali v aerobnih pogojih pri temperaturi $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 18 do 20 ur. Rezultate občutljivosti smo razvrstili v tri občutljivostne kategorije:

- občutljiv izolat (ang. susceptible, S),
- zmerno občutljiv izolat (ang. intermediate, I),
- odporen izolat (ang. resistant, R).

Rezistotip za posamezen izolat smo določili na osnovi odpornosti izolata proti penicilinu, cefoksitinu, eritromicinu, klindamicinu, ciprofloksacinu, gentamicinu, rifampinu, trimetoprim sulfametoksazolu, tetraciklinu in mupirocinu.

3.4.2 Določanje odpornosti proti meticilinu

Odpornost proti meticilinu smo ugotavljali s cefoksitinskim diskom (30 μg , BD) po smernicah CLSI (2012). Proti meticilinu odporni so bili izolati s premerom inhibicijske cone ≤ 21 mm. Za meticilin občutljivi so bili izolati s premerom inhibicijske cone ≥ 22 mm (CLSI, 2012).

3.4.3 Ugotavljanje odpornosti izolatov MRSA proti glikopeptidnim antibiotikom s predifuzijsko metodo

Morebitno odpornost izolatov MRSA proti glikopeptidnim antibiotikom smo ugotavljali s predifuzijsko metodo, pri kateri smo uporabili antibiotične diske Neo-sensitabs (ROSCO Diagnostica; Taastrup, Danska), ki so vsebovali 30 μg vankomicina (VAN30), 30 μg teikoplanina (TEI30) in 30 μg daptomicina (DAP30). Predifuzijsko metodo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Diske smo položili na gojišče MHA. Gojišče z diski smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi (sobni T), nato smo diske odstranili in gojišče inkubirali še 18 do 22 ur pri sobni T. Na tako pripravljeno gojišče smo nanесли suspenzijo čiste bakterijske kulture gostote 0,5 McFarland in ga inkubirali 18 do 22 ur pri $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Po končani inkubaciji smo izmerili premere inhibicijskih con in rezultate interpretirali po navodilih

proizvajalca. Izolate MRSA s premerom inhibicijske cone VAN30 < 22 mm, TEI30 < 20 mm in/ali DAP30 < 22 mm bi opredelili kot sumljive za GISA.

3.4.4 D-test

Z D-testom smo ugotavljali inducibilno odpornost proti klindamicinu. Disk za eritromicin (15 µg; BD) in klindamicin (2 µg; BD) smo v okviru testiranja občutljivosti za antibiotike z disk difuzijo na gojišču MHA položili skupaj na razdalji 20 mm. Po končani inkubaciji, ki je opisana v poglavju 3.4.1, smo inducibilno odpornost proti klindamicinu potrdili pri izolatih, ki so imeli D-obliko inhibicijske cone okoli diska za klindamicin (CLSI, 2012).

3.4.5 Ugotavljanje prisotnosti beta laktamaze

Prisotnost beta laktamaze smo pri izolatih s premerom inhibicijske cone ≥ 29 mm določili z oceno roba inhibicijske cone okoli diska za penicilin. Test smo ocenili kot pozitiven pri izolatih, pri katerih je bil rob inhibicijske cone oster. Ti izolati so tvorili beta laktamazo, zato smo jih interpretirali kot odporne proti penicilinu. Test smo ocenili kot negativen pri izolatih, pri katerih je bil rob inhibicijske cone zabrisan. Ti izolati niso tvorili beta laktamaze, zato smo jih interpretirali kot občutljive za penicilin (CLSI, 2012).

3.4.6 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

MIK smo po smernicah CLSI (2012) določili za vankomicin in teikoplanin pri izolatih MRSA in za izbrane antibiotike z MIC Test Strips (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija). Bakterijsko suspenzijo smo pripravili in nanegli na gojišče na enak način kot pri disk difuzijski metodi, ki je opisana v poglavju 3.4.1. Na ploščo smo položili lističe, na katerih je v koncentracijskem gradientu nanešen izbrani antibiotik. Ploščo smo inkubirali v aerobnih pogojih 18 do 24 ur pri temperaturi $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Rezultate občutljivosti smo podali z MIK antibiotika v µg/ml. Občutljivost za mupirocin smo interpretirali po smernicah BSAC, po katerih so bili izolati z MIK > 256 µg/ml visoko odporni proti mupirocinu (ang. high level resistance, HLR), izolati z MIK 2–256 µg/ml nizko odporni proti mupirocinu (ang. low level resistance, LLR) in izolati z MIK ≤ 1 µg/ml občutljivi za mupirocin (Andrews in sod., 2009).

3.5 MOLEKULARNE METODE

3.5.1 Osamitev bakterijske DNA

Za osamitev bakterijske DNA smo uporabili komercialni testni komplet LightCycler® Advanced Lysis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Stafilokokno genomsko DNA smo osamili iz dveh do treh kolonij čiste bakterijske kulture

S. aureus, ki smo jih s sterilnim brisom prenesli v epruveto s plastičnimi kroglicami in liznim pufrom testnega kompleta za osamitev DNA. Delo smo opravili v ločenem prostoru, namenjenemu le osamitvi DNA iz kulture, in na ta način preprečili kontaminacijo drugih prostorov z DNA. Bris smo odlomili, epruveto zaprli in inkubirali 2 minuti v termobloku (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) pri temperaturi 95 °C. Sledila je homogenizacija na aparaturi za mehansko razbitje celic MagNA Lyser (Roche Diagnostics). Epruveto smo vstavili v centrifugo (Centrifuga 5415R; Eppendorf), ter centrifugirali 1 min pri 13.000 obratih. Osamljeno bakterijsko DNA smo shranili v zamrzovalnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija) pri -20 °C.

3.5.2 Elektroforeza v gelu

Metoda elektroforeze v gelu omogoča ločevanje fragmentov DNA po velikosti. Uporabljali smo jo za ugotavljanje prisotnosti in ustreznosti velikosti fragmentov DNA, namnoženih s PCR. Najprej smo pripravili 10-kratni pufer TAE tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redestilirani vodi, ki smo jo pripravili v sistemu za pridobivanje ultra čiste vode (Protegra CS, Siemens, München, Nemčija), raztopili 48,45 g/l baze Tris (Sigma-Aldrich) in 3,72 g/l EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina; Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redestilirane vode do 1 l raztopine (pH 8). Raztopino smo filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 µm (Millipore Express Plus Vacuum Driven Disposable Filtration System, Billerica). V nadaljevanju smo pripravili 1-kratni pufer TAE tako, da smo v 100 ml 10-kratnega pufra TAE dodali 900 ml redestilirane vode (pH 8). S tako pripravljenim pufrom smo napolnili elektroforezno banjico BE 33 (Hoefer, Holliston, ZDA). Za elektroforezo smo uporabili 2-odstotni agarozni gel, ki smo ga pripravili iz 100 g agaroze (Sigma-Aldrich) in 50 ml 10-kratnega pufra TAE ter dodali 5 µl barvila SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, ZDA). Agarozni gel smo položil na sredino elektroforezne banjice in v prvi žepki (ki smo ga z glavničkom oblikovali v gel, preden je polimeriziral) prenesli 3 µl molekularnega označevalca velikosti 100 bp (15628-019, Ladder; Invitrogen). V naslednje žepke v agaroznem gelu smo prenesli po 2 µl nanašalnega elektroforeznega barvila (DNA Loading Dye; Sigma-Aldrich) in 5 µl pridelka PCR. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 130 V, ki smo jo generirali s pomočjo aparature PS 600 (Hoefer, Holliston, ZDA).

3.5.3 Molekularne genotipizacijske metode

3.5.3.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST)

Protokol za MLST, s katero ugotavljamo podobnost izolatov s pomočjo določanja nukleotidnih zaporedij notranjih odsekov sedmih hišnih genov *S. aureus*, smo povzeli po Enrightu in sod. (2000) in ga ustrezno optimizirali.

3.5.3.1.1 PCR pri MLST

Klasično metodo verižne reakcije pomnoževanja DNA s polimerazo (ang. polimerase chain reaction, PCR) smo izvedli na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra, Göttingen, Nemčija). Uporabili smo sedem parov oligonukleotidnih začetnikov, in sicer en par za vsak genski odsek. Vsak par oligonukleotidnih začetnikov je pomnoževal različno dolg odsek DNA. V Preglednici 1 so prikazani oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za določanje nukleotidnih zaporedij genskih odsekov na sedmih hišnih genih. Za določanje posameznega genskega odseka smo izvedli ločeno PCR. Za vsak vzorec smo torej izvedli sedem različnih PCR s po 75 µl končne prostornine reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezen vzorec. Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno deionizirano vodo (ddH₂O) (Roche Diagnostics). V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po 37,5 µl komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen, Hilden, Nemčija), 1,5 µl ustreznih oligonukleotidnih začetnikov za posamezen genski odsek v koncentraciji 10 µM (*arcC-F/R*, *aroE-F/R*, *glpF-F/R*, *gmk-F/R*, *pta-F/R*, *tpi-F/R*, *yqiL-F/R*; TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in 27 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori smo za posamezen vzorec prenesli po 67,5 µl tako pripravljene reakcijske mešanice v 200-mikrolitrsko epruvetko za PCR (STARLAB, Hamburg, Nemčija). Epruvetke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 7,5 µl osamljene bakterijske DNA. Epruvetke smo kratko centrifugirali v centrifugi Mini Spin Plus (Eppendorf) in prenesli v aparaturo za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra), v kateri smo izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je stopnja začetne denaturacije potekala 5 minut pri 95 °C, sledilo je 30 ponovitev 60-sekundne denaturacije pri 94 °C, 60-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 55 °C in 60-sekundnega pomnoževanja pri 72 °C. Končno pomnoževanje je potekalo 5 minut pri 72 °C. Vse PCR so potekale pod enakimi pogoji. Nato je sledilo ohlajanje na 4 °C (Enright in sod., 2000).

3.5.3.1.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri MLST

Za dokazovanje pridelkov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v gelu, ki je opisana v poglavju 3.5.2. Po končani elektroforezi smo pridelke PCR opazovali s pomočjo UV svetlobe na aparaturi Gel Doc XR System (Bio-Rad). Velikost pridelkov PCR smo določili tako, da smo primerjali njihovo lego glede na molekularni označevalec. Velikosti odsekov sedmih hišnih genov so zbrane v Preglednici 1. Prisotnost pridelka PCR ustrezne molekulske mase smo ovrednotili kot pozitiven vzorec, odsotnost pridelka PCR pa kot negativen vzorec.

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje sedmih hišnih genov, in velikosti pridelkov PCR.

Table 1: Primers used for determination of seven housekeeping genes and the size of PCR products.

gen	oligonukleotidni začetnik	velikost pridelka PCR (bp)	nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov (5'–3')
karbamat kinaza (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -F <i>arcC</i> -R	456	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
shikimat dehidrogenaza (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -F <i>aroE</i> -R	456	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC
glicerol kinaza (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -F <i>glpF</i> -R	465	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATC
gvanilat kinaza (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -F <i>gmk</i> -R	429	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
fosfat acetil transferaza (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -F <i>pta</i> -R	474	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
trioze fosfat izomeraza (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -F <i>tpi</i> -R	402	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
acetil koencim A acetil transferaza (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -F <i>yqiL</i> -R	516	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

3.5.3.1.3 Sekvenciranje

Pripravo za sekvenciranje s čiščenjem pridelkov PCR in sekvenciranje so izvedli v laboratoriju Macrogen Europe Laboratory v Amsterdamu na Nizozemskem.

3.5.3.1.4 Določanje sekvenčnega tipa (ST)

ST posameznega izolata smo določili s pomočjo podatkovne baze, ki je dostopna na svetovnem medmrežju (MLST, 2014). V program smo vnesli sekvence za vsakega od sedmih odsekov hišnih genov posameznega izolata in dobili podatek o številki alela. Na osnovi zaporedja sedmih celih števil alelov je program opredelil alelni profil posameznega izolata, ki enoznačno določa njegov ST. V nadaljevanju smo CC izolata določili s pomočjo algoritma eBURST, ki je dostopen na svetovnem medmrežju (eBURST, 2014). SAk in SAB smo primerjali z izrisom drevesa sorodnosti po metodi minimalnega vpetega drevesa (ang. minimum spanning tree) s pomočjo programske opreme BioNumerics 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija).

3.5.3.2 Tipizacija *spa*

Z določanjem nukleotidnega zaporedja lokusa *spa* smo izolatom določili *spa*-tip. Protokol za tipizacijo *spa* smo povzeli po Harmsenu in sod. (2003) in ga ustrezno optimizirali.

3.5.3.2.1 PCR pri tipizaciji *spa*

Lokus *spa* smo pomnožili s pomočjo ustreznih oligonukleotidnih začetnikov (*spa*1113-F 5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3' in *spa*1514-R 5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3'; TIB MOLBIOL) z metodo klasične PCR, ki smo jo izvedli na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra). Končna skupna prostornina reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezen vzorec je znašala 50 µl. Kot negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O (Roche Diagnostics). V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po 25 µl komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 2 µl ustreznih oligonukleotidnih začetnikov v koncentraciji 0,2 µM (*spa*1113-F in *spa*1514-R; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca, in 16 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori smo za posamezen vzorec prenesli po 45 µl tako pripravljene PCR mešanice v 200-mikrolitrške epruvtke za PCR (STARLAB). Epruvtke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 5 µl osamljene bakterijske DNA. Epruvtke smo kratko centrifugirali v centrifugi Mini Spin Plus (Eppendorf) in prenesli v aparaturo za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra), v kateri smo izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je stopnja začetne denaturacije potekala 5 minut pri 95 °C. Sledilo je 35 ponovitev 45-sekundne denaturacije pri 94 °C, 45-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 60 °C in 60-sekundnega pomnoževanja pri 72 °C. Končno pomnoževanje je potekalo 10 minut pri 72 °C. Nato je sledilo ohlajanje na 4 °C (Harmsen in sod., 2003).

3.5.3.2.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri tipizaciji *spa*

Za dokazovanje pridelkov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v gelu, ki je opisana v poglavju 3.5.2. Po končani elektroforezi smo prisotnost produktov opazovali s pomočjo UV svetlobe na aparaturi Gel Doc XR System (Bio-Rad). Prisotnost pridelka PCR smo ovrednotili kot pozitiven vzorec, odsotnost pridelka PCR pa kot negativen vzorec.

3.5.3.2.3 Sekvenciranje

Pripravo za sekvenciranje s čiščenjem pridelkov PCR in sekvenciranje so izvedli v laboratoriju MacroGen Europe Laboratory v Amsterdamu na Nizozemskem.

3.5.3.2.4 Določanje *spa*-tipa

Dobljene sekvence smo vnesli v program Ridom StaphType (Ridom GmbH), ki je sekvence analiziral in jim določil *spa*-tip (Harmsen in sod., 2003). Sekvence smo v nadaljevanju vnesli tudi v podatkovno bazo na medmrežju (Ridom Spa Server, 2014), ki je prosto dostopna vsem uporabnikom. Na ta način smo v podatkovno bazo dodali nove *spa*-tipe in dobili podatke o globalni razširjenosti posameznega *spa*-tipa (Harmsen in sod., 2003). SAK in SAb smo primerjali z izrisom drevesa sorodnosti po metodi minimalnega vpetega drevesa s pomočjo programske opreme BioNumerics 7.1 (Applied Maths).

3.5.3.3 Tipizacija SCC*mec*

Pri izolatih MRSA smo ugotavljali prisotnost tipov SCC*mec* I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, IVg, IVh ali V z metodo multipleks PCR, ki smo jo povzeli po Zhangu in sod. (2005), Itu in sod. (2007) in Milheiriçovi in sod. (2007) ter jo ustrezno optimizirali. Metoda multipleks PCR je različica klasične PCR, pri kateri v eni PCR hkrati pomnožimo odseke DNA za več različnih genov s pomočjo več oligonukleotidnih začetnikov (Milheiriço in sod., 2007).

3.5.3.3.1 PCR pri tipizaciji SCC*mec*

Multipleks PCR smo izvedli na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra). V eni reakciji smo uporabili deset parov oligonukleotidnih začetnikov, in sicer en par za vsak tip SCC*mec*. Vsak par oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili za pomnoževanje različno dolgega odseka DNA. V Preglednici 2 so prikazani oligonukleotidni začetniki in velikost odsekov DNA, ki smo jih pomnožili (Zhang in sod., 2005; Milheiriço in sod., 2007). Končna skupna prostornina reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezen vzorec je znašala 25 µl. Vključili smo tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili DNA referenčnih sevov ATCC 700699, NCTC 10442, za negativno kontrolo pa ddH₂O (Roche Diagnostics). V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po 12,5 µl komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 0,5 µl oligonukleotidnih začetnikov za vsak tip SCC*mec* v koncentraciji 0,2 µM (tip I-F/I-R, tip II-F/II-R, tip III-F/III-R, tip IVa-F/IVa-R, tip IVb-F/IVb-R, tip IVc-F/IVc-R, tip IVd-F/IVd-R, tip IVg-F/IVg-R, tip IVh-F/IVh-R, tip V-F/V-R; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in 1,5 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori smo za posamezen vzorec prenesli po 24 µl tako pripravljene reakcijske mešanice v 200-mikrolitrsko epruvtko za PCR (STARLAB). Epruvtke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 1 µl osamljene bakterijske DNA. Epruvtke smo kratko centrifugirali v centrifugi Mini Spin Plus

(Eppendorf) in prenesli v aparaturo za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra), v kateri smo izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je stopnja začetne denaturacije potekala 3 minute pri 95 °C. Sledilo je 35 ponovitev 30-sekundne denaturacije pri 94 °C, 30-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 50 °C in 30-sekundnega pomnoževanja pri 72 °C. Končno pomnoževanje je potekalo 5 minut pri 72 °C. Nato je sledilo ohlajanje na 4 °C (Zhang in sod., 2005; Ito in sod., 2007; Milheiriço in sod., 2007).

Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje tipov SCC*mec*, in velikosti pridelkov PCR.

Table 2: Primers used for determination of SCC*mec* types and the size of PCR products.

tip SCC <i>mec</i>	oligonukleotidni začetnik	velikost pridelka PCR (bp)	nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov (5'-3')
I	I-F I-R	613	GCTTTAAAGAGTGTTCGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTC
II	II-F II-R	398	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC
III	III-F III-R	280	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG
IVa	IVa-F IVa-R	776	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG
IVb	IVb-F IVb-R	493	TCTGGAATTAATTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC
IVc	IVc-F IVc-R	200	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG
IVd	IVd-F IVd-R	881	CTCAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG
IVg	IVg-F IVg-R	792	TGATAGTCAAAGTATGGTGG GAATAATGCAAAGTGGAAACG
IVh	IVh-F IVh-R	663	TTCTCGTTTTTCTGAACG CAAACACTGATATTGTGTCG
V	V-F V-R	325	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC

3.5.3.3.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri tipizaciji SCC*mec*

Za dokazovanje pridelkov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v gelu, ki je opisana v poglavju 3.5.2. Po končani elektroforezi smo pridelke PCR opazovali s pomočjo UV svetlobe na aparaturi Gel Doc XR System (Bio-Rad). Velikost pridelkov PCR smo določili tako, da smo primerjali njihovo lego glede na molekularni označevalec. Velikosti pridelkov PCR različnih tipov SCC*mec* so zbrane v Preglednici 2. Prisotnost pridelka PCR ustrezne molekulske mase smo ovrednotili kot pozitiven vzorec, odsotnost pridelka PCR pa kot negativen vzorec.

3.5.3.4 Določanje *mecC*

Pri izolatih MRSA, pri katerih z metodo tipizacije *SCCmec*, ki je opisana v poglavju 3.5.3.3, nismo uspeli določiti tipa *SCCmec*, smo preverjali morebitno prisotnost *mecC* z metodo, ki smo jo povzeli po Garcíi-Álvarez in sod. (2011) ter jo ustrezno optimizirali.

3.5.3.4.1 PCR pri določanju *mecC*

Klasičen PCR smo izvedli na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra). Uporabili smo sedem parov oligonukleotidnih začetnikov, in sicer en par za vsak genski odsek. Vsak par oligonukleotidnih začetnikov je pomnoževal različno dolg odsek DNA. V Preglednici 3 so prikazani oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za določanje genov *mecA* in *femB* (prva PCR), *mecI* in *mecR1* (druga PCR), *ccrA* in *ccrB* (tretja PCR) ter *blaZ* (četrtja PCR). Za vsak vzorec smo torej izvedli štiri različne PCR s po 25 µl končne prostornine reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezen vzorec. Za pozitivni kontroli smo uporabili DNA referenčnega seva ATCC 43300 in DNA seva MRSA s prisotnim *mecC* iz zunanje laboratorijske kontrole UK NEQAS (ang. United Kingdom National External Quality Assessment Service), številka 0431, oznaka seva FM 143. Za negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O (Roche Diagnostics). V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Prva, druga in tretja reakcijska mešanica so vsebovale 12,5 µl komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 1 µl ustreznih oligonukleotidnih začetnikov *mecA-F/mecA-R* in *fem-F/fem-R*; *mecI-F/mecI-R* in *mecR1-F/mecR1-R*; *ccrA-F/ccrA-R* in *ccrB-F/ccrB-R* v koncentraciji 0,4 µM (TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in 3,5 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. Četrta reakcijska mešanica je vsebovala po 12,5 µl komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 1 µl oligonukleotidnih začetnikov *blaZ-F/blaZ-R* v koncentraciji 0,4 µM (TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in 5,5 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori smo za posamezen vzorec prenesli po 20 µl tako pripravljene ustrezne reakcijske mešanice v 200-mikrolitrsko epruvetko za PCR (STARLAB). Epruvetke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 5 µl osamljene bakterijske DNA. Epruvetke smo kratko centrifugirali v centrifugi Mini Spin Plus (Eppendorf) in prenesli v aparaturo za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra), v kateri smo izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je stopnja začetne denaturacije potekala 5 minut pri 95 °C. Sledilo je 30 ponovitev 60-sekundne denaturacije pri 94 °C, 60-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 55 °C in 120-sekundnega pomnoževanje pri 72 °C. Končno pomnoževanje je potekalo 7 minut pri 72 °C. Vse PCR so potekale pod enakimi pogoji. Nato je sledilo ohlajanje na 4 °C (García-Álvarez in sod., 2011).

3.5.3.4.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri določanju *mecC*

Za dokazovanje pridelkov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v gelu, ki je opisana v poglavju 3.5.2. Po končani elektroforezi smo pridelke PCR opazovali s pomočjo UV svetlobe na aparaturi Gel Doc XR System (Bio-Rad). Prisotnost pridelkov PCR velikosti 356 bp, 651 bp, 710 bp, 932 bp in 809 bp smo ovrednotili kot *mecC*-pozitiven vzorec. Prisotnost pridelkov PCR velikosti 356 bp in 651 bp smo ovrednotili kot *mecA*-pozitiven vzorec. Odsotnost ustreznih pridelkov PCR smo ovrednotili kot negativen vzorec.

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje genov *mecA* in *femB*, *mecI* in *mecR1*, *ccrA* in *ccrB* ter *blaZ*, in velikosti pridelkov PCR.

Table 3: Primers used for determination of *mecA* and *femB*, *mecI* and *mecR1*, *ccrA* and *ccrB*, and *blaZ* genes, and the size of PCR products.

gen	oligonukleotidni začetnik	velikost pridelka PCR (bp)	nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov (5'–3')
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -F <i>mecA</i> -R	356	TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTTC
<i>femB</i>	<i>fem</i> -F <i>fem</i> -R	651	TTACAGAGTTAACTGTTACC ATACAAATCCAGCAGCTCT
<i>mecI</i>	<i>mecI</i> -F <i>mecI</i> -R	344	TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA ATTCTTCAATATCATCTTCGGAC
<i>mecR1</i>	<i>mecR1</i> -F <i>mecR1</i> -R	710	GGCTCAGTTAAATCATAAAGTTTG AAATTGCCTTACCATAGCTTGTGT
<i>ccrA</i>	<i>ccrA</i> -F <i>ccrA</i> -R	932	GCAATAGGTTATCTACGTCAAAG TCTAATGATTGTGCGTTGATTCC
<i>ccrB</i>	<i>ccrB</i> -F <i>ccrB</i> -R	1449	TTCGTGTATCGACAGAAATGCAG CATCTTTACGAATATCAATACGG
<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i> -F <i>blaZ</i> -R	809	AGTCGTGTTAGCGTTGATATTA CAATTCAGCAACCTCACTACTA

3.5.3.5 Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*

Sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz rane in nosu pri istem bolniku z OKMT (in sorodnost treh do štirih izolatov *S. aureus*, osamljenih iz primarnih plošč desetih zaporednih pozitivnih vzorcev različnih zdravih oseb), smo opredelili z metodo PFGE z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*, ki smo jo povzeli po Isenbergu (2010) ter jo ustrezno optimizirali.

3.5.3.5.1 Osamitev DNA iz čiste bakterijske kulture *S. aureus* z metodo vključitve v gel

Najprej smo pripravili pufer SE tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redistirani vodi raztopili 9,3 g/l EDTA (Sigma-Aldrich) in 4,38 g/l NaCl (Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redistirane vode do 1 l prostornine raztopine (pH 7,5). Raztopino smo filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 µm. Iz čiste bakterijske kulture smo

v 1 ml pufru SE pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 3,5 do 4,0 McFarlanda. Tako pripravljene bakterijske suspenzije smo dodali enak volumen 2-odstotne agaroze z nizkim tališčem (LMPA, Invitrogen), dobro premešali, ter nalili v modelčke za kockice (Bio-Rad). Modelčke smo dali v hladilnik za vsaj 30 minut. Tako smo pripravili kockice bakterijskih celic, vklopljenih v agarozo z nizkim tališčem. V nadaljevanju smo pripravili litični pufer za po Gramu pozitivne bakterije (GP) tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redestilirani vodi raztopili 0,9456 g/l Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 58,44 g/l natrijevega klorida (NaCl) (Sigma-Aldrich), 37,22 g/l EDTA (Sigma-Aldrich), 5 g/l polioksietilen-20-cetilnega etra (Brij 58, Merck Sharp & Dohme), 203,3 mg/l magnezijevega klorida (MgCl₂) (Sigma-Aldrich) in 5 g/l lauril sarkozina (Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redestilirane vode do 1 l prostornine raztopine (pH 7,5). Raztopino smo filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 µm. Pufru GP smo pred uporabo dodali 500 µg/ml lizocima in 5U/ml lizostafina. V tako pripravljen pufer GP smo dali kockice in jih inkubirali 24 ur pri 37° C v inkubatorju s stresalnikom (80–100 obratov/min) (INNOVA 40, New Brunswick Scientific, New Jersey, ZDA). Po končani inkubaciji smo pufer GP nadomestili z litičnim pufrom za po Gramu negativne bakterije (GN), ki smo ga pripravili tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redestilirani vodi raztopili 186,12 g/l EDTA (Sigma-Aldrich) in 10 g/l lauril sarkozina (Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redestilirane vode do prostornine raztopine 1 l (pH 9,5). Raztopino smo filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 µm. Pufru GN smo pred uporabo dodali 50 mg/ml proteinaze K. Kockice smo v tako pripravljenem pufru GN inkubirali 24 ur pri 56 °C v inkubatorju s stresalnikom (80–100 obratov/min) (INNOVA 40, New Brunswick Scientific). Po končani inkubaciji smo kockice 4-krat sprali z 1-kratnim pufrom TE, ki smo ga pripravili tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redestilirani vodi , raztopili 3,72 g/l EDTA (Sigma-Aldrich) in 1,576 g/l Tris-HCl (Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redestilirane vode do 1 l prostornine raztopine (pH 8). Raztopino smo filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 µm. Med vsakim spiranjem smo kockice z 1-kratnim pufrom TE inkubirali 30–60 minut v hladilniku. S tem postopkom smo se znebili vseh celičnih komponent in dobili čisto genomsko DNA, vklopljeno v agarozo z nizkim tališčem (Isenberg, 2010).

3.5.3.5.2 Makrorestrikcija z encimom *SmaI*

Polovico kockice z genomsko DNA smo prenesli v 1,5-mililitrsko tubico (Eppendorf) z 180 µl redestilirane vode in 20 µl restriksijskega pufru (*SmaI*, Roche Diagnostics) ter inkubirali 1 uro na sobni T. Po eni uri inkubacije smo restriksijski pufer odstranili in ga nadomestili s svežim. Dodali smo še 4 µl encima *SmaI* (*SmaI*, Roche Diagnostics) ter inkubirali 24 ur pri 37 °C (Isenberg , 2010).

3.5.3.5.3 Postopek elektroforeze v pulzirajočem električnem polju

Najprej smo pripravili 10-kratni pufer TBE tako, da smo v elrenmajerici pri sobni T v redestilirani vodi raztopili 108 g/l Tris-baze (Bio-Rad), 55 g/l borove kisline (Merck Sharp & Dohme) in 4,6 g/l EDTA (Sigma-Aldrich) ter dopolnili z ustrežno količino redestilirane vode do 1 l prostornine raztopine (pH ni potrebno umerjati) in raztopino filtrirali z vakuumsko filtracijo skozi filtre velikosti 0,22 μm . Tik pred uporabo smo pripravili 200 ml 0,5-kratnega pufra TBE, tako da smo v 175 ml redestilirane vode dodali 25 ml 10-kratnega pufra TBE. Tako pripravljen pufer smo uporabili za izdelavo 1-odstotnega PFGE agaroznega gela (Bio-Rad). CHEF-DR III elektroforezni sistem (Bio-Rad) smo pred uporabo sprali z redestilirano vodo. Nato smo pripravili dodatna 2 l 0,5-kratnega pufra TBE tako, da smo v 1,9 l vode dodali 100 ml 10-kratnega pufra TBE in ga rahlo premešali. S tako pripravljenim pufrom smo napolnili CHEF-DR III elektroforezni sistem (Bio-Rad). Na sredino elektroforeznega sistema smo položili gel, v katerega smo v prvi, osmi in petnajsti žep (ki smo ga z glavničkom oblikovali v gel, preden je polimeriziral) dodali molekularni označevalec velikosti 50–1000 kb (Lambda-Ladder PFGE marker, New England Biolabs, Massachusetts, ZDA). V ostale žepke na gelu smo previdno polagali kockice gela z genomsko DNA. Elektroforeza je potekala v 0,5-kratnem pufru TBE pri naslednjih pogojih: jakost električnega polja 6 V/cm, temperatura 13 °C, naraščajoči pulzni čas od 5 do 60 sekund in trajanje 23 ur (Isenberg, 2010).

3.5.3.5.4 Ugotavljanje sorodnosti izolatov

Po končani elektroforezi smo gel barvali z etidijevim bromidom (0,5 mg/l) v temi 20 minut do 1 ure. Gel smo fotografirali pod UV svetlobo z Gel Doc XR sistemom (Bio-Rad). Pulzotipe *SmaI* smo analizirali s pomočjo programske opreme BioNumerics 7.1 (Applied Maths). Sorodnost med sevi smo izračunali s koeficientom Dice in na osnovi razlik v številu fragmentov. Z metodo UPGMA smo rekonstruirali drevo sorodnosti. Pri določanju položajev fragmentov smo dopustili toleranco zamika med fragmenti 1,375 % in določili optimizacijo 0,5 %. Po merilih, ki so jih predlagali van Belkum in sod. (2007) in Tenover in sod. (1995), smo kot sorodne označili izolate, pri katerih so se pulzotipi *SmaI* razlikovali v največ treh fragmentih, kot verjetno sorodne pa izolate s štiri do šest fragmentov razlike (koeficient Dice 0,8).

3.5.4 Določanje genov za virulentne dejavnike

3.5.4.1 Določanje genov za citolizin Hla

Citolizini Hla delajo pore v celični steni epitelijskih celic, eritrocitov in številnih levkocitov ter poškodujejo celico. Prisotnost *hla* smo določili z metodo PCR v realnem času (ang.

real-time PCR), ki je novejša različica PCR in nam omogoča pomnoževanje tarčnega nukleotidnega zaporedja, istočasno spremljanje poteka pomnoževanja in dokazovanje pridelkov PCR ter njihovo kvantifikacijo s pomočjo uporabe fluorescentnih barvil oziroma oligonukleotidnih sond (Mackay in sod., 2002; Mackay, 2004). Oligonukleotidne začetnike smo povzeli po Leeju in sod. (2010).

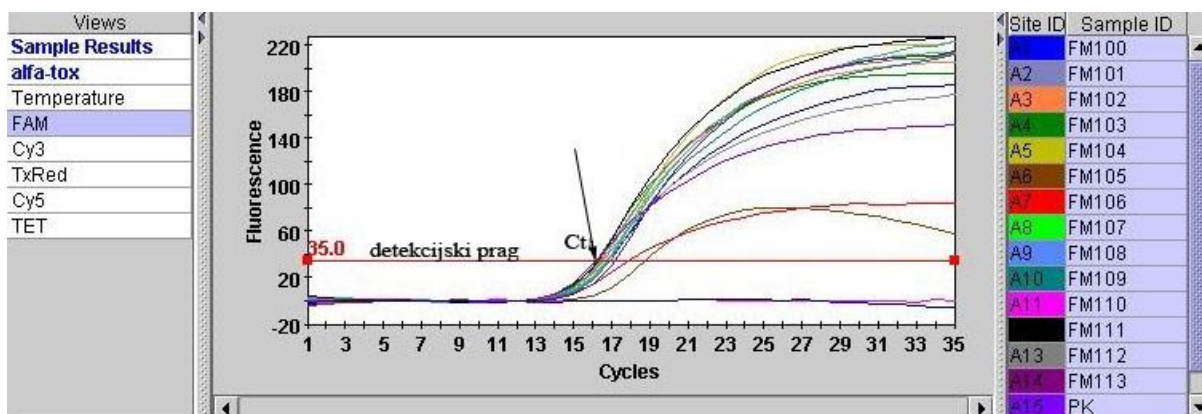
3.5.4.1.1 PCR v realnem času pri določanju genov za Hla

PCR v realnem času smo izvedli na aparaturi SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili DNA referenčnega seva ATCC 700699, kot negativno kontrolo pa ddH₂O (Roche Diagnostics). Končna skupna prostornina reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezni vzorec je znašala 25 µl. V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice. Reakcijsko mešanico smo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po 12,5 µl komercialne mešanice (Platinum qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen), 0,75 µl oligonukleotidnih začetnikov v koncentraciji 20 µM in detekcijske sonde za *hla* (*hla*-F 5'-CCGGTACTACAGATATAGGAAGCAATA-3', *hla*-R 5'-CGCCTTCTTCGCTATAAACTC-3' in *hla*-probe 5'-FAM-ACGAAAGGTACCATTGCTGGTCAGT-TAMRA-3'; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, ter 9,25 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V epruvtke za SmartCycler (Cepheid) smo v istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori prenesli po 22,5 µl zgoraj opisane reakcijske mešanice za posamezen vzorec. Epruvtke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 2,5 µl osamljene DNA. Epruvtke smo centrifugirali v centrifugi SmartCycler (Cepheid), jih prenesli v aparaturo SmartCycler II (Cepheid) in izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je aktivacija reakcijske mešanice s sprostitvijo nukleotidov, termostabilne DNA-polimeraze in magnezijevih ionov potekala 2 minuti pri 50 °C. Sledila je 2-minutna začetna aktivacija termostabilne DNA-polimeraze pri 95 °C in 35 ponovitev 15-sekundne denaturacije pri 95 °C, 60-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja DNA pri 57 °C. Nato je sledilo postopno dvigovanje temperature za 0,1 °C na sekundo od 65 do 95 °C z namenom ugotavljanja specifičnosti pridelkov PCR.

3.5.4.1.2 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za Hla

Za vsak vzorec smo v programu aparature SmartCycler II (Cepheid) odčitali graf krivulje pomnoževanja, na kateri je bilo na abscisi prikazano število ciklov in na ordinati količina fluorescence, ter izpis rezultatov. Kot pozitivne smo smatrali vse vzorce, pri katerih je bil Ct < 30 (WVDL, 2013). Pri vsaki reakciji smo preverjali morebitno inhibicijo z

odčitavanjem Ct-pozitivne kontrole in morebitno kontaminacijo z odčitavanjem Ct-negativne kontrole (Slika 5).



Ct, cikel v katerem je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja; prag detekcije (ang. threshold cycle).

Views	Sample Results	<FAM>	Errors	History		
Site ID	Sample ID	Assay Result	Warning/ Error Code	Sample Type	Notes	
A1	FM100	Positive		SPEC		
A2	FM101	Positive		SPEC		
A3	FM102	Positive		SPEC		
A4	FM103	Positive		SPEC		
A5	FM104	Positive		SPEC		
A6	FM105	Positive		SPEC		
A7	FM106	Positive		SPEC		
A8	FM107	Positive		SPEC		
A9	FM108	Positive		SPEC		
A10	FM109	Positive		SPEC		
A11	FM110	Negative		SPEC		
A12	FM111	Positive		SPEC		
A13	FM112	Positive		SPEC		
A14	FM113	Positive		SPEC		
A15	PK	Positive		SPEC		
A16	NK	Negative		SPEC		

Slika 5: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za alfa toksin (*hla*) z metodo PCR v realnem času. Sigmoidne krivulje predstavljajo *hla*-pozitiven rezultat.

Figure 5: Example of a graph (above) and a results list (below) for alpha toxin gene (*hla*) identification using the real-time PCR method. Sigmoid curves represent a *hla*-positive result.

3.5.4.2 Določanje genov za superantigen TSST-1

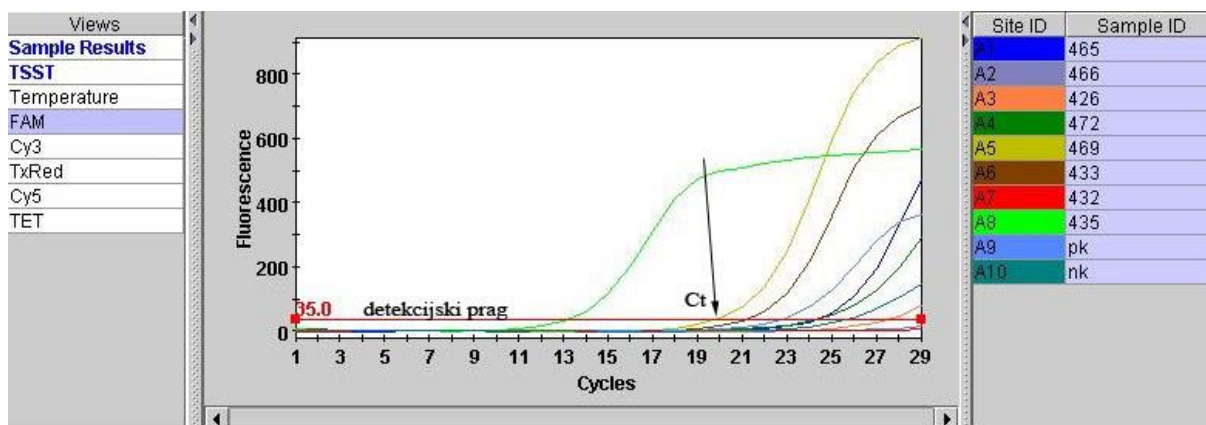
Superantigeni sodijo med najbolj učinkovite aktivatorje celic T-pomagalk. TSST-1 lahko pri človeku povzroči STŠ in mSTŠ. Prisotnost *tst* smo določili s PCR v realnem času. Oligonukleotidne začetnike smo povzeli po Takeuchiju in sod. (1996).

3.5.4.2.1 PCR v realnem času pri določanju genov za TSST-1

PCR v realnem času smo izvedli na aparaturi SmartCycler II (Cepheid). Za pozitivno kontrolo smo uporabili DNA referenčnega seva NTCT 11965, za negativno kontrolo pa ddH₂O (Roche Diagnostics). Končna skupna prostornina reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezni vzorec je znašala 25 µl. Izračunali smo potrebno količino posameznega reagenta glede na število vzorcev in kontrol. Reakcijsko mešanico smo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po 2 µl komercialne mešanice (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics), po 1 µl ustreznih oligonukleotidnih začetnikov v koncentraciji 10 µM (*tst*-F 5'-TTC ACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT-3' in *tst*-R 5'-TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT-3'; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, 1,5 µl MgCl₂ v koncentraciji 25 mM (Roche Diagnostics) in 14,5 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V epruvtke za SmartCycler (Cepheid) smo v istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori prenesli po 20 µl zgoraj opisane reakcijske mešanice za posamezen vzorec. Epruvtke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 5 µl osamljene DNA. Epruvtke smo centrifugirali v centrifugi SmartCycler (Cepheid), jih prenesli v aparaturo SmartCycler II (Cepheid) in izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je potekala začetna aktivacija termostabilne DNA-polimeraze 5 minut pri 95 °C, sledilo je 35 ponovitev 10-sekundne denaturacije pri 95 °C, 15-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 57 °C in 30-sekundnega podaljševanja DNA pri 72 °C. Nato je sledilo dvigovanje temperature za 0,1 °C na sekundo od 65 do 95 °C z namenom ugotavljanja specifičnosti pridelkov PCR.

3.5.4.2.2 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za TSST-1

Za vsak vzorec smo v programu aparature SmartCycler II (Cepheid) odčitali graf krivulje pomnoževanja, na kateri je bilo na abscisi nanešeno število ciklov in na ordinati količina fluorescence, ter izpis rezultatov. Kot pozitivne smo smatrali vse vzorce, pri katerih je bil Ct < 30 (WVDL, 2013). Pri vsaki reakciji smo preverjali morebitno inhibicijo z odčitavanjem Ct-pozitivne kontrole in morebitno kontaminacijo z odčitavanjem Ct-negativne kontrole (Slika 6).



Ct, cikel v katerem je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja; prag detekcije (ang. threshold cycle).

Site ID	Sample ID	Assay Result	Warning/ Error Code	Sample Type	Notes
A1	465	Positive		SPEC	
A2	466	Negative		SPEC	
A3	426	Negative		SPEC	
A4	472	Positive		SPEC	
A5	469	Positive		SPEC	
A6	433	Positive		SPEC	
A7	432	Negative		SPEC	
A8	435	Positive		SPEC	
A9	pk	Positive		SPEC	
A10	nk	Negative		SPEC	

Slika 6: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za toksin toksičnega šoka 1 (*tst*) z metodo PCR v realnem času. Sigmoidne krivulje predstavljajo *tst*-pozitiven rezultat.

Figure 6: Example of a graph (above) and a results list (below) for toxic shock syndrome toxin 1 gene (*tst*) identification using the real-time PCR method. Sigmoid curves represent a *tst*-positive result.

3.5.4.3 Določanje genov za citolizin PVL

Citolizin PVL je dvokomponentni toksin, ki povzroča nastanek por v celični steni monocitov, makrofagov in nevtrofilcev, s čimer jih poškoduje. Prisotnost *pvl* (*lukSF-PV*) smo določili s PCR v realnem času. Oligonukleotidne začetnike smo povzeli po McDonaldu in sod. (2005).

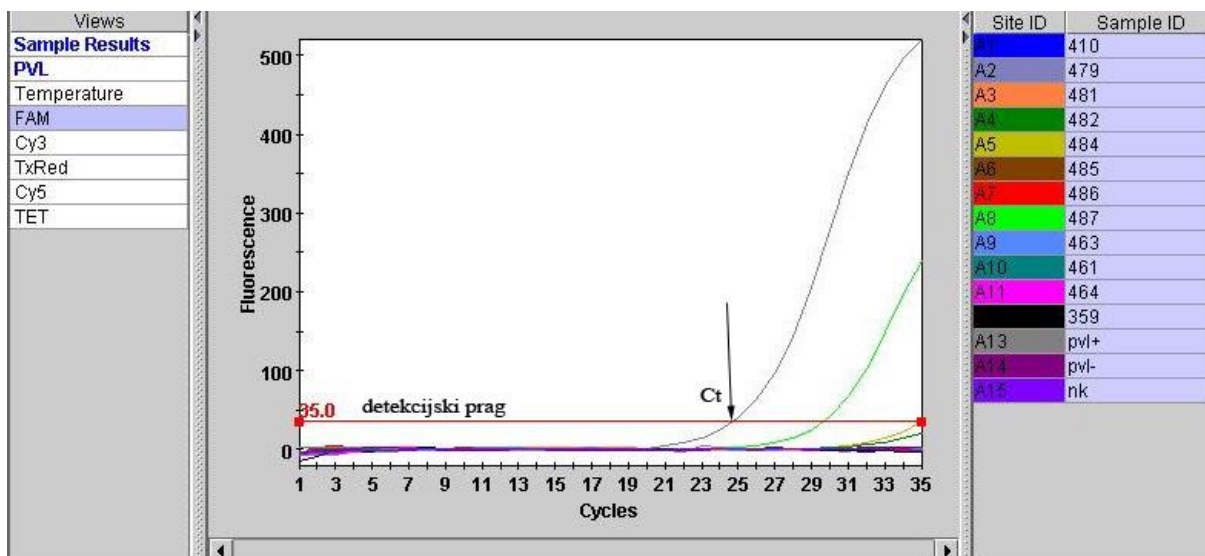
3.5.4.3.1 PCR v realnem času pri določanju genov za PVL

PCR v realnem času smo izvedli na aparaturi SmartCycler II (Cepheid). Za pozitivno kontrolo smo uporabili DNA referenčnega seva ATCC 25923, za negativno kontrolo pa ddH₂O (Roche Diagnostics). Končna skupna prostornina reagentov in DNA za posamezni vzorec je znašala 25 µl. Izračunali smo potrebno količino posameznega reagenta glede na število vzorcev in kontrol. Reakcijsko mešanico smo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvtkah (Eppendorf). Vsebovala je po

2 µl komercialne mešanice (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics), 1 µl ustreznih oligonukleotidnih začetnikov v koncentraciji 10 µM (*lukS*/F-PV-F 5'-ACACACTATGGCAATAGTTATTT-3' in *lukS*/F-PV-R 5'-AAAGCAATGCAATTGATGTA-3'), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, 1,5 µl MgCl₂ v koncentraciji 25 mM (Roche Diagnostics) in 14,5 µl ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. V epruvetke za SmartCycler (Cepheid) smo v istem prostoru in v zaščitni mikrobiološki komori prenesli po 20 µl zgoraj opisane reakcijske mešanice za posamezen vzorec. Epruvetke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 5 µl osamljene DNA. Epruvetke smo centrifugirali v centrifugi SmartCycler (Cepheid), jih prenesli v aparaturo SmartCycler II (Cepheid) in izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je začetna aktivacija termostabilne DNA-polimeraze potekala 5 minut pri 95 °C, sledilo je 35 ponovitev 10-sekundne denaturacije pri 95 °C, 10-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 57 °C in 20-sekundnega podaljševanja DNA pri 72 °C. Nato je sledilo dvigovanje temperature za 0,1 °C na sekundo od 65 do 95 °C z namenom ugotavljanja specifičnosti pridelkov PCR.

3.5.4.3.2 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času pri določanju genov za PVL

Za vsak vzorec smo v programu aparature SmartCycler II (Cepheid) odčitali graf krivulje pomnoževanja, na kateri je bilo na abscisi prikazano število ciklov in na ordinati količina fluorescence in izpis rezultatov. Kot pozitivne smo smatrali vse vzorce, pri katerih je bil $C_t < 30$ (WVDL, 2013). Pri vsaki reakciji smo preverjali morebitno inhibicijo z odčitavanjem C_t -pozitivne kontrole in morebitno kontaminacijo z odčitavanjem C_t -negativne kontrole (Slika 7).



Ct, cikel v katerem je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja; prag detekcije (ang. threshold cycle).

Site ID	Sample ID	Assay Result	Warning/ Error Code	Sample Type	Notes
A1	410	Negative		SPEC	
A2	479	Negative		SPEC	
A3	481	Negative		SPEC	
A4	482	Negative		SPEC	
A5	484	Negative		SPEC	
A6	485	Negative		SPEC	
A7	486	Negative		SPEC	
A8	487	Positive		SPEC	
A9	463	Negative		SPEC	
A10	461	Negative		SPEC	
A11	464	Negative		SPEC	
A12	359	Negative		SPEC	
A13	pvl+	Positive		SPEC	
A14	pvl-	Negative		SPEC	
A15	nk	Negative		SPEC	

Slika 7: Primer grafičnega prikaza (zgoraj) in izpisa rezultatov (spodaj) določanja genov za Panton-Valentinov levkocidin (*pvl* (*lukSF-PV*)) z metodo PCR v realnem času. Sigmoidne krivulje predstavljajo *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven rezultat.

Figure 7: Example of a graph (above) and a results list (below) for Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl* (*lukSF-PV*)) identification using the real-time PCR method. Sigmoid curves represent a *pvl* (*lukSF-PV*)-positive result.

3.5.4.4 Določanje genov za enterotoksine

SE so superantigeni, ki imajo pogosto emetično aktivnost in povzročajo zastrupitve s kontaminirano hrano. Prisotnost *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* in *selj* smo ugotavljali z metodo multipleks PCR, ki smo jo povzeli po Sauerju in sod. (2008) ter jo ustrezno optimizirali. V prvi reakciji smo združili oligonukleotidne začetnike za dokaz odsekov genov *sea*, *see*, *seg* in *seh*, v drugi reakciji pa smo združili oligonukleotidne začetnike za dokaz odsekov genov *seb*, *sec*, *sed*, *sei* in *selj*.

3.5.4.4.1 PCR pri določanju genov za enterotoksine

Izvedli smo dve multipleks PCR na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra). Za prvo reakcijo smo uporabili štiri pare, za drugo reakcijo pa pet parov oligonukleotidnih začetnikov, in sicer en par za vsak gen. Vsak par oligonukleotidnih začetnikov je pomnoževal različno dolg odsek DNA. V Preglednici 4 so prikazani oligonukleotidni začetniki in velikost odsekov DNA, ki smo jih pomnožili. Končna skupna prostornina reakcijske mešanice in osamljene DNA za posamezni vzorec je znašala 25 μ l. Vključili smo tudi pozitivne in negativno kontrolo. Seznam pozitivnih kontrol za posamezen gen je naveden v Preglednici 4, za negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O (Roche Diagnostics). V skladu s številom vzorcev in kontrol smo izračunali potrebno količino posameznega reagenta za pripravo reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili v zaščitni mikrobiološki komori v namenskem prostoru v 1,5-mililitrskih epruvetkah (Eppendorf). Reakcijska mešanica za prvo reakcijo je vsebovala po 12,5 μ l komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 0,75 μ l oligonukleotidnih začetnikov za vsak gen v koncentraciji 10 μ M (*sea*-F/R, *see*-F/R, *seg*-F/R, in *seh*-F/R; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in 1,5 μ l ddH₂O (Roche Diagnostics) za posamezen vzorec. Reakcijska mešanica za drugo reakcijo je vsebovala po 12,5 μ l komercialne mešanice (HotStartTaq®Plus Master Mix Kit, Qiagen), 0,75 μ l oligonukleotidnih začetnikov za vsak gen v koncentraciji 10 μ M (*seb*-F/R, *sec*-F/R, *sed*-F/R, *sei*-F/R in *selj*-F/R; TIB MOLBIOL), ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca, in ni vsebovala ddH₂O za posamezen vzorec. V istem prostoru v zaščitni mikrobiološki komori smo za posamezen vzorec prenesli po 20 μ l tako pripravljene reakcijske mešanice v 200-mikrolitrsko epruvetko za PCR (STARLAB). Epruvetke smo prenesli v prostor za PCR in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako dodali po 5 μ l osamljene bakterijske DNA. Epruvetke smo kratko centrifugirali v centrifugi Mini Spin Plus (Eppendorf) in prenesli v aparaturo za pomnoževanje nukleinskih kislin (Termocycler 3000, Biometra) ter izvedli pomnoževanje DNA s časovno-temperaturnim programom, pri katerem je stopnja začetne denaturacije potekala 5 minut pri 95 °C. Sledilo je 30 ponovitev 30-sekundne denaturacije pri 94 °C, 30-sekundne vezave oligonukleotidnih začetnikov pri 57 °C in 30-sekundnega pomnoževanja pri 72 °C. Končno pomnoževanje je potekalo 5 minut pri 72 °C. Nato je sledilo ohlajanje na 4 °C.

Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za določanje genov *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* in *selj*, velikosti pridelkov PCR in seznam pozitivnih kontrol.

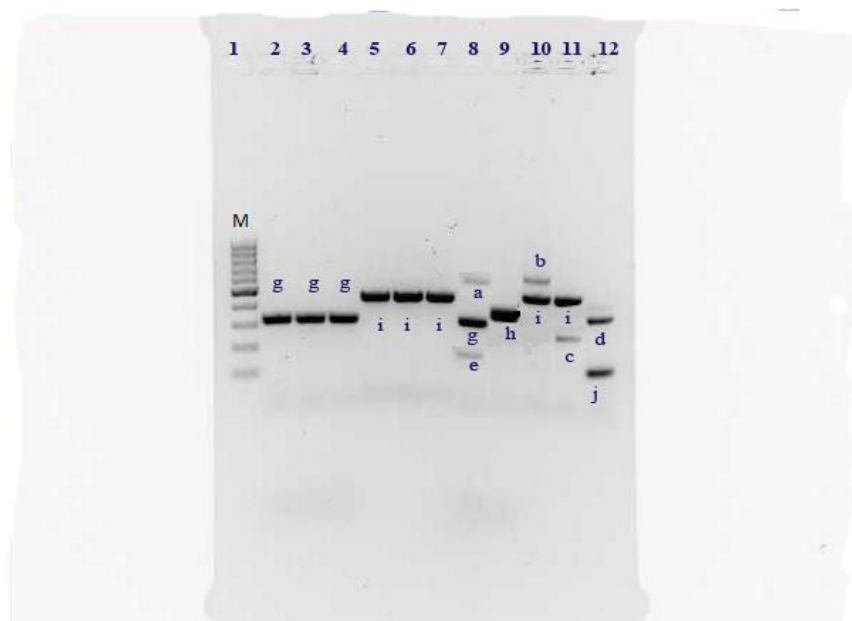
Table 4: Primers used for determination of *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* and *selj* genes, the size of PCR products and the list of positive controls.

gen	oligonukleotidni začetnik	velikost pridelka PCR (bp)	nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov (5'–3')	pozitivna kontrola
<i>sea</i>	<i>sea</i> -F	521	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	ATCC
	<i>sea</i> -R		GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	29213
<i>seb</i>	<i>seb</i> -F	667	ACATGTAAATTTTGATATTCGCACTG	ATCC
	<i>seb</i> -R		TGCAGGCATCATGTCATACCA	700699
<i>sec</i>	<i>sec</i> -F	248	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	NCTC
	<i>sec</i> -R		TGCAGGCATCATATCATAACCA	10655
<i>sed</i>	<i>sed</i> -F	385	GTGGTCAAATAGATAGGACTGC	NCTC
	<i>sed</i> -R		ATATGAAGGTGCTCTGTGG	10656
<i>see</i>	<i>see</i> -F	171	TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC	ATCC
	<i>see</i> -R		CTCTTTGCACCTTACCGC	29213
<i>seg</i>	<i>seg</i> -F	328	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	ATCC
	<i>seg</i> -R		CCAAGTGATTGTCTATTGTCG	29213
<i>seh</i>	<i>seh</i> -F	360	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	NCTC
	<i>seh</i> -R		GTCCAATGAGTAATCTCTAGG	10655
<i>sei</i>	<i>sei</i> -F	466	CAACTCGAATTTTCAACAGGTACC	ATCC
	<i>sei</i> -R		CAGGCAGTCCATCTCCTG	700699
<i>selj</i>	<i>selj</i> -F	142	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG	NCTC
	<i>selj</i> -R		CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	10656

sea, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, geni za stafilokokne enterotoksine od A do G; *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J.

3.5.4.4.2 Dokazovanje pridelkov PCR pri določanju genov za enterotoksine

Za dokazovanje pridelkov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v gelu, ki je opisana v poglavju 3.5.2. Po končani elektroforezi smo pridelke PCR opazovali s pomočjo UV svetlobe na aparaturi Gel Doc XR System (Bio-Rad). Velikost pridelkov PCR smo določili tako, da smo primerjali njihovo lego glede na molekularni označevalec in lego pozitivne kontrole (Slika 8). Velikosti pridelkov PCR za gene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* in *selj* so zbrane v Preglednici 4. Prisotnost pridelka PCR ustrezne molekulske mase smo ovrednotili kot pozitiven vzorec, odsotnost pridelka PCR pa kot negativen vzorec.



Slika 8: Primer rezultatov metode multipleks PCR za določanje genov za stafilokokne enterotoksine od A do G (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*) in genov za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J (*seh*, *sei*, *selj*). Na mestih 2 do 4 je vzorec, ki je *seg* (g)-pozitiven, na mestih 5 do 7 je vzorec, ki je *sei* (i)-pozitiven. Na mestu 8 je referenčni sev ATCC 29213 (*sea* (a)-, *seg*- in *see* (e)-pozitiven), na mestih 9 in 11 je referenčni sev NCTC 10655 (*seh* (h)-, *sec* (c)- in *sei*-pozitiven), na mestu 10 je referenčni sev ATCC 700699 (*seb* (b)- in *sei*-pozitiven), na mestu 12 je referenčni sev NCTC 10656 (*sed* (d)- in *selj* (j)-pozitiven). M, molekularni označevalec velikosti 100 bp.

Figure 8: Example of results from the multiplex PCR method for genes for staphylococcal enterotoxins A-G (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*) and genes for staphylococcal enterotoxin-like proteins H-J (*seh*, *sei*, *selj*) identification. Lines 2-4 are *seg* (g)-positive samples, lines 5-7 are *sei* (i)-positive samples, line 8 is reference strain ATCC 29213 (*sea* (a)-, *seg*-, *see* (e)-positive), lines 9 and 11 are reference strains NCTC 10655 (*seh* (h)-*sec* (c)-, *sei*-positive), line 10 is reference strain ATCC 700699 (*seb* (b)-, *sei*-positive), line 12 is reference strain NCTC 10656 (*sed* (d)-, *selj* (j)-positive). M, 100 bp molecular weight marker.

3.5.4.5 Določanje genov za eksfoliativna toksina A in B

Stafilokoki, ki izločajo ETA in ETB, pri človeku povzročajo bulozni impetigo in stafilokokni kožni sindrom z luščenjem. Genov za eksfoliativni toksin A in B (*eta* in *etb*) nismo določili, ker nismo uspeli dobiti ustreznih pozitivnih kontrol (referenčnih sevov ali DNA) za izvedbo metode. Zaradi povečanih bioterorističnih groženj iz Nemčije in Anglije ni bil dovoljen njihov transport izven meja države (DSMZ, 2016).

3.6 STATISTIČNE METODE

3.6.1 Primerjava SAb in SAK

Da bi preverili, ali med SAb in SAK obstaja statistično pomembna razlika v številu različnih izolatov, smo izvedli permutacijski test, se pravi, pripadnost skupini smo določili naključno

s pomočjo permutacij. Za vsako permutacijo, skupno smo izvedli 10.000 permutacij, smo izračunali razliko v številu različnih izolatov med skupinama in tako dobili porazdelitev testne statistike, če bi veljala ničelna domneva. P-vrednost smo dobili kot delež permutiranih absolutnih razlik, ki so bile večje od opažene razlike v številu izolatov med skupinama. Test je bil dvostranski.

Za ugotavljanje prevalece MRSA med SAb in SAk smo uporabili test χ^2 . Za analizo povezanosti med opisnimi spremenljivkami smo uporabili test χ^2 z Yatesovim popravkom oziroma Fisherjevim eksaktnim testom, kot je bilo ustrezno. Izračunali smo tudi razmerje obetov (RO) s pripadajočimi 95-odstotnimi intervali zaupanja (IZ); za izračun smo uporabili logistično regresijo, oziroma v primeru redkih dogodkov logistično regresijo s Firthovim popravkom (Heinze in Schemper, 2002).

Razliko v deležu SAb in SAk smo preverili s testom za dva neodvisna deleža, ki je temeljil na normalni aproksimaciji binomske porazdelitve. Ker smo preverjali veliko različnih izolatov, smo p-vrednosti popravili po Holmovi metodi in tako pravilno nadzorovali napako I. vrste.

P-vrednost, ki je bila manjša od 5 %, je bila upoštevana kot statistično pomembna. Analiza je bila opravljena s programom R (R 3.0.3) (R Development Core Team, 2009).

3.6.2 Analiza demografskih, epidemioloških in kliničnih podatkov o bolnikih

Bolnike smo primerjali na osnovi OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*. Za bolnike z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz rane ali iz rane in nosu. Za bolnike brez OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane, bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane in nosu, ter bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen samo iz nosu. Opisne spremenljivke so predstavljene kot frekvence in deleži, številske spremenljivke pa kot povprečje in standardni odklon oziroma mediana in interkvartilni razmik, kjer je bilo to ustrezno.

Razliko med skupinama bolnikov (z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, in brez OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*) za številske spremenljivke smo preverili s testom t, Welschevim testom t oziroma testom Mann-Whitney, kot je bilo ustrezno. Predpostavko o normalni porazdelitvi smo preverili s testom Shapiro-Wilk, predpostavko o enakih variancah pa z Bartlettovim testom.

Za analizo povezanosti med opisnimi spremenljivkami smo uporabili test χ^2 z Yatesovim popravkom, oziroma Fisherjevim eksaktnim testom, kot je bilo ustrezno. Izračunali smo tudi RO s pripadajočimi 95 % IZ; za izračun smo uporabili logistično regresijo oziroma v primeru redkih dogodkov logistično regresijo s Firthovim popravkom. Opravili smo tudi analizo, kjer

so bila RO popravljena za starost, se pravi, v modelu logistične regresije smo poleg preučevane pojasnjevalne spremenljivke upoštevali še starost. Prileganje modelov smo ocenili s pomočjo Akaikejevega kriterija informacije (AIC) in testom Hosmer-Lemeshow (v tem primeru p-vrednost, ki je večja od 0,05, nakazuje, da se model dobro prilega podatkom).

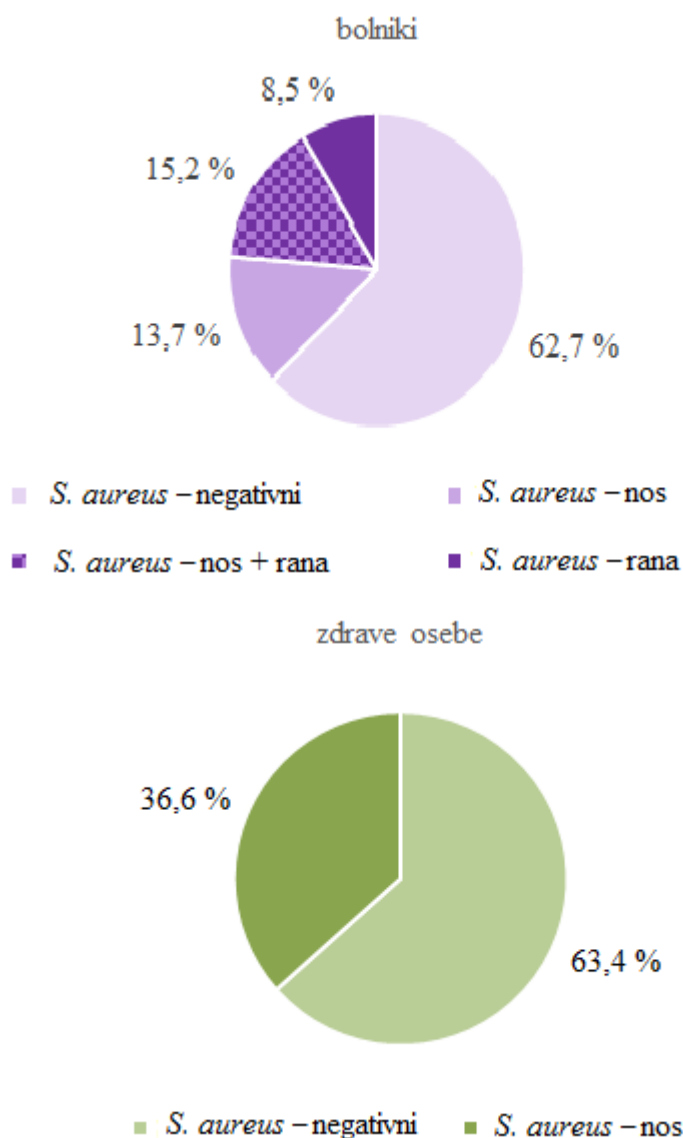
P-vrednost, ki je bila manjša od 5 %, je bila upoštevana kot statistično pomembna. Mejno statistično pomembnost smo definirali, če je bil $p > 0,05$ in $< 0,08$. Analiza je bila opravljena s programom R (R 3.0.3) (R Development Core Team, 2009).

4 REZULTATI

4.1 SPLOŠNI PODATKI O PREISKOVANCIH IN BAKTERIJSKIH IZOLATIH

Skupno smo zbrali 344 izolatov *S. aureus*, 109 SAb, 165 SAk (274 SAb in SAk) in 70 izolatov *S. aureus*, osamljenih iz nosu bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen tudi iz rane (Slika 9). Kot je opisano v poglavju 3.3, smo pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb iz primarne plošče osamili, identificirali, določili občutljivost za antibiotike in v nadaljevanju molekularno opredelili tri do štiri kolonije *S. aureus* z namenom ugotavljanja možne pristranosti, ker smo pri ostalih vzorcih iz primarnih plošč identificirali, določili občutljivost za antibiotike in molekularno opredelili le po eno kolonijo *S. aureus*. Na ta način smo zbrali dodatnih 29 SAk, pri devetih pozitivnih vzorcih smo iz primarnih plošč zbrali po tri, pri enem pa dva dodatna SAk.

Pri 109/461 (23,6 %) bolnikov z OKMT smo dokazali okužbo s *S. aureus*. Pri 133/461 (28,9 %) bolnikov smo dokazali nosilstvo *S. aureus* v nosu. Pri 70/461 (15,2 %) bolnikov smo *S. aureus* osamili in rane in nosu. Pri 289/461 (62,7 %) bolnikov iz nobene od odvzetih kužnin nismo osamili *S. aureus*. Med 109 bolniki z OKMT, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz rane, je bilo 48 (44,1 %) žensk in 61 moških (55,9 %). Njihova povprečna starost je bila 37,5 let (razpon 16–79 let). Pri 165/451 (36,6 %) zdravih oseb smo *S. aureus* osamili iz nosu (zdravi nosilci). Med 165 zdravimi nosilci je bilo število žensk 64 (38,8 %) in moških 101 (61,2 %). Njihova povprečna starost je bila 38,6 let (razpon 15–80 let).



Slika 9: Prikaz deležev (%) *Staphylococcus aureus* pozitivnih in negativnih bolnikov (zgoraj) in zdravih oseb (spodaj).

Figure 9: Share (%) of *Staphylococcus aureus* positive and negative patients (above) and healthy individuals (below).

4.2 OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE

Delež MRSA med SAb je bil 2,8 % (3/109 SAb), medtem ko med SAK ni bilo izolatov MRSA. Razlika je bila statistično pomembna (p-vrednost 0,003).

Med 274 SAb in SAK smo določili dvanajst različnih rezistotipov: občutljiv za vse testirane antibiotike, odporen proti penicilinu (PEN), odporen proti penicilinu in ciprofloksacinu (PEN-CIP), odporen proti penicilinu in klindamicinu (PEN-CLI), odporen proti penicilinu in eritromicinu (PEN-ERY), odporen proti penicilinu, eritromicinu in klindamicinu

(PEN-ERY-CLI), odporen proti penicilinu, eritromicinu in gentamicinu (PEN-ERY-GEN), odporen proti penicilinu in gentamicinu (PEN-GEN), odporen proti penicilinu in cefoksitinu (betalaktamskim antibiotikom) (PEN-FOX), odporen proti betalaktamskim antibiotikom in gentamicinu (PEN-FOX-GEN), odporen proti betalaktamskim antibiotikom, eritromicinu, klindamicinu, ciprofloksacinu in gentamicinu (PEN-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN), odporen proti penicilinu in tetraciklinu (PEN-TET). Med SAB smo določili enajst in med SAK šest različnih rezistotipov (Preglednica 5).

Občutljivost SAB in SAK za antibiotike je prikazana v Preglednici 6. Večina, 271/274 (98,9%) izolatov SAB in SAK, je bila MSSA. Večina MSSA, 74/106 (69,8 %) SAB in 125/165 (75,7 %) SAK, je bila odporna le proti penicilinu, manjšina MSSA, 22/106 (20,7 %) SAB in 29/165 (17,6 %) SAK, je bila občutljiva za vse testirane antibiotike. Vsi izolati MSSA so bili občutljivi za rifampin in trimetoprim sulfametoksazol. Inducibilno odpornost proti klindamicinu smo ugotovili le pri dveh SAK. Poleg odpornosti proti cefoksitinu smo tudi odpornost proti gentamicinu ugotovili le med SAB, medtem ko smo odpornost proti tetraciklinu ugotovili le med SAK. Vsi izolati MRSA so bili občutljivi za vankomicin in teikoplanin.

Preglednica 5: Prikaz vzorcev občutljivosti za in odpornosti proti različnim antibiotikom (rezistotipov) pri izolatih *Staphylococcus aureus*, osamljenih iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.

Table 5: Antimicrobial susceptibility and resistance patterns (resistotypes) of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

rezistotip	SAB (n = 109) št. (%)	SAK (n = 165) št. (%)
občutljiv za vse testirane antibiotike	15 (13,8)	16 (9,7)
odporen:		
PEN	81 (74,3)	138 (83,6)
PEN-CIP	1 (0,9)	1 (0,6)
PEN-CLI	1 (0,9)	0
PEN-ERY	1 (0,9)	2 (1,2)
PEN-ERY-CLI	1 (0,9)	1 (0,6)
PEN-ERY-GEN	2 (1,8)	0
PEN-GEN	4 (3,7)	0
PEN-FOX	1 (0,9)	0
PEN-FOX-GEN	1 (0,9)	0
PEN-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN	1 (0,9)	0
PEN-TET	0	7 (4,2)

PEN, penicilin; FOX, cefoksitin; ERY, eritromicin; CLI, klindamicin; CIP, ciprofloksacin; GEN, gentamicin; TET, tetraciklin; SAB, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAK, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev.

Preglednica 6: Prikaz deleža za antibiotike občutljivih izolatov *Staphylococcus aureus*, osamljenih iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.

Table 6: Percentage of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers sensitive to antibiotics.

	n	PEN	FOX	ERY	CLI	CIP	GEN	RIF	SXT	TET
		% občutljiv								
vsi	274	11,3	98,9	97,1	98,5	99,3	97,1	100	100	97,4
SAb	109	13,8	97,2	95,4	97,2	98,2	92,7	100	100	100
SAk	165	9,7	100	98,2	99,4	99,4	100	100	100	95,7

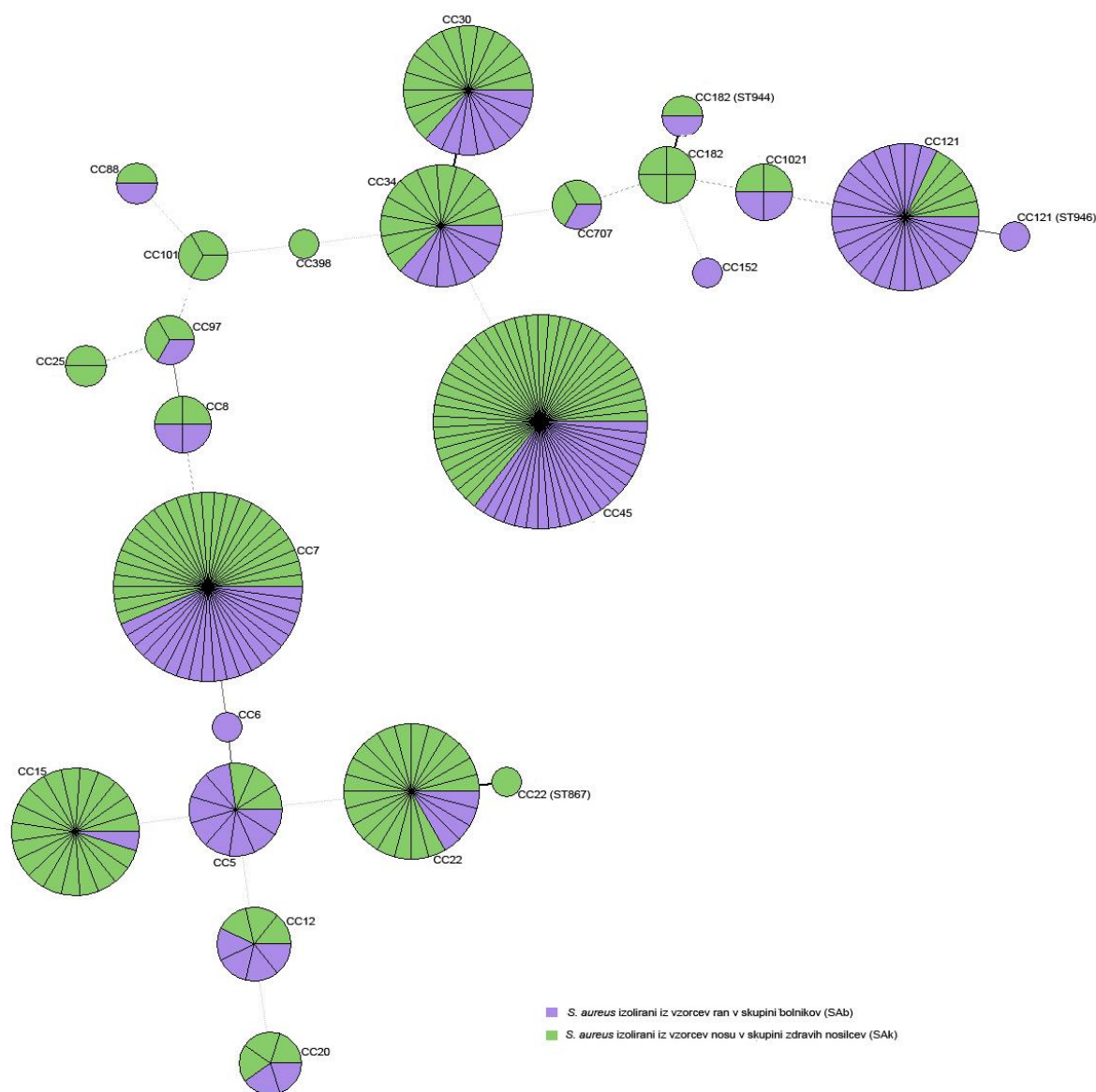
PEN, penicilin; FOX, cefoksitin; ERY, eritromicin; CLI, clindamicin; CIP, ciprofloksacin; GEN, gentamicin; RIF, rifampin; SXT, trimetoprim-sulfametoksazol; TET, tetraciklin; SAb, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAk, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev.

4.3 TIPIZACIJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)

Z MLST smo pri 274 SAb in SAk določili 24 različnih ST tipov, ki smo jih uvrstili v 21 različnih CC (Preglednica 7). Novih ST tipov nismo določili. Poglavitni klon med izolati iz obeh skupin je bil CC45 (59/274 (21,5 %) SAb in SAk), sledila sta CC7 (46/274 (16,8 %) SAb in SAk) in CC121 (29/274 (10,6 %) SAb in SAk) (Preglednica 7, Sliki 10 in 11). Med SAb smo določili 18 različnih CC. Najpogostejši CC med SAb je bil CC121 (24/109 (22,0 %) SAb), sledil je CC45 (21/109 (19,3 %) SAb) in CC7 (20/109 (18,3 %) SAb). Med SAk smo določili 19 različnih CC. Najpogostejši CC med SAk je bil CC45 (38/165 (23,0 %) SAk), sledil je CC7 (26/165 (15,8 %) SAk) in CC22 (21/165 (12,7 %) SAk) (Preglednici 7 in 10, Sliki 10 in 11). Ugotovili smo, da je bil CC121 statistično značilno pogostejši med SAb v primerjavi s SAk (24/109 (22,0 %) SAb proti 5/165 (3,0 %) SAk; 95 % IZ 0,10–0,28; p-vrednost < 0,0001). Nasprotno smo ugotovili, da je bil CC15 statistično značilno redkejši med SAb v primerjavi s SAk (1/109 (0,9 %) SAb proti 20/165 (12,1 %) SAk; 95 % IZ 0,05–0,17; p-vrednost 0,0294). Razlike v prevalenci ostalih CC med SAb in SAk niso bile statistično pomembne (Preglednica 7).

Med 39 SAk, ki smo jih osamili in opredelili iz primarnih plošč desetih zaporednih pozitivnih vzorcev različnih zdravih oseb (tri ali štiri kolonije na vzorec) in smo jih uvrstili v pet različnih CC (CC5, CC7, CC20, CC45 in CC398), smo pri posamezni zdravi osebi vse SAk uvrstili v isti CC (Priloga C).

Med 70 izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen tudi iz rane, smo pri 58/70 (82,9 %) izolatov oba izolata uvrstili v isti CC. Med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen tudi iz rane, smo določili 15 različnih CC, najpogosteje CC121 (19/70 (27,1 %) izolatov), sledil je CC45 (13/70 (18,6 %) izolatov) in nato CC7 (10/70 (14,3 %) izolatov) (Priloga D).



Slika 10: Razporeditev klonalnih kompleksov (CC)/sekvenčnih tipov (ST) med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv (SAb) ter iz nosu zdravih nosilcev (SAc). Vsak krog ponazarja ST, izseki kroga pa število izolatov, uvrščenih v ST. Ob krogih so oznake klonalnih kompleksov, v katere smo uvrstili ST, dolžina povezovalnih črt pa kaže število razlik v alelih med posameznimi izolati. Drevo sorodnosti smo izrisali s programsko opremo BioNumerics 7.1 po metodi minimalnega vpetega drevesa.

Figure 10: Distribution of clonal complexes (CCs)/sequence types (STs) of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients (SAb) and *S. aureus* isolated from healthy nasal carriers (SAc). Each circle corresponds to a ST and the circle segments to the number of isolates of the same ST. Next to the circles the clonal complexes are indicated to which the STs were assigned and the length of connecting lines is proportional to the number of differences in alleles between individual isolates. Cluster analysis was performed with the minimum spanning tree method using BioNumerics 7.1 software.

Preglednica 7: Prevalenca klonalnih kompleksov, sekvenčnih tipov in *spa*-tipov med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.
Table 7: Prevalence of clonal complexes, sequence types and *spa* types among *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

CC št. (%) (n = 274)	ST št. (%) (n = 274)	<i>spa</i> - tip	SAb št. (%) (n = 109)	SAk št. (%) (n = 165)	p- vrednost ⁵
CC45 59 (21,5)	ST45 59 (21,5)		21 (19,3)	38 (23,0)	ns
		t002 ¹	0 (0)	2 (1,2)	ns
		t010	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t015	8 (7,3)	14 (8,5)	ns
		t026	3 (2,8)	2 (1,2)	ns
		t050	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t051	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t065	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t073	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t095	2 (1,8)	0 (0)	ns
		t1078	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t116	1 (0,9)	4 (2,4)	ns
		t12106	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t1231	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t1510	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t1714	0 (0)	2 (1,2)	ns
		t2301	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t331	2 (1,8)	1 (0,6)	ns
		t548 ¹	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t550	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t728	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t779	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t808	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t8289	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC7 46 (16,8)	ST7 46 (16,8)		20 (18,3)	26 (15,8)	ns
		t091 ²	16 (14,7)	22 (13,3)	ns
		t12482	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t1743	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t252	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t289	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t2932	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t7164	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t7287	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t7440	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC121 29 (10,6)	ST121 28 (10,2)		23 (21,1)	5 (3,0)	< 0,001
		t1077	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t1114	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t1211	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t12478	3 (2,8)	0 (0)	ns
		t12480	2 (1,8)	0 (0)	ns
		t12484	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t12488	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t159	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t2375	5 (4,6)	0 (0)	ns
		t4198	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t435	3 (2,8)	0 (0)	ns
		t5618	1 (0,9)	2 (1,2)	ns
		t645	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t757	2 (1,8)	0 (0)	ns
		t9941	1 (0,9)	0 (0)	ns
	ST946 1 (0,4)		1 (0,9)	0 (0)	/
		t693	1 (0,9)	0 (0)	ns

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Prevalenca klonalnih kompleksov, sekvenčnih tipov in *spa*-tipov med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.
Continuing table 7: Prevalence of clonal complexes, sequence types and *spa* types among *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

CC št. (%) (n = 274)	ST št. (%) (n = 274)	<i>spa</i> - tip	SAb št. (%) (n = 109)	SAk št. (%) (n = 165)	p- vrednost ⁵
CC22 25 (9,1)	ST22 24 (8,8)		4 (3,7)	20 (12,1)	ns
		t005	2 (1,8)	14 (8,5)	ns
		t12481	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t12486	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t12489	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t3243	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t3732 ⁴	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t3845	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t449	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t476	0 (0)	1 (0,6)	ns
	ST867 1 (0,4)		0 (0)	1 (0,6)	/
		t005	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC30 22 (8,0)	ST30 22 (8,0)		8 (7,3)	14 (8,5)	ns
		t012	2 (1,8)	3 (1,8)	ns
		t018	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t019	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t021	1 (0,9)	6 (3,6)	ns
		t037	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t084 ³	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t122	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t1382	2 (1,8)	0 (0)	ns
		t363	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t3706	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t3732 ⁴	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC15 21 (7,7)	ST15 21 (7,7)		1 (0,9)	20 (12,1)	0,029
		t083	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t084 ³	1 (0,9)	8 (4,8)	ns
		t085	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t12483	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t1875	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t2413	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t346	0 (0)	3 (1,8)	ns
		t547	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t6636	0 (0)	2 (1,2)	ns
		t760	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC34 19 (6,9)	ST34 19 (6,9)		7 (6,4)	12 (7,3)	ns
		t089	5 (4,6)	6 (3,6)	ns
		t091²	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t12490	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t352	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t365	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t6791	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t6798	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t884	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC5 11 (4,0)	ST5 11 (4,0)		8 (7,3)	3 (1,8)	ns
		t002¹	4 (3,7)	2 (1,2)	ns
		t041	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t045	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t1781	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t548 ¹	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t6396	1 (0,9)	0 (0)	ns

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Prevalenca klonalnih kompleksov, sekvenčnih tipov in *spa*-tipov med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev. Continuing table 7: Prevalence of clonal complexes, sequence types and *spa* types among *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

CC št. (%) (n = 274)	ST št. (%) (n = 274)	<i>spa</i> - tip	SAb št. (%) (n = 109)	SAk št. (%) (n = 165)	p- vrednost ⁵
CC12 7 (2,6)	ST12 7 (2,6)		4 (3,7)	3 (1,8)	ns
		t016	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t156	2 (1,8)	2 (1,2)	ns
		t231	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t909	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC182 6 (2,2)	ST182 4 (1,5)		0 (0)	4 (2,4)	ns
		t12479	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t3954	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t493	0 (0)	2 (1,2)	ns
	ST944 2 (0,7)		1 (0,9)	1 (0,6)	/
		t1406	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t12479	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC20 5 (1,8)	ST20 5 (1,8)		2 (1,8)	3 (1,8)	ns
		t164	0 (0)	2 (1,2)	ns
		t3277	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t731	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC8 4 (1,5)	ST8 4 (1,5)		2 (1,8)	2 (1,2)	ns
		t008	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t024	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t190	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC1021 4 (1,5)	ST1021 4 (1,5)		2 (1,8)	2 (1,2)	ns
		t1194	1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t1938	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t4373	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC97 3 (1,1)	ST97 3 (1,1)		1 (0,9)	2 (1,2)	ns
		t044	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t267	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t359	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC101 3 (1,1)	ST101 3 (1,1)		0 (0)	3 (1,8)	ns
		t056	0 (0)	2 (1,2)	ns
		t1541	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC707 3 (1,1)	ST707 3 (1,1)		1 (0,9)	2 (1,2)	ns
		t2172	1 (0,9)	2 (1,2)	ns
CC25 2 (0,7)	ST26 2 (0,7)		0(0)	2 (1,2)	ns
		t280	0 (0)	1 (0,6)	ns
		t8350	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC88 2 (0,7)	ST88 2 (0,7)		1 (0,9)	1 (0,6)	ns
		t1376	1 (0,9)	0 (0)	ns
		t4045	0 (0)	1 (0,6)	ns
CC6 1 (0,4)	ST6 1 (0,4)		1 (0,9)	0 (0)	ns
		t304	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC152 1 (0,4)	ST152 1 (0,4)		1 (0,9)	0 (0)	ns
		t355	1 (0,9)	0 (0)	ns
CC398 1 (0,4)	ST398 1 (0,4)		0 (0)	1 (0,6)	ns
		t3625	0 (0)	1 (0,6)	ns

¹t002 in t548 smo določili v CC5 in CC45. ²t091 smo določili v CC7 in CC34. ³t084 smo določili v CC15 in CC30. ⁴t3732 smo določili v CC22 in CC30. ⁵p-vrednosti, izračunane s permutacijskim testom.

Podčrtano so označene statistično pomembne p-vrednosti in najpogostejši *spa*-tipi.

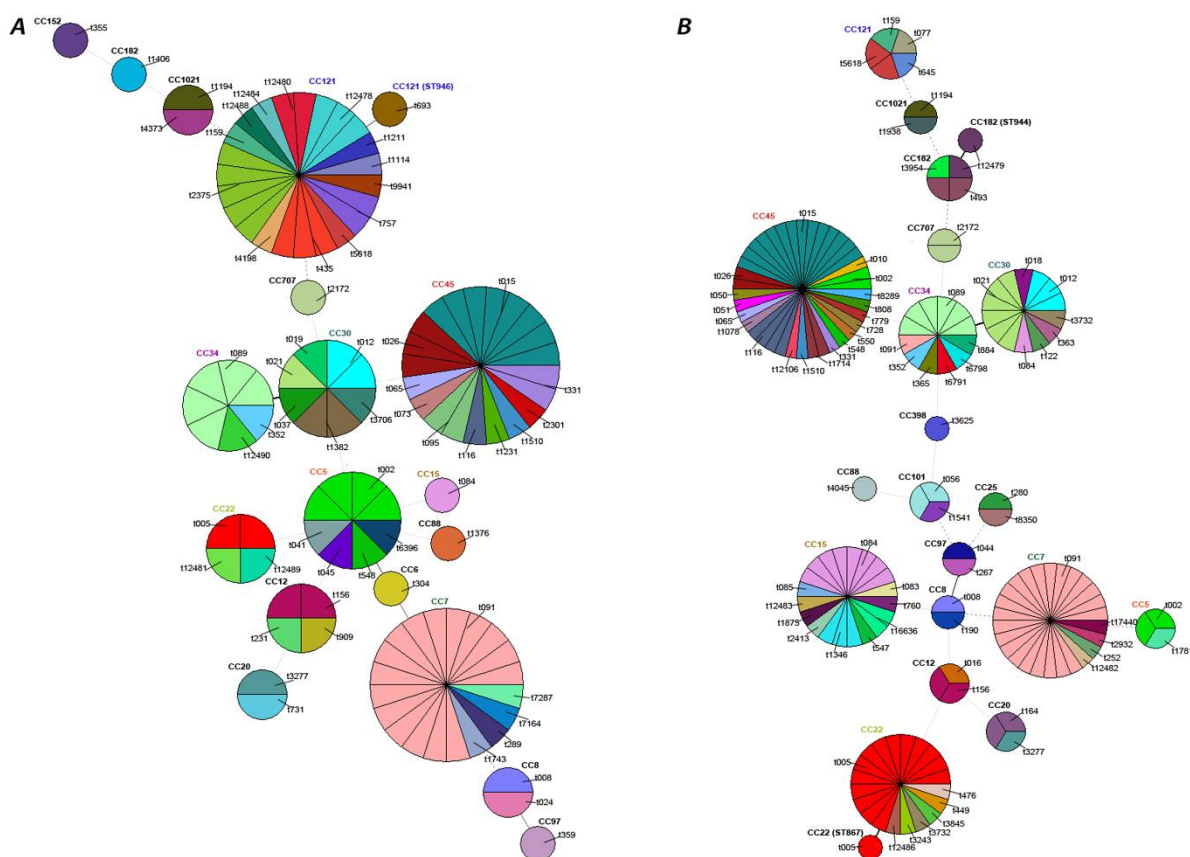
SAb, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAk, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev; CC, klonalni kompleks; ST, sekvenčni tip; ns, neznačilno.

4.4 TIPIZACIJA *spa*

Z metodo tipizacije *spa* smo pri 274 SAb in SAK našli 118 različnih *spa*-tipov, med njimi enajst novih. Med SAb smo določili 62 različnih *spa*-tipov, med njimi sedem novih (t12478, t12480, t12481, t12484, t12488, t12489 in t12490). Med SAK smo našli 73 različnih *spa*-tipov, med njimi štiri nove (t12479, t12482, t12483 in t12486). Najpogostejši *spa*-tip v obeh skupinah izolatov je bil t091 (40/274 (14,6 %) SAb in SAK), sledila sta mu t015 (23/274 (8,4 %) SAb in SAK) in t005 (18/274 (6,6 %) SAb in SAK). Med SAb smo najpogosteje našli *spa*-tip t091 (17/109 (15,6 %) SAb), sledil je t015 (9/109 (8,3 %) SAb) in t002 (5/109 (4,6 %) SAb). Med SAK smo najpogosteje določili *spa*-tip t091 (23/165 (13,9 %) SAK), sledil je t015 (14/165 (8,5 %) SAK) in t005 (15/165 (2,8 %) SAK) (Preglednica 7, Slika 11). Večje razlike v pojavljanju izolatov določenega *spa*-tipa med SAb in SAK smo opazili le pri *spa*-tipu t2375 (5/109 (5,0 %) SAb proti 0/165 (0 %) SAK; 95 % IZ 0,001–0,09; p-vrednost 1,00) in pri *spa*-tipu t005 (2/109 (2,0 %) SAb proti 15/165 (9,0 %) SAK; 95 % IZ 0,01–0,13; p-vrednost 1,00), vendar razlike niso bile statistično pomembne. Le v posameznih primerih so nesorodni izolati, ki so pripadali različnim CC, spadali v isti *spa*-tip (t002, t091, t084, t548 in t3732) (Preglednica 7).

Med 39 SAK, ki smo jih osamili in opredelili iz primarnih plošč desetih zaporednih pozitivnih vzorcev različnih zdravih oseb (tri ali štiri kolonije na vzorec), ki smo jih uvrstili v sedem različnih *spa*-tipov (t002, t015, t091, t164, t1714, t3277 in t3625), smo pri posamezni zdravi osebi vse SAK uvrstili v isti *spa*-tip (Priloga C).

Med 70 izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen tudi iz rane, smo pri 57/70 (81,4 %) izolatov oba izolata uvrstili v isti *spa*-tip. Med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen tudi iz rane, smo določili 51 različnih *spa*-tipov, najpogosteje t091 (9/70 (12,9 %) izolatov), sledila sta t005 in t015 (pri obeh 4/70 (5,7 %) izolatov) (Priloga D).



Slika 11: Primerjava razporeditve klonalnih kompleksov (CC)/sekvenčnih tipov (ST) in *spa*-tipov med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv (A), ter izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (B). Vsak krog ponazarja CC, barve in število izsekov kroga pa *spa*-type, ki smo jih določili znotraj posameznega CC. Dolžina povezovalnih črt kaže število razlik v alelih med posameznimi izolati. Drevo sorodnosti smo izrisali s programsko opremo BioNumerics 7.1 po metodi minimalnega vpetega drevesa.

Figure 11: Comparison of the distribution of clonal complexes (CCs)/sequence types (STs) and *spa* types of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients (A) and *S. aureus* isolated from the nose of healthy carriers (B). Each circle corresponds to a CC, and colours and circle segments to *spa* types which were classified into an individual CC. Cluster analysis was performed with the minimum spanning tree method using BioNumerics 7.1 software.

4.5 TIPIZACIJA *SCCmec*

Med 344 izolati *S. aureus* smo našli le tri izolate MRSA, ki so pripadali različnim CC in posedovali različne tipe *SCCmec* (IVc, V, v tretjem primeru *SCCmec* z metodami, ki smo jih uporabili, nismo mogli določiti (ang. non-typeable, NT)). Natančna opredelitev izolatov MRSA je predstavljena v poglavju 4.6.

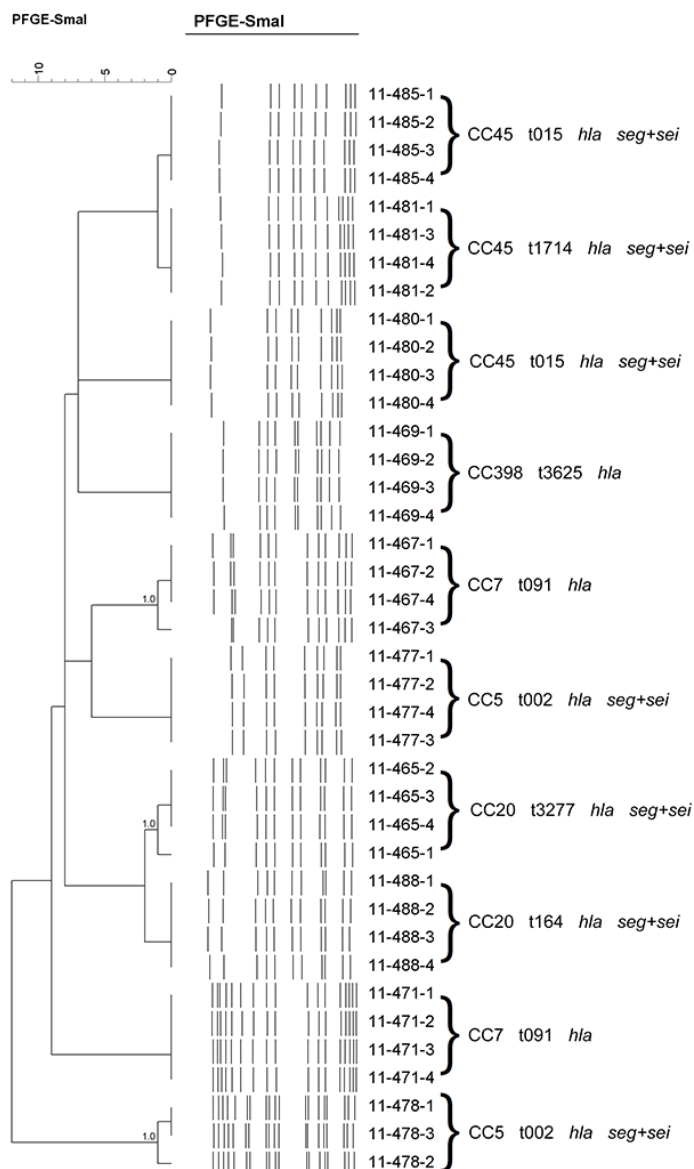
4.6 MOLEKULARNA ANALIZA MRSA

Vse tri izolate MRSA smo osamili iz ran bolnikov, ki niso bili nosilci *S. aureus* v nosu. Pri izolatu ST30-MRSA-SCC*mecIVc*-t019 smo našli *pvl*, *hla* in *seg* ter rezistotip PEN-FOX (Preglednica 10). Na osnovi molekularnih značilnosti, rezistotipa izolata ter podatka, da bolnik v preteklem letu ni bil zdravljen v bolnišnici, operiran ali nastanjen v negovalni ustanovi in predhodno ni bil MRSA-pozitiven ter podatka iz literature, da ST30-IV spada med pomebnejše linije CA MRSA (Skov in Jensen, 2009), smo izolat opredelili kot CA MRSA. Pri izolatu ST152-MRSA-SCC*mecV*-t355 smo našli *pvl* in *hla* in rezistotip PEN-FOX-GEN (Preglednica 10). Na osnovi molekularnih značilnosti izolata bi izolat lahko opredelili kot CA MRSA. Ker je bil bolnik v preteklem letu operiran, pri izolatu pa smo določili proti antibiotikom bolj odporen rezistotip, smo izolat opredelili kot CA MRSA pri bolniku z dejavniki tveganja za ZPO (Rossney in sod., 2007). Tretji izolat MRSA je spadal v ST5, določili smo mu *spa*-tip t041, tipa SCC*mec* pa z metodami, ki smo jih uporabili, nismo mogli določiti. Izključili smo prisotnost *mecC*. Pri izolatu smo našli *seg* in *sei* ter proti antibiotikom večkratno odporen rezistotip (PEN-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN) (Preglednica 10). Na osnovi molekularnih značilnosti, rezistotipa izolata in podatkov iz literature, da ST5 (CC5) spada med poglavitne linije HA MRSA (Lindsay, 2014a), ter dejstva, da je *spa*-tip t041 prevladujoč *spa*-tip med invazivnimi MRSA izolati v Sloveniji (Grundmann in sod., 2010), smo izolat, kljub temu da bolnik v preteklem letu ni imel stika z zdravstveno ali negovalno ustanovo in predhodno ni bil MRSA-pozitiven, opredelili kot HA MRSA.

4.7 ELEKTROFOREZA V PULZIRAJOČEM ELEKTRIČNEM POLJU (PFGE)

Med izolati *S. aureus*, ki smo jih osamili iz vzorcev ran in nosu pri 70 bolnikih z OKMT, smo pri 45/70 (64,3 %) bolnikov izolatom *S. aureus*, osamljenim iz rane in nosu pri istem bolniku, določili isti pulzotip *SmaI*. Pri 44/45 (97,8 %) bolnikov, pri katerih smo *S. aureus* iz rane in nosu določili isti pulzotip *SmaI*, smo izolatom določili tudi isti CC in *spa*-tip. Pri 1/45 (2,2 %) bolnikov, pri katerih smo *S. aureus* iz rane in nosu določili isti pulzotip *SmaI*, smo izolatom določili isti CC in različna *spa*-tipa. Pri 25/70 (35,7 %) bolnikov smo izolatom *S. aureus*, osamljenim iz rane in nosu pri istem bolniku, določili različne pulzotipe *SmaI*. Pri 12/25 (48,0 %) bolnikov, pri katerih smo *S. aureus* iz rane in nosu določili različne pulzotipe *SmaI*, smo izolatom določili tudi različne CC in *spa*-tipe. Pri 13/25 (52,0 %) bolnikov, pri katerih smo *S. aureus* iz rane in nosu določili različne pulzotipe *SmaI*, pa smo izolatom določili isti CC in *spa*-tip. Za enake smo smatrali izolate *S. aureus*, osamljene iz rane in nosu pri 45/70 (64,3 %) bolnikov, ki smo jim določili isti pulzotip *SmaI* (Priloga D).

Med 39 SAK, ki smo jih osamili in opredelili iz primarnih plošč desetih zaporednih pozitivnih vzorcev različnih zdravih oseb (tri ali štiri kolonije na vzorec), smo pri posamezni zdravi osebi vse SAK uvrstili v isti pulzotip *SmaI* (Slika 12).



Slika 12: Drevo sorodnosti in makrorestriksijski vzorci (pulzotipi) po metodi gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*, klonalni kompleksi (CC), *spa*-tipi in toksinski profili 39 izolatov *Staphylococcus aureus*, osamljenih pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb, pri katerih smo iz primarne plošče osamili tri do štiri kolonije *S. aureus* z namenom ugotavljanja možne pristranosti, ker smo pri ostalih vzorcih iz primarnih plošč osamili le po eno kolonijo *S. aureus*. Za analizo in prikaz podatkov smo uporabili programsko opremo BioNumerics 7.1, drevo sorodnosti UPGMA in koeficient podobnosti Dice s toleranco zamika med pasovi 1,375 %. Merilo predstavlja odstotek podobnosti med izolati, posamezne vrednosti so izpisane na razvejiščih.

Figure 12: Cluster analysis and macrorestriction patterns (pulsotypes) using the Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) with *SmaI* enzyme macrorestriction method, clonal complexes (CCs), *spa* types and toxin gene profiles of 39 *Staphylococcus aureus* isolated from ten consecutive positive specimens obtained from different healthy carriers where three to four *S. aureus* colonies were isolated from the primary plate with the aim of identifying potential error as only one *S. aureus* colony was isolated from other samples from primary plates. Data analysis was performed using BioNumerics 7.1 software, UPGMA dendrogram and Dice similarity coefficient with 1.375% band-position tolerance.

4.8 GENI ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE

Prevalenco 12 genov za virulentne dejavnike (*hla*, *pvl* (*lukSF-PV*), *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* ali *selj*) med SAb in SAk prikazuje Preglednica 8. Gene za virulentne dejavnike smo dokazali pri 107/109 (98,2 %) SAb in vseh SAk ter največ sedem (*hla*, *pvl* (*lukSF-PV*), *sea*, *seg*, *seh*, *sei* in *tst*) pri dveh SAb. Oba izolata sta spadala v CC34, določili smo jima *spa*-tip t089. Nobenega od iskanih genov za virulentne dejavnike nismo določili le pri 2/109 (1,8 %) SAb. Prvi je spadal v CC7, določili smo mu *spa*-tip t091, drugi pa v CC101, določili smo mu *spa*-tip t056.

Med 39 SAk, ki smo jih osamili in opredelili iz primarnih plošč desetih zaporednih pozitivnih vzorcev različnih zdravih oseb (tri ali štiri kolonije na vzorec) in smo jim določili dva različna toksinska profila (*hla* ali *hla+seg+sei*), smo pri posamezni zdravi osebi vse SAk uvrstili v isti toksinski profil (Slika 12, Priloga C).

4.8.1 Geni za citolizin Hla

Najpogosteje, pri 107/109 (98,2 %) SAb in 164/165 (99,4 %) SAk, smo dokazali *hla* (Preglednica 8).

4.8.2 Geni za citolizin PVL

Pri skoraj tretjini, 32,5 % izolatov iz obeh skupin, smo dokazali *pvl* (*lukSF-PV*). Pogosteje smo *pvl* (*lukSF-PV*) dokazali pri SAb kot pri SAk, razlika je bila statistično pomembna (34/109 (31,2 %) SAb proti 6/165 (3,6 %) SAk; 95 % IZ 4,8–29,8; p-vrednost < 0,0001) (Preglednica 8).

4.8.3 Superantigeni

Številne gene za superantigene (*tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* ali *selj*) smo določili pri večini izolatov iz obeh skupin. Med 25/109 (22,9 %) SAb in 55/165 (33,3 %) SAk nismo določili genov za superantigene. Gene za katerikoli SE ali SE-1 smo dokazali pri 84/109 (77,0 %) SAb in 110/165 (66,7 %) SAk. Najpogosteje, pri 73/109 (67,0 %) SAb in 98/165 (59,4 %) SAk, smo določili *seg*. Sledil je *sei*, ki smo ga določili pri 67/109 (61,5 %) SAb in 93/165 (56,4 %) SAk. Pri 15/109 (13,8 %) SAb in 31/165 (18,8 %) SAk pa smo določili *tst*. Najredkeje, pri 1/109 (0,9 %) SAb in 1/165 (0,6 %) SAk, smo določili *see*. Statistično pomembne razlike v prevalenci superantigenov med obema skupinama smo ugotovili le pri *sec*, ki smo ga pogosteje določili med SAk (3/109 SAb (1,6 %) proti 28/165 SAk (17,0 %); 95 % IZ 0,04–0,47; p-vrednost 0,0006). Razlike v prevalenci ostalih superantigenov med SAb in SAk niso bile statistično pomembne (Preglednica 8).

Preglednica 8: Prevalenca genov za posamezne toksine med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.

Table 8: Prevalence of genes for individual toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

gen za toksin	SAb (n = 109) št. (%)	SAk (n = 165) št. (%)	RO	95 % IZ	p-vrednost (test χ^2)
<i>hla</i>	107 (98,2)	164 (99,4)	0,3	0,02–3,64	0,71
<i>pvl</i> (<i>lukSF-PV</i>)	34 (31,2)	6 (3,6)	12	4,8–29,8	< 0,0001 ¹
<i>tst</i>	15 (13,8)	31 (18,8)	0,7	0,3–1,3	0,35
gen za enterotoksin (katerikoli)	84 (77,0)	110 (66,7)	1,4	0,8–2,6	0,21
<i>sea</i>	6 (5,5)	12 (7,3)	0,7	0,3–2,0	0,74
<i>seb</i>	3 (2,8)	7 (4,2)	0,6	0,1–2,5	0,75
<i>sec</i>	3 (1,6)	28 (17,0)	0,1	0,04–0,5	0,0006 ¹
<i>sed</i>	2 (1,0)	1 (0,6)	3,0	0,3–34,0	0,72
<i>see</i>	1 (0,9)	1 (0,6)	1,5	0,09–24,5	1,00
<i>seg</i>	73 (67,0)	98 (59,4)	1,3	0,8–2,3	0,25
<i>seh</i>	7 (6,4)	16 (9,7)	0,6	0,25–1,6	0,46
<i>sei</i>	67 (61,5)	93 (56,4)	1,2	0,75–2,0	0,47
<i>selj</i>	2 (1,8)	1 (0,6)	3,0	0,3–34,2	0,72

pvl (*lukSF-PV*), gen za Panton-Valentinov levkocidin; *tst*, gen za toksin toksičnega šoka 1; *hla*, gen za alfa toksin; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, geni za stafilokokne enterotoksine A-G; *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine H-J. SAb, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAk, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev; RO, razmerje obetov; 95 % IZ, 95-odstotni interval zaupanja. ¹Statistično značilnost smo preverili tudi s Fisherjevim eksaktnim testom (*pvl* (*lukSF-PV*) < 0,0001, *sec* 0,0002).

4.8.3.1 Superantigenski vzorci

Pri izolatih iz obeh skupin smo našli različne superantigenske vzorce. Različni superantigenski vzorci so bili značilni tudi za izolate, ki so pripadali istemu CC. Pri izolatih iz obeh skupin smo ugotovili 32 različnih superantigenskih vzorcev, 17 različnih med SAb in 28 različnih med SAk. Superantigenski vzorci so zbrani v Preglednici 9. Med SAb sta bila najpogostejša superantigenska vzorca *seg+sei* (50/109 (45,9 %) SAb) in *seg+seh+sei* (5/109 (4,6 %) SAb). Med SAk je bil ravno tako najpogostejši superantigenski vzorec *seg+sei* (44/165 (26,7 %) SAk), sledil je *sec+seg+sei* (19/165 (11,5 %) SAk).

Preglednica 9: Pregled superantigenov vzorcev, ki smo jih našli med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev.

Table 9: Superantigen patterns found in *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft-tissue infection patients and from healthy nasal carriers.

	vsi	SAb	SAk
superantigeni	<i>sea</i>	<i>sea</i>	<i>sea</i>
vzorci	<i>sea+sec</i>	<i>sea+sec</i>	<i>sea+see+seg+tst</i>
	<i>sea+see</i>	<i>sea+see</i>	<i>sea+seg+seh+sei+tst</i>
	<i>sea+see+seg+tst</i>	<i>sea+seg+seh+sei+tst</i>	<i>sea+seg+sei</i>
	<i>sea+seg+seh+sei+tst</i>	<i>sea+seg+tst</i>	<i>sea+seg+tst</i>
	<i>sea+seg+sei</i>	<i>seb</i>	<i>sea+seh+tst</i>
	<i>sea+seg+tst</i>	<i>seb+seg+tst</i>	<i>seb</i>
	<i>sea+seh+tst</i>	<i>sec</i>	<i>seb+sec</i>
	<i>seb</i>	<i>sec+seg+sei</i>	<i>seb+sec+seg</i>
	<i>seb+sec</i>	<i>sed+seg+selj</i>	<i>seb+seg+sei</i>
	<i>seb+sec+seg</i>	<i>seg</i>	<i>seb+seg+sei+tst</i>
	<i>seb+seg+sei</i>	<i>seg+seh+sei+tst</i>	<i>seb+sei</i>
	<i>seb+seg+sei+tst</i>	<i>seg+sei</i>	<i>sec</i>
	<i>seb+seg+tst</i>	<i>seg+sei+tst</i>	<i>sec+sed+seg+sei</i>
	<i>seb+sei</i>	<i>seg+tst</i>	<i>sec+seg</i>
	<i>sec</i>	<i>sei</i>	<i>sec+seg+sei</i>
	<i>sec+sed+seg+sei</i>	<i>tst</i>	<i>sec+seg+sei+tst</i>
	<i>sec+seg</i>		<i>seg</i>
	<i>sec+seg+sei</i>		<i>seg+seh</i>
	<i>sec+seg+sei+tst</i>		<i>seg+seh+sei</i>
	<i>sed+seg+selj</i>		<i>seg+seh+sei+tst</i>
	<i>seg</i>		<i>seg+sei</i>
	<i>seg+seh</i>		<i>seg+sei+selj</i>
	<i>seg+seh+sei</i>		<i>seg+sei+tst</i>
	<i>seg+seh+sei+tst</i>		<i>seg+tst</i>
	<i>seg+sei</i>		<i>seh+sei+tst</i>
	<i>seg+sei+selj</i>		<i>sei</i>
	<i>seg+sei+tst</i>		<i>tst</i>
	<i>seg+tst</i>		
	<i>seh+sei+tst</i>		
	<i>sei</i>		
	<i>tst</i>		

SAb, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAk, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev; *tst*, gen za toksin toksičnega šoka 1; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, geni za stafilokokne enterotoksine A-G; *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine H-J.

4.9 PREGLED CC

Znotraj posameznih CC smo opazili precejšnje razlike v genetski raznolikosti izolatov. Posamezni CC so opisani v nadaljevanju. Podatki o vseh CC, ki smo jih določili izolatoma *S. aureus*, so zbrani v Preglednici 10.

4.9.1 CC45-ST45

Skoraj petina, 21/109 (19,3 %) SAb in skoraj četrtnina, 38/165 (23,0 %) SAk je spadala v CC45 (Sliki 10 in 11). V CC45 smo ugotovili genetsko zelo raznolike izolate. Znotraj CC45 smo določili največ, 23 različnih *spa*-tipov (t002, t010, t015, t026, t050, t051, t065, t073, t095, t1078, t116, t12106, t1231, t1510, t1714, t2301, t331, t548, t550, t728, t779, t808 in t8289), deset različnih med SAb in 19 različnih med SAk, med katerimi nobeden ni bil nov (Preglednica 10, Slika 11). Poleg CC45 smo t002 določili tudi v CC5. Najpogostejši je bil *spa*-tip t015 (22/59 (37,3 %) SAb in SAk), sledil je t026 (5/59 (8,5 %) SAb in SAk) (Preglednica 7). Izolatom, ki so spadali v CC45, smo določili največ različnih toksinov. Vsem izolatom smo določili superantigene, in sicer skupaj deset različnih superantigenskih vzorcev (*seg+sei*, *seg+sei+selj*, *sec+seg+sei*, *seb+sec*, *seb+sec+seg*, *sec+seg*, *sec+seg+sei+tst*, *sec+sed+seg+sei*, *seg+seh+sei* in *seb+seg+sei+tst*). Pri več kot polovici, 30/59 (50,8 %) SAb in SAk, smo določili superantigenski vzorec *seg+sei*, določili smo ga med vsemi SAb in med 9/38 (23,7 %) SAk. Drugi najpogostejši superantigenski vzorec je bil *sec+seg+sei*. Določili smo ga pri polovici, se pravi, 19/38 (50,0 %) SAk, medtem ko ga med SAb nismo določili. Med superantigeni smo najpogosteje določili *seg* in *sei* (55/59 (93,2 %) SAb in SAk), sledil je *sec* (23/59 (39,0 %) SAb in SAk). Redko, pri 3/59 (5,1 %) SAb in SAk, smo določili *tst*, *pvl* (*lukSF-PV*) pa le pri 1/59 (1,7 %) SAb in SAk. Oba, *tst* in *pvl* (*lukSF-PV*), smo določili le med SAk. Izolatom, ki so spadli v CC45, smo določili štiri različne rezistotipe (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN, PEN-GEN in PEN-ERY-CLI) (Preglednica 10). Vsi izolati so bili dobro občutljivi za testirane antibiotike. Večina, 48/59 (81,4 %) SAb in SAk, je bila odporna le proti penicilinu. Manjšina, 9/59 (15,3 %) SAb in SAk, je bila občutljiva za vse testirane antibiotike (Preglednica 10). Več kot polovica, torej 11/21 (52,4 %) bolnikov, pri katerih smo iz rane osamili *S. aureus*, ki je spadal v CC45, je imela diagnozo okužbe podkožja, ostalih 10/21 (47,6 %) bolnikov je imelo diagnozo primarne piodermije (Preglednica 10). Več kot polovica bolnikov, torej 6/10 (60,0 %) bolnikov z diagnozo primarne piodermije in 6/11 (54,5 %) bolnikov z diagnozo okužbe podkožja, je bila nosilcev istega seva *S. aureus* v nosu.

4.9.2 CC7-ST7

V CC7 je spadalo 20/109 (18,3 %) SAb in 26/165 (15,8 %) SAk (Sliki 10 in 11). V CC7 so bili genetsko manj raznoliki izolati, ki smo jim določili devet različnih *spa*-tipov (t091, t12482, t1743, t252, t289, t2932, t7164, t7287 in t7440), pet različnih med SAb in ravno tako pet različnih med SAk, med njimi pa je bil en nov *spa*-tip (t12482) (Preglednici 7 in 10, Slika 11). Najpogostejši je bil *spa*-tip t091 (38/46 (82,6 %) SAb in SAk), ki smo ga poleg CC7 določili tudi v CC34 (Preglednica 7). Izolatom v CC7 smo redko določili toksine. Le 6/46 (13,0 %) SAb in SAk v CC7 smo določili superantigene. Pri 3/46 (6,5 %) SAb in SAk smo določili *tst*, pri 1/46 (2,2 %) SAb in SAk smo določili *seg*, oba gena le pri SAk. Pri 2/46 (4,3 %) SAb in SAk smo določili *sei*, prisoten je bil le pri SAb. Pri 2/46 (4,3 %) SAb in SAk

smo določili *pvl* (*lukSF-PV*), ki je bil prisoten le pri SAb. Izolatom, ki so spadli v CC7, smo določili pet različnih rezistotipov (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN, PEN-GEN, PEN-ERY in PEN-ERY-GEN) (Preglednica 10). Vsi izolati so bili dobro občutljivi za testirane antibiotike. Večina, 34/46 (73,9 %) SAb in SAK, je bila odporna le proti penicilinu. Manjšina, 7/46 (15,2 %) SAb in SAK, je bila občutljiva za vse testirane antibiotike. Polovica, torej 10/20 bolnikov, pri katerih smo iz rane osamili *S. aureus*, ki je pripadal CC7, je imela diagnozo primarne piodermije, druga polovica pa okužbe podkožja (Preglednica 10). Pri 4/10 (40,0 %) bolnikov z diagnozo primarne piodermije so bili tudi nosilci istega seva *S. aureus* v nosu. Polovica bolnikov, torej 5/10, z diagnozo okužbe podkožja je bila prav tako nosilcev istega seva *S. aureus* v nosu.

4.9.3 CC121-ST121 in CC121-ST946

V CC121 je spadal en izolat, ki smo ga z MLST uvrstili v ST946, in 28 izolatov, ki smo jih z MLST uvrstili v ST121 (Sliki 10 in 11). V CC121-ST121 so bili SAb pogostejši v primerjavi s SAK, razlika je bila statistično pomembna (23/109 (21,1 %) SAb proti 5/165 (3,0 %) SAK; 95 % IZ 0,10–0,28; p-vrednost < 0,0001) (Preglednica 7, Sliki 10 in 11). V CC121-ST121 so spadali genetsko zelo raznoliki izolati (t1077, t1114, t1211, t12478, t12480, t12484, t12488, t159, t2375, t4198, t435, t5618, t645, t757 in t9941), ki smo jim določili 15 različnih *spa*-tipov med SAb in 13 različnih *spa*-tipov med SAK. Nobeden *spa*-tip ni izrazito prevladoval. Štirje *spa*-tipi so bili novi (t12478, t12480, t12484 in t12488) (Preglednica 10, Slika 11). Z izjemo enega izolata smo vsem izolatom, ki so spadali v CC121, določili superantigene, in večini, 24/29 (82,8 %) SAb in SAK, superantigenski vzorec *seg+sei*. Pri 20/29 (69,0 %) SAb in SAK smo določili *pvl* (*lukSF-PV*), vsi so bili SAb. Izolatom, ki so spadali v CC121, smo določili štiri različne rezistotipe (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN, PEN-GEN in PEN-ERY-CLI), se pravi, določili smo jim enake rezistotipe kot izolatom iz CC45 (Preglednica 10). Večina, 28/29 (96,6 %) SAb in SAK, je bila odporna le proti penicilinu. Večina bolnikov, 17/23 (73,9 %), pri katerih smo iz rane osamili *S. aureus*, ki je spadal v CC121, je imela diagnozo okužbe podkožja, ostalih 6/23 (26,1 %) bolnikov pa je imelo diagnozo primarne piodermije (Preglednica 10). Večina bolnikov, 16/23 (69,6 %), pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz rane, je bila nosilcev istega seva *S. aureus* v nosu. Izolat CC121-ST946 je spadal med SAb, določili smo mu *spa*-tip t693 in *seg* (Preglednica 10). Izolat je bil odporen le proti penicilinu, bolnik je imel diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij in je imel iz rane osamljen isti sev *S. aureus* kot iz nosu.

4.9.4 CC22-ST22 in CC22-ST867

V CC22 je spadalo 24 izolatov, ki smo jih z MLST uvrstili v ST22, in en izolat, ki smo ga z MLST uvrstili v ST867 (Sliki 10 in 11). V CC22-ST22 so prevladovali SAK, vendar razlika ni bila statistično pomembna (4/109 (3,7 %) SAb proti 20/165 (12,1 %) SAK; 95 % IZ 0,02–0,16; p-vrednost 0,37) (Preglednica 7). Določili smo 10 različnih *spa*-tipov (t005,

t12481, t12486, t12489, t3243, t3732, t3845, t449 in t476, tri različne med SAB in sedem različnih med SAK, med katerimi so bili trije novi *spa*-tipi (t12481, t12486 in t12489) (Preglednica 10). Najpogostejši je bil *spa*-tip t005 (16/24 (66,7 %) SAB in SAK). Vsem izolatom smo določili superantigene, večini, 20/24 (83,3 %) SAB in SAK, superantigenski vzorec *seg+sei*. Nobenemu od izolatov, ki so spadali v CC22, nismo določili *pvl* (*lukSF-PV*). Vsi izolati so bili dobro občutljivi za testirane antibiotike. Določili smo jim tri različne rezistotipe (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN in PEN-CIP) (Preglednica 10). Večina, 21/24 (87,5 %) SAB in SAK, je bila odporna le proti penicilinu. Večina bolnikov, 3/4 (75,0 %), pri katerih smo iz rane osamili *S. aureus*, ki je spadal v CC22, je imela diagnozo primarne piodermije (Preglednica 10). Pri 2/4 (50,0 %) bolnikov smo *S. aureus* osamili iz rane in nosu, pri obeh sta bila osamljena ista seva. Izolat CC22-ST867 je spadal med SAK, določili smo mu *spa*-tip t005 in *sei*. Izolat je bil odporen le proti penicilinu.

4.9.5 CC15-ST15

V CC15 so spadali pretežno SAK, ki so bili pogostejši v primerjavi z SAB, kar je bila statistično pomembna razlika (1/109 (0,9 %) SAB proti 20/165 (12,1 %) SAK; 95 % IZ 0,05–0,17; p-vrednost < 0,0294) (Sliki 10 in 11). Izolati v CC15 so bili genetsko raznoliki, določili smo 10 različnih *spa*-tipov (t083, t084, t085, t12483, t1875, t2413, t346, t547, t6636 in t760), devet med SAK, med katerimi je bil en nov *spa*-tip (t12483). Najpogostejši je bil *spa*-tip t084 (9/21 (42,9 %) SAB in SAK). Gene za toksine smo pri izolatih, ki so spadali v CC15, redko določili. Superantigene smo določili pri 2/21 (9,5 %) SAB in SAK. Pri 3/21 (14,3 %) SAB in SAK smo določili *pvl* (*lukSF-PV*) (Preglednica 10). Izolatom, ki so spadali v CC15, smo določili dva različna rezistotipa (PEN in PEN-TET) (Preglednica 10). Večina, 15/21 (71,4 %) SAB in SAK, je bila odporna le proti penicilinu. Vsi izolati (razen enega, ki je spadal v CC30) z odpornostjo proti tetraciklinom, ki je zančilna za LA MRSA (McCarthy in sod., 2012), so spadali v CC15. Skoraj tretjina, 6/21 (28,6 %) SAB in SAK, tega klona je bila odporna proti penicilinu in tetraciklinom (Preglednica 10). Edini SAB v CC15 smo osamili iz rane pri bolniku z diagnozo primarne piodermije.

4.9.6 CC30-ST30

V CC30 je spadalo 8/109 (7,3 %) SAB in 14/165 (8,5 %) SAK (Sliki 10 in 11). Med SAB je bil tudi en izolat MRSA, ki je opisan v poglavju 4.6. V CC30 so spadali izolati, ki genetsko niso bili raznoliki; določili smo 11 različnih *spa*-tipov (t012, t018, t019, t021, t037, t084, t122, t1382, t363, t3706 in t3732), šest različnih med SAB in sedem različnih med SAK, med katerimi nobeden ni bil nov. Najpogostejši je bil *spa*-tip t021 (7/22 (31,8 %) SAB in SAK) (Preglednici 7 in 10).

Preglednica 10: Razporeditev klonalnih kompleksov (CC), sekvenčnih tipov (ST), *spa*-tipov (z označenimi novimi *spa*-tipi), tipov *SCCmec*, virulentnih genov (s superantigenskimi vzorci), vzorci občutljivosti za in odpornosti proti antibiotikom (rezistotipi) med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev, in diagnoze bolnikov.

Table 10: Distribution of clonal complexes, sequence types, *spa* types (with marked novel *spa* types), *SCCmec* types, virulence genes (with superantigen patterns), antimicrobial susceptibility and resistance patterns (resistotypes) of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft tissue infection patients and from healthy nasal carriers and patient diagnoses.

CC/ST	SAb/SAK št.	<i>spa</i> -tip št. (SAb/SAK)	Superantigeni št. (SAb/SAK)	<i>pvl</i> (<i>lukSF-PV</i>) št. izolatov (SAb/SAK)	Rezistotip; tip <i>SCCmec</i> (št. SAb/SAK)	Diagnoza (št. bolnikov)
5/5	8/3	t002 (4/2), t041 (1/0), t045 (1/0), t1781 (0/1), t548 (1/0), t6396 (1/0)	<i>seg+sei</i> (4/2), <i>sed+seg+sejf</i> (2/0), <i>seg</i> (1/0), <i>sei</i> (0/1), <i>seg+sei+tsf</i> (1/0)	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (1/1), PEN (5/2), PEN-GEN (1/0), PEN-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN; SCCmec NT (1/0)	primarna piodermija (2), okužba podkožja (5), sekundarna okužba kožnih lezij (1)
6/6	1/0	t304 (1/0)	<i>sea</i> (1/0)	1 (1/0)	PEN (1/0)	primarna piodermija (1)
7/7	20/26	t091 (16/22), t12482 (0/1), t1743 (1/0), t252 (0/1), t289 (1/0), t2932 (0/1), t7164 (1/0), t7287 (1/0), t7440 (0/1)	<i>sei</i> (2/0), <i>tst</i> (0/3), <i>seg</i> (0/1)	2 (2/0)	občutljiv za vse testirane antibiotike (3/4), PEN (13/21), PEN-ERY (1/1), PEN-GEN (1/0), PEN-ERY-GEN (2/0)	primarna piodermija (10), okužba podkožja (10)
8/8	2/2	t008 (1/1), t024 (1/0), t190 (0/1)	nič	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (0/1), PEN (2/1)	primarna piodermija (1), okužba podkožja (1)
12/12	4/3	t016 (0/1), t156 (2/2), t231 (1/0), t909 (1/0)	<i>seb</i> (0/1), <i>sear+sec</i> (1/0), <i>sec</i> (1/1)	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (3/1), PEN (1/2)	primarna piodermija (2), okužba podkožja (2)
15/15	1/20	t083 (0/1), t084 (1/8), t085 (0/1), t12483 (0/1), t1875 (0/1), t2413 (0/1), t346 (0/3), t547 (0/1), t6636 (0/2), t760 (0/1)	<i>sear+see</i> (1/0), <i>sea</i> (0/1)	3 (1/2)	PEN (1/14), PEN-TET (0/6)	primarna piodermija (1)
20/20	2/3	t164 (0/2), t3277 (1/1), t731 (1/0)	<i>seg+sei</i> (1/3), <i>seg</i> (1/0)	0	PEN (2/3)	okužba podkožja (2)
22/22	4/20	t005 (2/14), t12481 (1/0), t12486 (0/1), t12489 (1/0), t3243 (0/1), t3732 (0/1), t3845 (0/1), t449 (0/1), t476 (0/1)	<i>seg+sei</i> (4/16), <i>seg+sei+tsf</i> (0/2), <i>seg</i> (0/1), <i>sec+seg</i> (0/1)	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (1/1), PEN (3/18), PEN-CIP (0/1)	primarna piodermija (3), okužba podkožja (1)
22/867	0/1	t005 (0/1)	<i>sei</i> (0/1)	0	PEN (0/1)	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Razporeditev klonalnih kompleksov (CC), sekvenčnih tipov (ST), *spa*-tipov (z označenimi novimi *spa*-tipi), tipov *SCCmec*, virulentnih genov (s superantigenski vzorci), vzorci občutljivosti za in odpornosti proti antibiotikom (rezistotipi) med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev, in diagnoze bolnikov.

Continuing table 10: Distribution of clonal complexes, sequence types, *spa* types (with marked novel *spa* types), *SCCmec* types, virulence genes (with superantigen patterns), antimicrobial susceptibility and resistance patterns (resistotypes) of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft tissue infection patients and from healthy nasal carriers and patient diagnoses.

CC/ST	SAb/SAK št.	<i>spa</i> -tip št. (SAb/SAK)	Superantigeni št. (SAb/SAK)	<i>pvl</i> (<i>lukSF-PV</i>) št. izolatov (SAb/SAK)	Rezistotip: tip <i>SCCmec</i> (št. SAb/SAK)	Diagnoza (št. bolnikov)
25/26	0/2	t280 (0/1), t8350 (0/1)	seb+seg+sei (0/1), seg+sei (0/1)	0	PEN (0/2)	/
30/30	8/14	t012 (2/3), t018 (0/1), t019 (1/0), t021 (1/6), t037 (1/0), t084 (0/1), t122 (0/1), t1382 (2/0), t363 (0/1), t3706 (1/0), t3732 (0/1)	seg+sei (1/1), seg+sei+tst (3/4), sea+see+seg+tst (0/1), sea+seg+sei+tst (0/4), seg (1/0), sea+seg+tst (1/1), sea+seg+ sei (0/3), seb+seg+tst (1/0), seg+tst (1/0)	3 (3/0)	PEN (6/12), PEN-CLI (1/0), PEN-ERY (0/1), PEN-TET (0/1), PEN-FOX, SCCmec IVc (1/0)	primarna piodermija (1), okužba podkožja (7)
34/34	7/12	t089 (5/6), t091 (0/1), t12490 (1/0), t352 (1/1), t365 (0/1), t6791 (0/1), t6798 (0/1), t884 (0/1)	seg+sei+tst (1/0), seg+sei+seg+tst (5/7), sea+seg+sei+sei+tst (1/1), sea+sei+tst (0/1), sei+sei+tst (0/1), seg+sei+sei (0/1), seg+tst (0/1)	5 (4/1)	občutljiv za vse testirane antibiotike (0/1), PEN (6/11), PEN-GEN (1/0)	okužba podkožja (7)
45/45	21/38	t002 (0/2), t010 (0/1), t015 (8/14), t026 (3/2), t050 (0/1), t051 (0/1), t065 (1/1), t073 (1/0), t095 (2/0), t1078 (0/1), t116 (1/4), t12106 (0/1), t1231 (1/0), t1510 (1/1), t1714 (0/2), t2301 (1/0), t331 (2/1), t548 (0/1), t550 (0/1), t728 (0/1), t779 (0/1), t808 (0/1), t8289 (0/1)	seg+sei (2/19), seg+sei+sei (0/1), sec+seg+sei (0/19), seb+sec (0/1), seb+sec+seg (0/1), sec+seg (0/2), sec+seg+sei+tst (0/2), sec+seg+seg+sei (0/1), seg+sei+sei (0/1), seb+seg+sei+tst (0/1)	1 (0/1)	občutljiv za vse testirane antibiotike (6/3), PEN (14/34), PEN-GEN (1/0), PEN-ERY-CLI (0/1)	okužba podkožja (11), primarna piodermija (10)
88/88	1/1	t1376 (1/0), t4045 (0/1)	nič	1 (1/0)	PEN (0/1), PEN-ERY-CLI (1/0)	primarna piodermija (1)
97/97	1/2	t044 (0/1), t267 (0/1), t359 (1/0)	sei (1/0)	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (0/1), PEN (1/1)	okužba podkožja (1)

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Razporeditev klonalnih kompleksov (CC), sekvenčnih tipov (ST), *spa*-tipov (z označenimi novimi *spa*-tipi), tipov SCC*mec*, virulentnih genov (s superantigenskiimi vzorci), vzorci občutljivosti za in odpornosti proti antibiotikom (rezistotipi) med izolati *Staphylococcus aureus*, osamljenimi iz ran bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv ter iz nosu zdravih nosilcev, in diagnoze bolnikov.

Continuing table 10: Distribution of clonal complexes, sequence types, *spa* types (with marked novel *spa* types), SCC*mec* types, virulence genes (with superantigen patterns), antimicrobial susceptibility and resistance patterns (resistotypes) of *Staphylococcus aureus* isolated from wound samples of skin and soft tissue infection patients and from healthy nasal carriers and patient diagnoses.

CC/ST	SAb/SAK št.	<i>spa</i> -tip št. (SAb/SAK)	Superantigeni št. (SAb/SAK)	<i>pvl</i> (<i>lukSF</i> -PV) št. izolatov (SAb/SAK)	Rezistotip: tip SCC <i>mec</i> (št. SAb/SAK)	Diagnoza (št. bolnikov)
101/101	0/3	t056 (0/2), t1541 (0/1)	seg (0/1)	0	občutljiv za vse testirane antibiotike (0/2), PEN (0/1)	/
121/121	23/5	t1077 (0/1), t1114 (1/0), t1211 (1/0), t12478 (3/0), t12480 (2/0), t12484 (1/0), t12488 (1/0), t159 (1/1), t2375 (5/0), t4198 (1/0), t435 (3/0), t5618 (1/2), t645 (0/1), t757 (2/0), t9941 (1/0)	seg+sei (19/5), seg (1/0), sei (1/0), sect-seg+sei (1/0)	20 (20/0)	PEN (22/5), PEN-CIP (1/0)	primarna piodermija (6), okužba podkožja (17)
121/946	1/0	t693 (1/0)	seg (1/0)	0	PEN (1/0)	sekundarna okužba kožnih lezij (1)
152/152	1/0	t355 (1/0)	nič	1 (0/1)	PEN (0/1)	okužba podkožja (1)
182/182	0/4	t12479 (0/1), t3954 (0/1), t493 (0/2)	seg+seh+sei (0/3), seg+seh (0/1)	0	PEN (0/4)	/
182/944	1/1	t1406 (1/0), t12479 (0/1)	seg+seh+sei (1/0), seg+sei (0/1)	0	PEN (1/1)	okužba podkožja (1)
398/398	0/1	t3625 (0/1)	nič	1 (0/1)	PEN (0/1)	/
707/707	1/2	t2172 (1/2)	tst (1/2)	1 (0/1)	PEN (1/2)	primarna piodermija (1)
1021/1021	2/2	t1194 (1/1), t1938 (0/1), t4373 (1/0)	seb (2/1), seb+sei (0/1)	1 (1/0)	občutljiv za vse testirane antibiotike (1/1), PEN (1/1)	primarna piodermija (1), okužba podkožja (1)

SAb, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev ran v skupini bolnikov; SAK, izolati *S. aureus*, osamljeni iz vzorcev nosu v skupini zdravih nosilcev; SCC*mec*, stafilokokni kasetni kromosom *mec*; *tst*, gen za toksin toksičnega šoka-1; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokokne enterotoksine A-G; *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokokne enterotoksine podobne beljakovine H-J; *pvl* (*lukSF*-PV), gen za Panton-Valentinov levkocidin (PVL); NT, netipizirano; legenda rezistotipov: PEN, odporen proti penicilinu; PEN-CIP, odporen proti penicilinu in ciprofloksacinu; PEN-CLI, odporen proti penicilinu in klindamicinu; PEN-ERY, odporen proti penicilinu in eritromicinu; PEN-ERY-CLI, odporen proti penicilinu, eritromicinu in klindamicinu; PEN-ERY-GEN, odporen proti penicilinu, eritromicinu in gentamicinu; PEN-GEN, odporen proti penicilinu in gentamicinu; PEN-FOX, odporen proti betalaktamskim antibiotikom; PEN-FOX-GEN, odporen proti betalaktamskim antibiotikom in gentamicinu; PEN-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN, odporen proti betalaktamskim antibiotikom, eritromicinu, klindamicinu, ciprofloksacinu in gentamicinu; PEN-TET, odporen proti penicilinu in tetraciklinu.

¹Novi *spa*-tipi.

Superantigene smo določili pri vseh izolatih, ki so spadali v CC30. Izolatom smo določili devet različnih superantigenskih vzorcev (*seg+sei*, *seg+sei+tst*, *sea+see+seg+tst*, *sea+seg+sei+tst*, *seg*, *sea+seg+tst*, *sea+seg+sei*, *seb+seg+tst* in *seg+tst*), med katerimi nobeden ni prevladoval. Pri 3/22 (3,6 %) SAb in SAk smo določili *pvl* (*lukSF-PV*), vključno z izolatom MRSA, vsi so bili SAb. Večini, 16/22 (72,7 %) SAb in SAk, smo določili *tst*, enakemu deležu izolatov smo določili *seg* in *sei*, 10/22 (45,5 %) SAb in SAk smo določili *sea*. Izolatom, ki so spadali v CC30, smo določili pet različnih rezistotipov (PEN, PEN-CLI, PEN-ERY, PEN-TET in PEN-OXA-FOX) (Preglednica 10). Večina, 18/22 (81,8 %) SAb in SAk, je bila odporna le proti penicilinu. Večina bolnikov, 7/8 (87,5 %), je imela diagnozo okužbe podkožja (Preglednica 10). Pri 6/8 (75,0 %) bolnikov, pri katerih smo iz rane osamili *S. aureus*, ki je spadal v CC30, smo *S. aureus* osamili iz rane in nosu, in sicer pri vseh isti sev.

4.9.7 CC34-ST34

V CC34 je spadalo 7/109 (6,4 %) SAb in 12/165 (7,2 %) SAk (Sliki 10 in 11). V CC34 so spadali izolati, ki genetsko niso bili raznoliki, določili pa smo osem različnih *spa*-tipov (t089, t091, t12490, t352, t365, t6791, t6798 in t884), in sicer tri različne med SAb in sedem različnih med SAk, med katerimi je bil en nov *spa*-tip (t12490) (Preglednici 7 in 10). Najpogostejši je bil *spa*-tip t089 (11/19 (57,9 %) SAb in SAk). Superantigene smo določili pri vseh izolatih. Določili smo jim sedem različnih superantigenskih vzorcev (*seg+sei+tst*, *seg+seh+sei+tst*, *sea+seg+seh+sei+tst*, *sea+seh+tst*, *seh+sei+tst*, *seg+seh+sei* in *seg+tst*), najpogosteje, pri 12/19 (63,2 %) SAb in SAk, superantigenski vzorec *seg+seh+sei+tst*. Večini, 18/19 (94,7 %) SAb in SAk, smo določili *tst*, sledila sta *seg* in *sei*, ki smo ju določili pri 16/19 (84,2 %) SAb in SAk. Pri 5/19 (26,3 %) SAb in SAk smo določili *pvl* (*lukSF-PV*), večino pri SAb. Izolatom, ki so spadali v CC34, smo določili tri različne rezistotipe (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN in PEN-GEN) (Preglednica 10). Večina, 17/19 (89,5 %) SAb in SAk, je bila odporna le proti penicilinu. Vsi bolniki, pri katerih je bil iz rane osamljen *S. aureus*, ki je spadal v CC34, so imeli diagnozo okužbe podkožja (Preglednica 10). Pri petih bolnikih smo *S. aureus* osamili iz rane in nosu, dva sta bila nosilca istega seva v nosu, pri treh pa smo v nosu določili drug sev *S. aureus* kot v rani.

4.9.8 Ostali CC

4.9.8.1 CC5-ST5

V CC5 je spadalo 8/109 (7,3 %) SAb in 3/165 (1,8 %) SAk (Sliki 10 in 11). Med SAb je bil tudi en izolat MRSA, ki je opisan v poglavju 4.6. V CC5 smo določili šest različnih *spa*-tipov (t002, t041, t045, t1781, t548 in t6396), štiri različne med SAb in dva med SAk, med katerimi nobeden ni bil nov. Najpogostejši je bil *spa*-tip t002 (6/11 (54,5 %) SAb in SAk). Vsem

izolatom iz CC5 smo določili superantigene, in sicer pet različnih superantigenskih vzorcev (*seg+sei*, *sed+seg+selj*, *seg*, *sei* in *seg+sei+tst*), med katerimi je bil najpogostejši *seg+sei* (6/11 (54,5 %) SAb in SAk). Pri nobenem izolatu nismo določili *pvl* (*lukSF-PV*). Izolatom, ki so spadali v CC5, smo določili štiri različne rezistotipe (občutljiv za vse testirane antibiotike, PEN, PEN-GEN, PEN-OXA-FOX-ERY-CLI-CIP-GEN) (Preglednica 10). Največ, 7/11 (63,6 %) SAb in SAk, je bilo odpornih le proti penicilinu. Največ bolnikov, 5/8 (62,5 %), pri katerih je bil iz rane osamljen *S. aureus*, ki je spadal v CC5, je imelo diagnozo okužbe podkožja, 2/8 (25,0 %) bolnikov sta imela diagnozo primarne piodermije in 1/8 (12,5 %) bolnikov diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij.

4.9.8.2 CC8-ST8

V CC8 sta spadala 2/109 (1,8 %) SAb in 2/165 (1,2 %) SAk (Sliki 10 in 11). V CC8 smo določili tri različne *spa*-tipe (t008, t024 in t190), dva med SAb in ravno tako dva med SAk, med katerimi nobeden ni bil nov. Pri nobenem izolatu nismo določili genov za superantigene ali *pvl* (*lukSF-PV*). Izolatom, ki so spadali v CC8, smo določili dva različna rezistotipa (občutljiv za vse testirane antibiotike in PEN) (Preglednica 10). Večina, 3/4 (75,0 %) SAb in SAk, je bila odporna le proti penicilinu. Bolnika, pri katerih je bil iz rane osamljen *S. aureus*, ki je spadal v CC8, sta imela različni diagnozi, in sicer okužba podkožja in primarna piodermija.

4.9.8.3 CC12-ST12

V CC12 je spadalo 4/109 (3,7 %) SAb in 3/165 (1,8 %) SAk (Sliki 10 in 11). Določili smo štiri različne *spa*-tipe (t016, t156, t231 in t909), tri med SAb in dva med SAk, med katerimi nobeden ni bil nov. Najpogostejši je bil *spa*-tip t156 (4/7 (57,1 %) SAb in SAk) (Preglednici 7 in 10). Manj kot polovici, 3/7 (42,9 %) SAb in SAk, smo določili gene za superantigene (*seb*, *sea+sec* in *sec*), nobenemu pa nismo določili *pvl* (*lukSF-PV*). Izolatom, ki so spadali v CC12, smo določili dva različna rezistotipa (občutljiv za vse testirane antibiotike in PEN) (Preglednica 10). Več kot polovica, 4/7 (57,1 %) SAb in SAk, je bila občutljiva za vse testirane antibiotike (Preglednica 10). Od štirih bolnikov, pri katerih je bil iz rane osamljen *S. aureus*, ki je spadal v CC12, sta imela dva diagnozo okužbe podkožja in dva primarne piodermije.

4.9.8.4 CC25-ST26

V CC25 sta spadala dva SAk, ki smo jima določili ST26, različna *spa*-tipa (t280 in t8350) in različna superantigenska vzorca (*seb+seg+sei* in *seg+sei*) (Preglednici 7 in 10, Sliki 10 in 11). Nobenemu od izolatov nismo določili *pvl* (*lukSF-PV*). Oba izolata sta bila odporna le proti penicilinu (Preglednica 10).

4.9.8.5 CC398-ST398

V CC398, v katerega pogosto spadajo izolati LA MRSA (McCarthy in sod., 2012), je spadal en SAK. Določili smo mu *spa*-tip t3625, med virulentnimi dejavniki pa *pvl* (*lukSF-PV*) (Preglednici 7 in 10, Sliki 10 in 11). Izolat je bil odporen le proti penicilinu (Preglednica 10).

4.10 ANALIZA DEMOGRAFSKIH, EPIDEMIOLOŠKIH IN KLINIČNIH PODATKOV O BOLNIKI

Primerjava demografskih, kliničnih in epidemioloških podatkov o bolnikih, zbranih iz vprašalnikov in spremnih listov za mikrobiološke preiskave, je prikazana v Preglednici 11.

4.10.1 Demografski podatki

Ugotovili smo, da je starost bolnikov pomembna za nastanek OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* (RO 0,98; 95 % IZ 0,96–0,99; p-vrednost < 0,0021). Starejši bolniki so imeli z vsakim dodatnim letom starosti za 2 % manjše obete za nastanek OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*. Pri ženskah so bile OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, pogostejše (47/167 (28,1 %) žensk) v primerjavi z moškimi (61/291 (21,0 %) moških), kar je bila mejno statistično pomembna razlika (RO 1,55; 95 % IZ 0,99–2,42; p-vrednost 0,054) (Preglednica 11).

4.10.2 Klinični podatki

Bolniki, ki zaradi preteklih težav antibiotika niso prejeli, so imeli manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* (21/107 (19,6 %) bolnikov), v primerjavi z bolniki, ki so zaradi preteklih težav prejeli antibiotik (24/85 (28,2 %) bolnikov), kar je bilo mejno statistično pomembno (RO 0,53; 95 % IZ 0,27–1,07; p-vrednost 0,079) (Preglednica 11). Bolniki, ki v preteklem letu niso bili operirani, so imeli manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* (77/357 (21,6 %) bolnikov), v primerjavi z bolniki, ki so bili v preteklem letu operirani (32/97 (33,0 %) bolnikov), kar je bilo mejno statistično pomembno (RO 0,60; 95 % IZ 0,37–0,99; p-vrednost 0,0505) (Preglednica 11).

Najpogostejša diagnoza pri bolnikih, vključenih v raziskavo, kot tudi bolnikih z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, je bila okužba podkožja (373/461 (80,9 %) bolnikov, vključenih v raziskavo, in 67/109 (61,5 %) bolnikov z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*), sledila je diagnoza primarne piodermije (68/461 (14,8 %) bolnikov, vključenih v raziskavo, in 40/109 (36,7 %) bolnikov z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*) in diagnoza sekundarne okužbe kožnih lezij (11/461 (2,4 %) bolnikov, vključenih v raziskavo, in 2/109 (1,8 %) bolnikov z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*) (Preglednica 10). Pri devetih bolnikih, ki so bili

vključeni v raziskavo, nismo imeli podatka o klinični diagnozi (9/461 (1,9 %) bolnikov, vključenih v raziskavo) (Preglednica 11).

V skupini bolnikov, ki so imeli diagnozo primarne piodermije, je bil največji delež bolnikov z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus* (40/68 (58,8 %) bolnikov), sledili so bolniki z diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij (2/11 (18,2 %) bolnikov), ki jih je bilo zelo malo (11/461 bolnikov, vključenih v raziskavo). Med bolniki z diagnozo okužbe podkožja je bil najmanjši delež bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* (66/373 (17,7 %) bolnikov). Razlike v pogostosti OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, med bolniki z različnimi diagnozami so bile statistično pomembne (p-vrednost iz testa $\chi^2 < 0,0001$). Skupino bolnikov z diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij in okužbe podkožja smo primerjali s skupino bolnikov z diagnozo primarne piodermije. Ugotovili smo, da imajo bolniki z diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij manj pogosto OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, v primerjavi z bolniki z diagnozo primarne piodermije, kar je bila statistično pomembna razlika (RO 0,17; 95 % IZ 0,03–0,84; p-vrednost 0,019). Ravno tako so imeli bolniki z diagnozo okužbe podkožja manj pogosto OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, v primerjavi z bolniki z diagnozo primarne piodermije, kar je bila statistično pomembna razlika (RO 0,16; 95 % IZ 0,09–0,28; p-vrednost $< 0,0001$) (Preglednica 11).

Največji delež bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, je zaradi težav po kirurškem posegu prejelo betalaktamski antibiotik (22/67 (32,8 % bolnikov), sledili so bolniki, ki so prejeli klindamicin ali klindamicin v kombinaciji s ciprofloksacinom (4/14 (28,6 %) bolnikov), in bolniki, ki niso prejeli antibiotika (82/376 (21,8 %) bolnikov). Pri nobenem od bolnikov, ki so po kirurškem posegu prejeli makrolidni antibiotik, nismo dokazali OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*. Razlike v pogostosti OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, med bolniki, ki so prejeli različne antibiotike, in tistimi, ki antibiotika niso prejeli, niso bile statistično pomembne (p-vrednost iz Fisherjevega eksaktnega testa 0,202). Bolnike, ki so prejeli klindamicin ali klindamicin v kombinaciji s ciprofloksacinom, bolnike, ki so prejeli makrolidni antibiotik, in bolnike, ki antibiotika niso prejeli, smo primerjali z bolniki, ki so prejeli betalaktamski antibiotik. Statistično pomembnih razlik v pogostosti OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, nismo ugotovili med skupino bolnikov, ki so prejeli klindamicin ali klindamicin v kombinaciji s ciprofloksacinom, in skupino bolnikov, ki so prejeli betalaktamski antibiotik (RO 0,88; 95 % IZ 0,24–2,87; p-vrednost 0,83). Statistično pomembnih razlik v pogostosti OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, prav tako nismo ugotovili med skupino bolnikov, ki so prejeli makrolidni antibiotik, in skupino bolnikov, ki so prejeli betalaktamski antibiotik (RO 0,52; 95 % IZ 0,0037–6,89; p-vrednost 0,66), toda bolnikov, ki so prejeli makrolidni antibiotik, je bilo zelo malo (2/461 bolnikov, vključenih v raziskavo), kar je najverjetneje razlog, da razlika ni bila statistično pomembna. Statistično pomembno manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, v primerjavi z bolniki, ki so prejeli betalaktamski antibiotik, je bilo pri bolnikih, ki antibiotika niso prejeli (RO 0,54; 95 % IZ 0,31–0,97; p-vrednost 0,040) (Preglednica 11).

Preglednica 11: Primerjava demografskih, kliničnih in epidemioloških podatkov o bolnikih, zbranih iz vprašalnikov in spremnih listov za mikrobiološke preiskave. Bolnike smo primerjali na osnovi okužbe kože in mehkih tkiv (OKMT), ki jo je povzročil *S. aureus*. Za bolnike z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz rane ali iz rane in nosu (109/461 bolnikov, vključenih v raziskavo). Za bolnike brez OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane, bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane in nosu, ter bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen samo iz nosu. V preglednici prikazani rezultati razmerij obojetov in 95-odstotnih intervalov zaupanja so prilagojeni glede na starost, prav tako pa poročamo o rezultatih analize, kjer vpliv starosti ni bil upoštevan (v oklepaju).

Table 11: Comparison of demographic, clinical and epidemiological patient data collected from questionnaires and accompanying documents for microbiological testing. Patients were compared on the basis of skin and soft-tissue infection (SSTI) caused by *S. aureus*. As patients with SSTI caused by *S. aureus* we regarded as patients with *S. aureus* isolated from a wound or from a wound and the nose (109/461 patients included in the research). As uninfected patients we considered patients without *S. aureus* isolated from a wound, without *S. aureus* isolated from a wound and the nose, and patients with *S. aureus* isolated only from the nose. The table shows odds ratios and 95% confidence interval results adjusted to age, and also reports analysis results where the impact of age was not taken into account (in brackets).

spremenljivka	bolnik brez <i>S. aureus</i> okužbe št. (%)	bolnik s <i>S. aureus</i> okužbo št. (%)	RO prilagojeno na starost (ni starostne prilagoditve)	95 % IZ prilagojeno na starost (ni starostne prilagoditve)	p-vrednost
demografski podatki					
starost			0,98	0,96–0,99	0,0021
spol					
moški	230/291 (79,0)	61/291 (21,0)	/	/	/
ženski	120/167 (71,9)	47/167 (28,1)	1,55 (1,46)	0,99–2,42 (0,95–2,29)	0,054 ⁴ (0,082 ³)
klinični podatki					
takojšen obisk zdravnika					
≤ 1 teden	199/259 (76,8)	60/259 (23,2)	/	/	/
> 1 teden	146/194 (75,3)	48/194 (24,7)	1,21 (1,09)	0,77–1,89 (0,71–1,68)	0,39 ⁴ (0,69 ³)
predhodne podobne težave					
da	151/197 (76,7)	46/197 (23,3)	/	/	/
ne	189/249 (75,9)	60/249 (24,1)	1,11 (1,04)	0,71–1,74 (0,67–1,62)	0,65 ⁴ (0,86 ³)
kirurški poseg zaradi preteklih težav					
da	103/137 (75,2)	34/137 (24,8)	/	/	/
ne	46/58 (79,3)	12/58 (20,7)	0,67 (0,79)	0,31–1,45 (0,37–1,66)	0,32 ⁴ (0,56 ³)
antibiotik zaradi preteklih težav					
da	61/85 (71,8)	24/85 (28,2)	/	/	/
ne	86/107 (80,4)	21/107 (19,6)	0,53 (0,62)	0,27–1,07 (0,32–1,21)	0,079 ⁴ (0,16 ³)
zdravljenje v bolnišnici v zadnjem letu					
da	40/58 (69,0)	18/58 (31,0)	/	/	/
ne	302/393 (76,8)	91/393 (23,2)	0,72 (0,67)	0,39–1,35 (0,37–1,22)	0,29 ⁴ (0,18 ³)
kirurški poseg v zadnjem letu					
da	65/97 (67,0)	32/97 (33,0)	/	/	/
ne	280/357 (78,4)	77/357 (21,6)	0,60 (0,56)	0,37–0,99 (0,34–0,91)	0,0505 ⁴ (0,021 ³)

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11: Primerjava demografskih, kliničnih in epidemioloških podatkov o bolnikih, zbranih iz vprašalnikov in spremnih listov za mikrobiološke preiskave. Bolnike smo primerjali na osnovi okužbe kože in mehkih tkiv (OKMT), ki jo je povzročil *S. aureus*. Za bolnike z OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen iz rane ali iz rane in nosu (109/461 bolnikov, vključenih v raziskavo). Za bolnike brez OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo smatrali bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane, bolnike, pri katerih *S. aureus* ni bil osamljen iz rane in nosu, ter bolnike, pri katerih je bil *S. aureus* osamljen samo iz nosu. V preglednici prikazani rezultati razmerij obetov in 95-odstotnih intervalov zaupanja so prilagojeni glede na starost, prav tako pa poročamo o rezultatih analize, kjer vpliv starosti ni bil upoštevan (v oklepaju).

Continuing table 11: Comparison of demographic, clinical and epidemiological patient data collected from questionnaires and accompanying documents for microbiological testing. Patients were compared on the basis of skin and soft-tissue infection (SSTI) caused by *S. aureus*. As patients with SSTI caused by *S. aureus* we regarded patients with *S. aureus* isolated from a wound or from a wound and the nose (109/461 patients included in the research). As uninfected patients we considered patients without *S. aureus* isolated from a wound, without *S. aureus* isolated from a wound and the nose, and patients with *S. aureus* isolated only from the nose. The table shows odds ratios and 95% confidence interval results adjusted to age, and also reports analysis results where the impact of age was not taken into account (in brackets).

spremenljivka	bolnik brez <i>S. aureus</i> okužbe št. (%)	bolnik s <i>S. aureus</i> okužbo št. (%)	RO prilagojeno na starost (ni starostne prilagoditve)	95 % IZ prilagojeno na starost (ni starostne prilagoditve)	p-vrednost
diagnoza					< 0,0001 ¹
primarna piodermija	28/68 (41,2)	40/68 (58,8)	/	/	/
sekundarne okužbe kožnih lezij	9/11 (81,8)	2/11 (18,2)	0,17 (0,16)	0,03–0,84 (0,03–0,77)	0,019 ⁴ (0,013 ³)
okužbe podkožja	307/373 (82,3)	66/373 (17,7)	0,16 (0,15)	0,09–0,28 (0,087–0,26)	< 0,0001 ⁴ (< 0,0001 ³)
antibiotik po kirurškem posegu zaradi trenutnih težav					0,202 ²
beta laktam	45/67 (67,1)	22/67 (32,8)	/	/	/
klindamicin/ klindamicin in ciprofloksacin	10/14 (71,4)	4/14 (28,6)	0,88 (0,87)	0,24–2,87 (0,23–2,79)	0,83 ⁴ (0,81 ³)
makrolid	2/2 (100)	0/2 (0)	0,52 (0,40)	0,0037–6,89 (0,003–5,25)	0,66 ⁴ (0,53 ³)
brez antibiotika	294/376 (78,2)	82/376 (21,8)	0,54 (0,57)	0,31–0,97 (0,33–1,005)	0,040 ⁴ (0,052 ³)
epidemiološki podatki					
število oseb v gospodinjstvu					
≥ 5 članov	46/71 (64,8)	25/71 (35,2)	/	/	/
< 5 članov	291/368 (79,1)	77/368 (20,9)	0,52 (0,48)	0,29–0,91 (0,28–0,84)	0,0224 ⁴ (0,0109 ³)
zaposlitev					
zaposlen	201/269 (74,7)	68/269 (25,3)	/	/	/
nezaposlen	145/184 (78,8)	39/184 (21,2)	0,94 (0,79)	0,59–1,50 (0,51–1,24)	0,84 ⁴ (0,32 ³)
športnik					
da	82/107 (76,6)	25/107 (23,4)	/	/	/
ne	261/343 (76,1)	82/343 (23,9)	1,33 (1,03)	0,78–2,28 (0,62–1,72)	0,31 ⁴ (0,94 ³)

RO, razmerje obetov; IZ, interval zaupanja. ¹podatki iz testa χ^2 . ²podatki iz Fisherjevega eksaktnega testa.

³p-vrednost iz logistične regresije, kjer ni upoštevan vpliv starosti. ⁴p-vrednost iz logistične regresije, kjer je upoštevan vpliv starosti.

Pogostost OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, med bolniki, ki so po več kot tednu dni po pričetku težav obiskali zdravnika, in bolniki, ki so zdravnika obiskali v tednu dni po pričetku težav, ni bila statistično pomembno različna (RO 1,21; 95 % IZ 0,77–1,89; p-vrednost 0,39). Delež OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, je bil skoraj enak pri bolnikih, ki so obiskali zdravnika v tednu dni po pričetku težav (60/259 (23,2 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 199/259 (76,8 %) bolnikov brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*) kot pri bolnikih, ki so zdravnika obiskali po več kot tednu dni po pričetku težav (48/194 (24,7 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 146/194 (75,3 %) brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*) (Preglednica 11).

Prav tako pogostost OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, ni bila statistično pomembno različna med bolniki, ki v preteklosti niso imeli podobnih težav, in bolniki, ki so v preteklosti že imeli podobne težave (RO 1,11; 95 % IZ 0,71–1,74; p-vrednost 0,65). Delež OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, je bil skoraj enak pri bolnikih, ki so v preteklosti že imeli podobne težave (46/197 (23,3 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 151/197 (76,7 %) bolnikov brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*) in pri bolnikih, ki v preteklosti podobnih težav niso imeli (60/249 (24,1 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 189/249 (75,9 %) bolnikov brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*) (Preglednica 11). Razlike v pogostosti OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, smo ugotovili tudi pri naslednjih spremenljivkah: kirurško zdravljenje ob preteklih podobnih težavah in bolnišnično zdravljenje v preteklem letu, vendar razlike niso bile statistično pomembne (Preglednica 11).

4.10.3 Epidemiološki podatki

Ugotovili smo, da so imeli bolniki, ki so živeli v gospodinjstvu z manj kot petimi osebami, manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* (77/368 (20,9 %) bolnikov), v primerjavi bolniki, ki so živeli v gospodinjstvu s petimi ali več osebami (25/71 (35,2 %) bolnikov). Razlika je bila statistično pomembna (RO 0,52; 95 % IZ 0,29–0,91; p-vrednost 0,0224) (Preglednica 11).

Pogostost OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, med bolniki športniki in bolniki, ki se niso ukvarjali s športom, ni bila statistično pomembno različna (RO 1,33; 95 % IZ 0,78–2,28; p-vrednost 0,31). Delež OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, je bil skoraj enak pri bolnikih, ki so se ukvarjali s športom (25/107 (23,4 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 82/107 (76,6 %) bolnikov brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*) in bolnikih, ki se niso ukvarjali s športom (82/343 (23,9 %) bolnikov z OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, in 261/343 (76,1 %) bolnikov brez OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*). Pri ostalih spremenljivkah nismo opazili statistično pomembnih razlik (Preglednica 11).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilji doktorskega dela so bili ugotoviti prevalenco CA MRSA pri OKMT v Sloveniji, določiti občutljivost za antibiotike, molekularno opredeliti SAb in SAk ter ugotoviti sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz rane in nosu pri istem bolniku z OKMT. Analizirali in primerjali smo tudi demografske, epidemiološke in klinične podatke o bolnikih.

5.1 DELEŽ OKUŽB s *S. aureus*

Zelo pomembna ugotovitev tega doktorskega dela je, da je MRSA redek (2,8 %), CA MRSA pa še redkejši (0,9 %) povzročitelj OKMT v OSR ter da med zdravimi nosilci nismo našli izolatov MRSA (Švent-Kučina in sod., 2016). Tako smo potrdili prvo hipotezo, da med SAk in SAb prevladujejo MSSA. Naši rezultati o nizki prevalenci MRSA pri OKMT se dobro ujemajo z rezultati raziskovalcev iz Poljske (1,3 %), Nemčije (3,0 %), Velike Britanije (1,8 %) in Irske (5,0 %) (Monecke in sod., 2007; Denton in sod., 2008; Masiuk in sod., 2010). O nizki prevalenci poročajo tudi raziskovalci s Kitajske (4,0 %) (Wu in sod., 2010). Raziskovalci iz Francije poročajo o 5,9-odstotni in raziskovalci s Portugalske o 7,9-odstotni prevalenci MRSA pri OKMT. Nekaterе države poročajo o več kot 25-odstotni (Rusija (48 %), Indija (26,3 %), ZDA (35 %)), ter celo o 54-odstotni prevalenci MRSA pri OKMT (Romunija) (Denton in sod., 2008; Baranovich in sod., 2010; Conceição in sod., 2011; Emilda in sod., 2014; Monecke in sod., 2014; Pardos de la Gandara in sod., 2015). Za Evropo je, z izjemo Grčije in Romunije, pri OKMT značilna nižja prevalenca MRSA kot v ZDA (Dryden in sod., 2015). Delež invazivnih okužb z MRSA v Sloveniji je po podatkih EARS-Net (ang. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) nekoliko višji. Tako je v letu 2011 delež MRSA iz hemokultur znašal 7,1 %, v letu 2012 se je povečal na 10,3 %, v letu 2013 je padel na 9,0 %, v letu 2014 pa se je ponovno povečal na 13,1 % (ECDC, 2016).

V naši raziskavi, ki je zajela bolnike iz pretežno urbane OSR, nismo našli izolatov LA MRSA, kar se ujema z rezultati retrospektivne raziskave Dermote in sod. (2015), v kateri so opredelili invazivne izolate CA MRSA in dokazali prisotnost LA MRSA predvsem pri asimptomatskih nosilcih v ruralnih področjih vzhodne Slovenije.

Pri 23,6 % bolnikov z OKMT smo dokazali okužbo s *S. aureus*, kar se ujema z rezultati retrospektivne raziskave, v kateri smo analizirali najpogostejše prve in ponovne bakterijske izolate iz pozitivnih vzorcev ran, kože in mehkih tkiv, poslanih na IMI v letu 2006, med katerimi so bili najpogostejši *S. aureus* (20,1 %), sledili pa sto KNS (17,9 %) in *Pseudomonas aeruginosa* (9,3 %). Delež MRSA od *S. aureus* je bil višji, in sicer 9,3 %, saj so bili v raziskavo vključeni tudi vzorci kroničnih ran (Švent-Kučina in sod., 2007). Kot smo opisali v poglavjih 4.10.2 in 5.4, je vrsta diagnoze vplivala na pogostnost osamitve *S. aureus* iz vzorcev ran. Najpogosteje smo *S. aureus* osamili iz ran pri bolnikih z diagnozo primarne

piodermije (Preglednica 11), medtem ko so pri sekundarnih okužbah kožnih lezij in okužbah podkožja, po podatkih iz literature, pogosti tudi drugi povzročitelji (Swartz in Pastenack, 2005). Med bolniki, vključenimi v raziskavo, je bila okužba podkožja najpogostejša diagnoza (Preglednica 10). V tej skupini so bili pogosti bolniki z abscesi, pri katerih je, po podatkih iz literature, *S. aureus* kot povzročitelj prisoten v približno 25 %, kar se ujema s pogostostjo osamitve *S. aureus* iz vzorcev ran v tem doktorskem delu (23,6 %) in tudi pri tej skupini bolnikov (17,7 %) (Preglednica 11). Med bolniki, vključenimi v raziskavo, je bila druga po pogostosti diagnoza primarne piodermije, kamor uvrščamo furunkle in karbunkle, ki jih najpogosteje povzroča *S. aureus* (Stevens in sod., 2014). Pri tej skupini bolnikov smo tudi v našem doktorskem delu pogosteje, in sicer v 58,8 %, osamili *S. aureus* iz vzorcev ran (Preglednica 11). Podobno so *S. aureus* iz vzorcev ran osamili pri 47,7 % bolnikov z OKMT iz Irske, Velike Britanije in Anglije, pri katerih so sumili na okužbo s *S. aureus* (delež MRSA je bil manjši kot 6 %) in pri 48,8 % bolnikov iz ZDA, pri katerih so ravno tako sumili na okužbo, povzročeno s *S. aureus* (delež MRSA je bil visok, in sicer 61,9 %) (Denton in sod., 2008; Pardos de la Gandara in sod., 2015).

5.2 PRIMERJAVA SAb IN SAk

Pri bakterijskih vrstah, pri katerih je velik del človeške populacije zdravih nosilcev, nas zanima, ali katere od linij bolj pogosto povzročajo okužbe (Turner in Feil, 2007). V tem doktorskem delu smo prvič opredelili genetsko raznolikost *S. aureus*, ki povzročajo OKMT v OSR, in jih primerjali z izolati *S. aureus*, ki kolonizirajo zdrave nosilce (Švent-Kučina in sod., 2016). Med SAb in SAk smo našli zelo heterogene izolate, ki so pripadali 24 različnim ST, 21 različnim CC in 118 različnim *spa*-tipom (Slika 11). CC so bili, razen CC121 in CC15, enakomerno zastopani med SAb in SAk. Izolatom znotraj posameznega CC smo določili različne *spa*-tipe in med njimi različne toksinske profile. Razlike v virulenci smo dokazali le pri *pvl* (*lukSF-PV*) in *sec*, sicer so bili geni za toksine enakomerno ali zelo redko razporejeni med SAb in SAk, večinoma v povezavi s posameznimi kloni. Tako smo ovrgli drugo hipotezo, da so med SAk prisotni genetsko bolj raznoliki izolati, ki pripadajo več različnim CC, kot med SAb. Podobno so Feil in sod. (2003) ugotovili, da so izolati *S. aureus*, osamljeni pri bolnikih z invazivno okužbo, pridobljeno v domačem in bolnišničnem okolju, in izolati zdravih krvodajalcev iz Velike Britanije zelo heterogeni ter da so CC enakomerno razporejeni med izolati bolnikov in nosilcev. Ravno tako so heterogene izolate v obeh skupinah našli Shambat in sod. (2012), ki so klinične izolate *S. aureus*, osamljene iz hemokultur in ran, primerjali z izolati *S. aureus* zdravih nosilcev s podeželja in mest v Indiji, in Lamers in sod. (2011), ki so primerjali skupino različnih kliničnih izolatov *S. aureus* s skupino izolatov, osamljenih pri zdravih nosilcih na Floridi.

5.2.1 Primerjava SAB in SAK na osnovi občutljivosti za antibiotike

Pomembna ugotovitev tega doktorskega dela je, da je bila večina SAB in SAK odpornih le proti penicilinu (72,6 %), manjšina (18,6 %) pa je bila občutljiva za vse testirane antibiotike (Preglednica 6). Kot smo opisali že v poglavjih 4.2, 4.5 in 5.1, smo MRSA osamili redko, le pri treh bolnikih, medtem ko med zdravimi nosilci nismo našli izolatov MRSA, kar je bila statistično pomembna razlika. Prevalenca MRSA med SAB in SAK je bila 1,1 %. Proti klindamicinu, ki ga v Sloveniji priporočamo tudi kot zdravilo izbora pri bolnikih z alergijo na betalaktamske antibiotike (Čižman in Beović, 2013), je bilo odpornih 1,5 % SAB in SAK (Preglednica 6). Na osnovi zgoraj opisanih ugotovitev lahko zaključimo, da so betalaktamski antibiotiki, ki jih v Sloveniji uporabljamo pri izkustvenem zdravljenju OKMT, v veliki večini ustrezna izbira za zdravljenje teh okužb (Čižman in Beović, 2013).

5.2.2 Primerjava SAB in SAK na osnovi MLST

Večina izolatov v tem doktorskem delu je pripadala sedmim CC (CC7, CC15, CC22, CC30, CC34, CC45 in CC121) (Preglednici 7 in 10), ki sodijo med prevladujoče humane stafilokokne linije (Chambers in DeLeo, 2009). Najpogostejši med SAB je bil CC121, večina izolatov tega klona je bila genetsko zelo raznolika in *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivna. Vsi izolati v CC121 so bili občutljivi za meticilin (Preglednici 7 in 10, Sliki 10 in 11). O OKMT, ki jih povzročajo *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivni ali *pvl* (*lukSF-PV*)-negativni MSSA, ki spadajo v CC121, poročajo raziskovalci iz Poljske, Romunije, Nemčije, Rusije, Irske in Velike Britanije, kar potrjuje, da je ta klon razširjen po vsem svetu (Monecke in sod., 2007, 2014; Larsen in sod., 2008; Baranovich in sod., 2010; Masiuk in sod., 2010). V tem doktorskem delu smo *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivne izolate *S. aureus*, ki so spadali v CC121, večinoma osamili pri bolnikih z okužbo podkožja, v raziskavi Masiukove in sod. (2010) so *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivne izolate *S. aureus*, ki so spadali v CC121, osamili iz vzorcev furunklov pri bolnikih na Poljskem, medtem ko so v raziskavi Larsena in sod. (2008) *pvl* (*lukSF-PV*)-negativne izolate *S. aureus* iz CC121 osamili pri bolnikih z impetigom na Irskem in v Veliki Britaniji. CC121 smo v tem doktorskem delu redko določili med SAK. Med SAK in SAB smo ugotovili statistično pomembne razlike v prevalenci dveh CC: pri CC121, ki je bil statistično pomembno pogostejši med SAB, in pri CC15, ki je bil statistično pomembno pogostejši med SAK (Preglednica 7). Masiukova in sod. (2010), ki so na Poljskem primerjali izolate bolnikov s furunkulozo in izolate, osamljene iz nosu zdravih krvodajalcev, so pri slednjih ugotovili veliko heterogenost, medtem ko je več kot polovica izolatov, osamljenih iz furunklov, pripadala CC121, ki je bil, prav tako kot pri nas, zelo redko prisoten med izolati iz nosu. Monecke in sod. (2009) so analizirali izolate *S. aureus*, osamljene pri zdravih nosilcih iz Nemčije, in podobno kot mi ugotovili veliko heterogenost izolatov, ki so pogosto pripadali CC15 (17,8 %) in redko CC121 (4,5 %). Nasprotno Feil in sod. (2003) v Veliki Britaniji niso našli statistično pomembnih razlik v prevalenci CC med izolati *S. aureus*, osamljenimi pri bolnikih z invazivno okužbo, in izolati *S. aureus*,

osamljenimi iz nosu zdravih krvodajalcev, kar smo omenili že zgoraj. Prav tako v zgoraj omenjenih raziskavah Shambata in sod. (2012) iz Indije in Lamersa in sod. (2011) iz ZDA niso našli statistično pomembnih razlik v prevalenci CC med kliničnimi izolati *S. aureus* in izolati *S. aureus* zdravih nosilcev. Med SAK je bil v tem doktorskem delu najpogostejši zelo heterogen klon CC45 (23,0 %), ki mu je sledil genetsko manj raznolik CC7 (15,8 %) (Preglednici 7 in 10, Sliki 10 in 11). Velika heterogenost klona nakazuje, da je v populaciji že dolgo prisoten (Masiuk in sod., 2010). V nizozemski raziskavi Wertheima in sod. (2005b), v kateri so primerjali izolate *S. aureus*, osamljene iz krvi ali gnoja iz primarno sterilnih mest, in izolate *S. aureus*, osamljene iz nosu zdravih nosilcev, so CC45 najpogosteje določili med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (24,7 %), medtem ko so CC45 redko določili med kliničnimi izolati (5,0 %). Visok delež CC45 med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (39,0 %), in še višji delež CC45 med kliničnimi izolati *S. aureus*, osamljenimi pri bolnikih z bakteriemijo (61,0 %), pa so ugotovili v švedski raziskavi Rasmussena in sod. (2013). V nemški raziskavi Holtfreterja in sod. (2007), v kateri so primerjali izolate *S. aureus*, osamljene pri bolnikih z bakteriemijo, in izolate *S. aureus*, osamljene iz nosu zdravih nosilcev, je manjši delež izolatov *S. aureus*, osamljenih iz nosu zdravih nosilcev (10,0 %), in kliničnih izolatov (17,0 %) spadal v CC45. Prav tako je manjši delež izolatov *S. aureus* zdravih nosilcev (9,03 %) spadal v CC45 v zgoraj omenjeni nemški raziskavi Moneckeja in sod. (2009). Podobno majhen delež (6,0 %) izolatov, ki so spadali v CC45, so ugotovili Monecke in sod. (2007), ki so analizirali izolate *S. aureus*, osamljene pri bolnikih z OKMT v Nemčiji. Zanimivo je, da sta bila v tem doktorskem delu CC45 in CC7 drugi in tretji najpogostejši klon med SAb (19,3 % in 18,3 %), saj je vsakemu pripadala skoraj petina SAb. Izolati iz obeh skupin, ki so spadali v CC45 in CC7, se niso bistveno razlikovali; pripadali so istim *spa*-tipom in posedovali so enake gene za virulentne dejavnike (Preglednici 7 in 10). Zaključimo lahko, da so, podobno kot v Nemčiji (Monecke in sod., 2007, 2009), tudi v OSR sevi, ki so prisotni pri zdravih nosilcih, prav tako povzročitelji OKMT. Rasmussen in sod. (2013) ter Holtfreter in sod. (2007) so v zgoraj omenjenih raziskavah ugotovili, da so enaki sevi kot pri invazivnih okužbah v podobnem deležu prisotni tudi pri zdravih nosilcih.

5.2.3 Primerjava SAb in SAK na osnovi tipizacije *spa*

Statistično pomembnih razlik v prevalenci *spa*-tipov med obema skupinama izolatov nismo ugotovili. Najpogostejši *spa*-tip med SAb in SAK je bil t091 (ki ga s pomočjo podatkovne zbirke eBURST (2014) uvrščamo v ST7 (CC7)), sledila sta mu t015 (ki ga s pomočjo podatkovne zbirke eBURST (2014) uvrščamo v ST45 (CC45)) in t005 (ki sodi v ST22, ST23 in ST60, ki jih s pomočjo podatkovne zbirke eBURST (2014) uvrščamo v CC22)) (Preglednici 7 in 10, Slika 11). Podatki o prevalenci *spa*-tipov v Sloveniji in sosednjih državah so pomankljivi (Budimir in sod., 2006; Gonano in sod., 2009; Gagliotti in sod., 2012). Najbolj obširni so podatki iz dveh raziskav Grundmanna in sod. (2010, 2014), v

katerih so ugotavljali prevalenco *spa*-tipov, CC in ST med invazivnimi izolati *S. aureus* iz 25 Evropskih držav. Ugotovili so, da je *spa*-tip t091 najpogostejši med invazivnimi izolati MSSA v Sloveniji ter v sosednji Avstriji, Italiji in na Madžarskem. Najpogostejši med invazivnimi izolati na Hravaškem pa je *spa*-tip t050 (ki ga s pomočjo podatkovne zbirke eBURST (2014) uvrščamo v ST45 (CC45)) (Grundmann in sod., 2010, 2014). Zaključimo lahko, da so najpogostejši CC in *spa*-tipi, med katere spadajo MSSA, ki kolonizirajo zdrave nosilce in povzročajo OKMT v OSR, enaki CC in *spa*-tipom, med katere spadajo MSSA, ki povzročajo invazivne okužbe v Sloveniji in sosednjih državah.

5.2.4 Primerjava SAB in SAK na osnovi genov za virulentne dejavnike

Večina stafilokoknih eksotoksinov se s pomočjo MGE prenaša znotraj posameznega klona, zato so posamezni toksini oziroma njihove kombinacije značilni za specifične stafilokokne linije (npr. *tst*, enterotoksinski genski klaster *egc*), vendar zaradi pogostih prenosov MGE med izolati lahko nastanejo precejšnje razlike v toksinskih vzorcih (Peacock in sod., 2002; Holtfreter in sod., 2007; Grumann in sod., 2014). Med več linij so razporejeni *sea*, *seb* in *pvl* (*lukSF-PV*), ki se nahajajo na fagih. Pri skoraj vseh izolatih je prisoten *hla*, ker se nahaja na konzervativnem delu kromosoma (Yamaguchi in sod., 2002).

Gene za virulentne dejavnike smo najpogosteje določili med izolati, ki so spadali v CC30, CC34, CC45 in CC121, medtem ko večini izolatov, ki so spadali v CC7, nismo določili genov za virulentne dejavnike. Izolatom, ki so spadali v CC30, smo zelo pogosto določili *seg* in *sei* (72,7 %), ki spadata med najpogosteje prisotne gene enterotoksinskega genskega klastra *egc*, *tst* (72,7 %) in *sea* (45,5 %). Izolatom, ki so spadali v CC45, smo pogosto določili *seg* in *sei* (93,2 %) ter *sec* (39,0 %) (Preglednica 10). Pogosto so gene za superantigene enterotoksinskega genskega klastra *egc*, *sea* in *tst* med kliničnimi izolati in izolati *S. aureus* zdravih nosilcev, ki so spadali v CC30, določili tudi v zgoraj omenjeni nemški raziskavi Holtfreterja in sod. (2007). V isti raziskavi so dokazali pogosto prisotnost superantigenov enterotoksinskega genskega klastra *egc* in *sec* tudi med izolati *S. aureus*, ki so spadali v CC45 (Holtfreter in sod., 2007). Prav tako so Peacock in sod. (2002) dokazali pogosto prisotnost superantigenov *tst* in *sea* med kliničnimi izolati in izolati *S. aureus* zdravih nosilcev iz Velike Britanije, ki so spadali v CC30. Med izolati, ki so spadali v CC121, smo pogosto določili *seg* in *sei* (86,2 %) ter *pvl* (*lukSF-PV*) (69,0 %). Podobno so v zgoraj omenjeni raziskavi Masiukove in sod. (2010) vsem izolatom iz furunklov, ki so spadali v CC121, dokazali *pvl* (*lukSF-PV*), pogosto so jim dokazali tudi enterotoksinski genski klaster *egc*. Tudi raziskovalci iz Rusije so poročali o visoki prevalenci *pvl* (*lukSF-PV*) (25,4 %) med kliničnimi izolati, ki so spadali v CC121, o nižji prevalenci *pvl* (*lukSF-PV*) med invazivnimi izolati, ki so spadali v CC121, so poročali iz Romunije (4,8 %) in Nemčije (11,0 %), medtem ko izolatom, osamljenim pri bolnikih z OKMT, ki so spadali v CC121, na Irskem in v Veliki Britaniji niso določili *pvl* (*lukSF-PV*) (Monecke in sod., 2007, 2014; Larsen in sod., 2008; Baranovich in sod., 2010). Na Irskem in v Veliki Britaniji so nekaterim

izolatom, ki so spadali v CC121, določili *eta* in *etb* (Larsen in sod., 2008), ki sta najpogosteje prisotna pri izolatih, ki povzročajo bulozni impetigo (Yamaguchi in sod., 2002). Prisotnost *eta* in *etb* smo pri izolatih želeli preveriti tudi v tem doktorskem delu, vendar nismo uspeli dobiti ustreznih pozitivnih kontrol za izvedbo metode. Podobno kot v tem doktorskem delu so tudi Xie in sod. (2011), ki so določali superantigene pri kliničnih izolatih *S. aureus*, osamljenih iz gnoja, krvi, spodnjih dihal, urina in drugih kliničnih vzorcev bolnikov iz različnih Kitajskih provinc, ugotovili, da izolati *S. aureus*, ki spadajo v CC7, ne posedujejo genov za toksine.

5.2.4.1 *pvl* (*lukSF-PV*)

Z našo raziskavo smo prvič v Slovenskem prostoru dokazali, da je tretjina SAB *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivna (Preglednica 8). Ugotovili smo, da je *pvl* (*lukSF-PV*) statistično pomembno pogosteje prisoten med SAB. Na ta način smo potrdili tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na pogostejšo prisotnost *pvl* (*lukSF-PV*) pri SAB. Visoko prevalenco *pvl* (*lukSF-PV*) (30,0 %) med izolati bolnikov z OKMT v Nemčiji so opisali Monecke in sod. (2007) v zgoraj omenjeni raziskavi. Yu in sod. (2011) so, podobno kot v tem doktorskem delu, poročali o statistično pomembni visoki (23,4 %) prevalenci *pvl* (*lukSF-PV*) med izolati bolnikov z OKMT v primerjavi z nizko (2,5 %) prevalenco *pvl* (*lukSF-PV*) med izolati zdravih nosilcev na Kitajskem. O zelo visoki prevalenci *pvl* (*lukSF-PV*) (85,1 %) in statistično pomembno manjši prevalenci *pvl* (*lukSF-PV*) (0,9 %) med zdravimi nosilci so poročali tudi Masiukova in sod. (2010) v zgoraj omenjeni poljski raziskavi, v katero so vključili izolate, osamljene iz furunklov, ki so večinoma spadali v *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven CC121, in izolate iz nosu zdravih krvodajalcev.

V primeru okužbe s *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivnim sevom se za zdravljenje priporoča uporaba antibiotikov, ki zavirajo nastanek PVL, na primer klindamicina samostojno ali v kombinaciji z betalaktamskimi antibiotiki (Dumitrescu in sod., 2007; PVL sub-group, 2008). Ker *pvl* (*lukSF-PV*) v Sloveniji zaenkrat rutinsko ne določamo, se lahko zgodi, da šele z dodatnimi mikrobiološkimi preiskavami, za katere se odločimo zaradi odpovedi zdravljenja z betalaktamskimi antibiotiki ali težjega poteka okužbe, ugotovimo, da je sev *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven. Pri oblikovanju smernic za predpisovanje protimikrobnih zdravil v Sloveniji bo v bodoče smiselno upoštevati tudi možnost OKMT s *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitivnimi izolati.

5.2.4.2 *hla*

Med izolati *S. aureus* je *hla* zelo pogost, neposredno pa je povezan s hitro napredujočo pljučnico, težjim potekom OKMT, ki jih povzroča CA MRSA, in ponavljajočimi se OKMT, pred katerimi človeka ščiti nastanek protiteles proti *hla* (Berube in Bubeck, 2013; Spaulding in sod., 2013; Grumann in sod., 2014; Sampetro in sod., 2014). V tem doktorskem delu smo

hla določili pri večini izolatov iz obeh skupin in tako ovrgli tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na pogostejšo prisotnost *hla* pri SAb.

5.2.4.3 *sec*

Podobno kot TSST-1, SEG in SEI tudi enterotoksin SEC povezujejo s STŠ in škrlatinko (Jerraud in sod., 2001). Novejše raziskave so pokazale, da ima pomembno vlogo tudi pri infektivnem endokarditisu, sepsi, akutni odpovedi ledvic, okužbah mehkih tkiv, okužbah spodnjih dihal po preboleli virusni okužbi in razvoju nekrozantne pljučnice (Salgado-Pabón in sod., 2013). Zanimivo je, da smo v tem doktorskem delu *sec* statistično pomembno pogosteje določili med SAk (Preglednici 8 in 10). V skladu z zgoraj navedenimi novjšimi podatki, ki *sec* neposredno povezujejo z okužbami mehkih tkiv, bi pričakovali njegovo pogostejšo prisotnost med SAb. Na ta način smo ovrgli tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na enako razporejenost *sec* med SAk in SAb. Nasprotno so Yu in sod. (2011) v zgoraj omenjeni kitajski raziskavi statistično pomembno pogosteje določili *sec* med izolati bolnikov z OKMT v primerjavi z izolati zdravih nosilcev.

5.2.4.4 *sea, seb, sed, see, seh* in *selj*

V tem doktorskem delu smo *sea, seb, sed, see, seh* in *selj* določili pri 10 % (*sea*) ali manj kot 10 % izolatov iz obeh skupin (*seb, sed, see, seh* in *selj*). Prisotnost *see, seh* in *selj* je bila v tesni povezavi s posameznimi CC, medtem ko sta bila *sea* in *seb* razporejena med več različnih CC. Tako smo *sea* najpogosteje določili pri izolatih, ki so spadali v CC30, največkrat pri SAk, redkeje pa smo ga določili pri izolatih, ki so spadali v CC6, CC12, CC15 in CC34. Zelo redko smo pri izolatih določili *seb*. Določili smo ga pri izolatih, ki so spadali v CC12, CC25, CC30 in CC45, večino pri SAk. Pri večini izolatov, ki so spadali v CC34 in CC182, ter pri enem izolatu, ki je spadal v CC45, smo določili *seh*, več kot dve tretjini je bila SAk. Le pri dveh izolatih, ki sta spadala v CC5 in CC45, smo o določili *sed*. Pri treh izolatih, od katerih sta dva spadala v CC5 in eden v CC45, smo določili *selj*. Tudi *see* smo določili redko, le pri dveh izolatih, ki sta spadala v CC15 in CC30 (Preglednica 10). Tako smo ovrgli tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na enako razporejenost *sea, seb, sed, see, seh* in *selj* med SAk in SAb. Podobno so tudi Holtfreter in sod. (2007) v zgoraj omenjeni nemški raziskavi pri izolatih, ki so spadali v CC8, CC30, CC45 in CC395, redko določili *sea*. Tudi kitajski raziskovalci Xie in sod. (2011), ki so določali gene za superantigene pri kliničnih izolatih *S. aureus*, osamljenih iz gnoja, krvi, spodnjih dihal, urina in drugih kliničnih vzorcev, so pri manj kot 10 % izolatov dokazali *seb* in *sed*, pri 13 % izolatov so dokazali *seh, selj* pa pri 15 % izolatov. Pri nobenem od izolatov niso določili *see*, medtem ko so *sea* določili pogosto, in sicer pri 44,4 % izolatov, ki so večinoma spadali v CC239, ki ga v tem doktorskem delu nismo določili (Xie in sod., 2011). Yu in sod. (2011), ki so določali gene za superantigene pri izolatih *S. aureus*, osamljenih pri bolnikih z OKMT na Kitajskem, ravno

tako niso dokazali *see*, medtem ko so zelo pogosto dokazali *sea* (68,5 %) in *seb* (39,3 %), sledili pa so *sed* (28,1 %), *seh* (23,6 %) in *selj* (16,8 %).

5.2.4.5 *tst*

Pri izolatih, ki so spadali v CC30 in CC34, smo najpogosteje določili *tst* (Preglednica 10). V CC30 in CC34 so spadali SAb in SAK v približno enakem deležu (Preglednica 7). Na ta način smo potrdili tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na enako razporejenost *tst* med med SAK in SAb, kar pa velja le za specifične klonove. V predhodnih raziskavah so ugotavljali, da *tst*, kljub temu da ga povezujejo s klinično sliko STŠ, ne spada med poglobitvene virulentne dejavnike *S. aureus*, pač pa lahko velja za epidemiološki označevalec posameznih klonov, kar smo v tem doktorskem delu potrdili (Peacock in sod. 2002; Holtfreter in sod., 2007). Podobno so v zgoraj omenjeni raziskavi Peackoka in sod. (2002), v kateri so primerjali klinične izolate *S. aureus* in izolate zdravih nosilcev, ter v podobni raziskavi Holtfreterja in sod. (2007) opisali pogosto prisotnost *tst* v CC30 in klonih, ki so s CC30 tesno povezani. V tem doktorskem delu je bila prevalenca *tst* pri izolatih *S. aureus* relativno visoka, in sicer nekoliko višja med SAb (18,8 %) v primerjavi z SAK (13,8 %). Podobno so relativno visoko prevalenco *tst* med izolati zdravih nosilcev (14,8 %) dokazali v zgoraj omenjeni nemški raziskavi (Monecke in sod., 2009). Švicarski raziskovalci, ki so primerjali izolate *S. aureus* bolnikov z okužbo, izolate, osamljene pri zastrupitvah s hrano, in izolate *S. aureus* zdravih nosilcev, so dokazali najvišjo prevalenco *tst* med izolati, osamljenimi pri zastrupitvah s hrano (15 %), sledili so izolati zdravih nosilcev (12 %) in nato izolati bolnikov z okužbo (8 %) (Wattinger in sod., 2012). Monecke in sod. (2014) so med izolati zdravih nosilcev v Romuniji dokazali nizko (6 %) prevalenco *tst*, medtem ko med izolati bolnikov z OKMT *tst* niso dokazali. Nasprotno so Yu in sod. (2011) v zgoraj omenjeni kitajski raziskavi, podobno kot mi, dokazali relativno visoko prevalenco *tst* med izolati bolnikov z OKMT (19,8 %) in statistično pomembno nižjo prevalenco med zdravimi nosilci (1,9 %). V drugi kitajski raziskavi so Gu in sod. (2015), ki so analizirali izolate *S. aureus*, osamljene pri bolnikih z OKMT, dokazali 8,3-odstotno prevalenco *tst*.

5.2.4.6 Superantigeni vzorci

Znotraj posameznih CC in tudi znotraj posameznih *spa*-tipov smo določili različne superantigenske vzorce, tako smo v CC45 določili deset, v CC30 devet in v CC34 sedem različnih superantigenov vzorcev (Preglednica 10). Precejšnje razlike v superantigenov vzorcih znotraj posameznih linij *S. aureus* so dokaz za pogoste pridobitve in izgube MGE (Holtfreter in sod., 2007). V tem doktorskem delu smo izolatom najpogosteje določili superantigenov vzorec *seg+sei*. Tako smo potrdili tisti del tretje hipoteze, ki se nanaša na enako razporejenost superantigenov *seg* in *sei* med SAK in SAb. Superantigena *seg* in *sei* sta sestavni del enterotoksinskega genskega klastra *egc*. Znano je, da je enterotoksinski genski

klaster *egc* precej spremenljiv in se pogosto pojavlja med kliničnimi izolati in izolati *S. aureus* zdravih nosilcev (van Belkum in sod., 2007; Sauer in sod., 2008; Sila in sod., 2009; Masiuk in sod., 2010; Grumann in sod., 2014). Najpogosteje so pri izolatih *S. aureus*, ki posedujejo enterotoksinski genski klaster *egc*, prisotni *seg*, *sei*, *selm*, *seln* in *selo* (Jaraud in sod., 2001). Po podatkih iz literature so enterotoksinski genski klaster *egc* pogosto določili pri izolatih *S. aureus* iz CC5, CC22, CC25, CC30 in CC45, medtem ko ga niso opisali med izolati *S. aureus* iz CC1, CC7, CC8, CC12, CC15 in CC395 (van Belkum in sod., 2006; Holtfreter in sod., 2007). V tem doktorskem delu smo *seg+sei* določili večini izolatov iz CC5, CC20, CC22, CC30, CC34, CC45 in CC121, nismo pa ga določili pri nobenem od izolatov, ki so spadali v CC6, CC8, CC12, CC15, CC88, CC152, CC398 in CC707 (Preglednica 10). Tako lahko zaključimo, da superantigeni enterotoksinskega genskega klastra *egc* in *tst* večinoma nimajo pomembne vloge pri nastanku OKMT, pač pa njihova prisotnost pri izolatih *S. aureus*, osamljenih pri bolnikih, odraža stanje med zdravimi nosilci (van Belkum in sod., 2006; Monecke in sod., 2009; Salgado-Pabón in sod., 2014).

Podobno kot Holtfreter in sod. (2007) smo tudi v tem doktorskem delu pri dveh izolatih dokazali redko kombinacijo superantigenov *tst* in *seb* pri enem SAK, ki je spadal v CC45 (*seb+seg+sei+tst*), in enem SAB, ki je spadal v CC30 (*seb+seg+tst*) (Preglednica 10). Oba superantigena se namreč nahajata na različnih, vendar sorodnih, patogenih otokih *S. aureus*, zato si tako kombinacijo največkrat razlagajo z mozaično strukturo MGE, pri kateri se lahko kratki fragmenti MGE prenesejo na drug MGE istega tipa (Holtfreter in sod., 2007).

5.3 UGOTAVLJANJE SORODNOSTI IZOLATOV *S. aureus*, OSAMLJENIH IZ RANE IN NOSU PRI ISTEM BOLNIKU Z OKMT

S. aureus je pri približno tretjini ljudi prisoten v nosu kot del normalne mikrobiote (Chambers in Deleo, 2009), kar smo potrdili tudi v tem doktorskem delu, saj je bilo med zdravimi osebami, vključenimi v raziskavo, 36,6 % nosilcev *S. aureus* v nosu. Invazivne okužbe pri bolnikih najpogosteje povzročijo sevi, ki so predhodno naseljevali njihove sluznice ali kožo (McCarthy and Lindsay, 2013). Med bolniki z OKMT, vključenimi v raziskavo, je bilo 28,9 % nosilcev *S. aureus* v nosu. Pri 64,3 % bolnikov, pri katerih smo *S. aureus* osamili iz rane in nosu, in skoraj polovici bolnikov s ponavljajočimi se OKMT smo ugotovili enak sev v nosu in rani, kar potrjuje, da je nosilstvo v nosu pomemben dejavnik tveganja za nastanek in ponavljajoče se OKMT (Cespedes in sod., 2005; Lindsay in sod., 2006). Na ta način smo potrdili četrto hipotezo, da so izolati *S. aureus*, osamljeni iz brisov ran in nosu pri istem bolniku z OKMT, enaki. Kumar in sod. (2015) so primerjali prevalenco in genetske značilnosti izolatov *S. aureus*, osamljenih iz nosu, žrela in ali kože pri bolnikih v ZDA, ki so bili sprejeti v bolnišnico zaradi OKMT, in bolnikih brez okužb, ki so bili sprejeti v bolnišnico zaradi drugih razlogov. Ugotovili so pogosto kolonizacijo bolnikov z OKMT (76,0 % koloniziranih s *S. aureus*, med njimi 64,0 % z MRSA) in pogosto kolonizacijo bolnikov brez okužbe (65,0 % koloniziranih s *S. aureus*, med njimi 23 % z

MRSA) ter dokazali, da pri obeh skupinah bolnikov nos ni bil najpogostejše mesto kolonizacije. Med bolniki brez okužbe so pogosteje ugotovili kolonizacijo z različnimi sevi *S. aureus* (Kumar in sod., 2015). Na osnovi njihovih ugotovitev zaključujemo, da smo zaradi vzorčenja le enega odvzemnega mesta (nos), zaradi možne kolonizacije žrela ali kože morda zgrešili nosilce *S. aureus* med bolniki in zdravimi nosilci.

5.4 ANALIZA DEMOGRAFSKIH, EPIDEMIOLOŠKIH IN KLINIČNIH PODATKOV O BOLNIKI

Najpogostejša diagnoza pri bolnikih je bila okužba podkožja, med njimi pa so bili najpogostejši bolniki z abscesi, kar se ujema z novjšimi podatki drugih raziskovalcev, da so abscesi med najpogostejšimi kliničnimi manifestacijami OKMT (Kobayashi in sod., 2015).

Ugotovili smo, da je starost bolnikov statistično pomembna, saj so imeli starejši bolniki manjše obete za nastanek OKMT, ki jih je povzročil s *S. aureus*. Dokazali smo, da so bile OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus* mejno statistično pomembno pogostejše pri ženskah. Miller in sod. (2015), ki so v raziskavo, katere namen je bil ugotoviti napovednike za ponavljajoče se OKMT, ki jih je povzročil s *S. aureus* pri bolnikih in njihovih družinskih članih, vključili bolnike z OKMT in njihove družinske člane, jim odvzeli vzorce kože in kožnih lezij ter odvzeli vzorce v njihovem domačem okolju, so dokazali, da med družinskimi člani z OKMT pogosteje zbolijo ženske, medtem ko v skupini bolnikov spol ni vplival na pogostnost okužbe (Miller in sod., 2015).

Dokazali smo tudi vpliv diagnoze na nastanek OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*. V primerjavi z bolniki z diagnozo primarne piodermije smo pri bolnikih z diagnozo sekundarne okužbe kožnih lezij in bolnikih z okužbo podkožja statistično pomembno manjkokrat dokazali OKMT, ki jo je povzročil s *S. aureus*. Razlog je lahko v etiologiji okužb, saj so pri sekundarnih okužbah kožnih lezij in okužbah podkožja lahko prisotni drugi povzročitelji (npr. po Gramu negativne bakterije in anaerobne bakterije), ki pa jih v tem doktorskem delu nismo identificirali (Swartz in Pastenack, 2005). Zdravljenje z antibiotiki pred odvzemom vzorcev je najpogosteje razlog, da povzročitelja iz vzorcev, odvzetih za mikrobiološke preiskave, ne uspemo osamiti (Baron in Thomson, 2011). V tem doktorskem delu smo pridobili podatke o antibiotičnem zdravljenju, ki ga je bolnik prejel pred ali po drenažnem vrezu in odvzemu vzorcev za mikrobiološke preiskave. Statistično pomembno bolj pogosto smo OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, dokazali pri bolnikih, ki so po kirurškem posegu zaradi trenutnih težav prejeli betalaktamski antibiotik, v primerjavi z bolniki, ki antibiotika niso prejeli. Iz navedenega lahko sklepamo, da so bolniki antibiotik prejeli upravičeno. Ugotovili smo, da so imeli bolniki, ki v preteklosti antibiotika zaradi podobnih težav niso prejeli, mejno statistično pomembno manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, kot bolniki, ki so antibiotik prejeli. Vpliv antibiotikov na OKMT so dokazali tudi Miller in sod. (2015)

v zgoraj omenjeni raziskavi. Ugotovili so, da je med dejavniki, povezanimi s ponavljajočimi se okužbami kože, povzročeni s *S. aureus*, antibiotično zdravljenje s cefaleksinom v preteklem letu (Miller in sod., 2015). Bolniki, ki v preteklem letu niso bili operirani, so imeli v tem doktorskem delu mejno statistično pomembno manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, v primerjavi z bolniki, ki so bili v preteklem letu operirani. Ta povezava je logična, saj je znano, da imajo bolniki, ki so bili v stiku z zdravstveno ustanovo, večje tveganje za okužbo, povzročeno s *S. aureus* (Knox in sod., 2015). Nasprotno so Miller in sod. (2015) v prej omenjeni raziskavi ugotovili, da operacija v preteklosti ni bila med dejavniki, povezanimi z okužbo kože pri bolnikih. V tem doktorskem delu nismo dokazali povezave med predhodnim bolnišničnim zdravljenjem, predhodnimi podobnimi težavami, predhodnim kirurškim zdravljenjem zaradi preteklih podobnih težav in OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*.

Domače okolje deluje kot rezervoar in ima zelo pomembno vlogo pri prenosu *S. aureus* med družinskimi člani (Knox in sod., 2015). Ugotovili smo, da so imeli bolniki, ki so živeli v manj številčnem gospodinjstvu, statistično pomembno manj OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*, kot bolniki, ki so živeli v gospodinjstvu z več kot petimi osebami, medtem ko v zgoraj omenjeni raziskavi Millerja in sod. (2015) število oseb v gospodinjstvu ni bilo med dejavniki, povezanimi z OKMT pri bolnikih. Pomembno vlogo pri razvoju in prenosu okužb ima tudi ukvarjanje s specifičnimi športi, za katere so značilni tesen stik, pogoste poškodbe kože in izmenjava športnih pripomočkov (Knox in sod., 2015). V tem doktorskem delu nismo dokazali, da ukvarjanje s športom vpliva na nastanek OKMT, ki jih je povzročil *S. aureus*.

5.5 SKLEPI

- MRSA je redek, CA MRSA pa še redkejši povzročitelj okužb kože in mehkih tkiv v Osrednjeslovenski regiji. Večina izolatov *S. aureus*, ki smo jih osamili iz ran v skupini bolnikov in iz nosu v skupini zdravih nosilcev, je odpornih le proti penicilinu.
- Izolati *S. aureus* iz ran bolnikov in nosu zdravih nosilcev so zelo heterogeni, pripadajo namreč različnim CC, znotraj posameznih CC pa so številni *spa*-tipi. Večina izolatov iz obeh skupin pripada sedmim poglavitnim humanim stafilokoknim linijam, napogostejše CC med izolati *S. aureus* iz ran pa zelo pogosto najdemo med izolati *S. aureus* iz nosu zdravih nosilcev. Statistično pomembne razlike so le v prevalenci dveh CC, in sicer CC121 je statistično pomembno pogostejši med izolati *S. aureus* iz ran in CC15 med izolati *S. aureus* iz nosu zdravih nosilcev.
- Med izolati *S. aureus* iz ran so najpogostejši MSSA, ki posedujejo gen za PVL in spadajo v CC121. Poglavitni klon med izolati *S. aureus* iz nosu zdravih nosilcev je zelo heterogen CC45. Poglavitni *spa*-tip med izolati iz obeh skupin je t091.

- Gen za PVL najdemo pri skoraj tretjini izolatov *S. aureus* iz ran in je v tej skupini izolatov statistično pomembno pogosteje prisoten, medtem ko je gen za stafilokokni enterotoksin C statistično pomembno pogosteje prisoten med izolati iz nosu zdravih nosilcev.
- Pri skoraj tretjini bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv smo dokazali nosilstvo *S. aureus* v nosu. Pri skoraj dveh tretjinah bolnikov z okužbo kože in mehkih tkiv, ki jo je povzročil *S. aureus*, ter pri skoraj polovici bolnikov s ponavljajočimi se okužbami kože in mehkih tkiv, ki so bili nosilci *S. aureus* v nosu, smo v rani in nosu našli enak sev *S. aureus*.
- Najpogostejša klinična manifestacija pri bolnikih z okužbo kože in mehkih tkiv je okužba podkožja. Na nastanek okužb kože in mehkih tkiv, ki jih je povzročil *S. aureus*, pomembno vplivata starost bolnikov in število oseb v gospodinjstvu.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Staphylococcus aureus spada med poglavitne povzročitelje okužb kože in mehkih tkiv (OKMT). V zadnjih dveh desetletjih proti meticilinu odporen *S. aureus* iz domačega okolja (CA MRSA) povzroča epidemije OKMT po vsem svetu in je tudi razlog za povečano število teh okužb. Pri večini nezapletenih OKMT se ne izvaja rutinski odvzem vzorcev za mikrobiološke preiskave za dokaz povzročitelja, zato nimamo natančnih podatkov o prevalenci CA MRSA. Ravno tako skopi so podatki o občutljivosti za antibiotike, virulentnem potencialu in molekularni epidemiologiji izolatov *S. aureus*, ki povzročajo OKMT v Sloveniji. V tem doktorskem delu smo želeli ugotoviti prevalenco CA MRSA pri OKMT v Sloveniji, morebitne razlike med izolati *S. aureus*, osamljenimi iz ran pri bolnikih z OKMT (SAb), in izolati *S. aureus*, osamljenimi iz nosu zdravih nosilcev (SAk), ter sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz ran in nosu pri istem bolniku. V ta namen smo prospektivno odvzeli brise ran in nosu pri 461 bolnikih z OKMT in brise nosu pri 451 zdravih osebah ter tako zbrali 344 izolatov *S. aureus*. Izolatoma smo določili občutljivost za antibiotike, sekvenčne tipe in klonalne komplekse (CC) s pomočjo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST), *spa*-tipe z metodo tipizacije *spa* in toksinski profil, slednjega z ugotavljanjem prisotnosti genov za Panton-Valentinov leukocidin (*pvl* (*lukSF-PV*)), toksin toksičnega šoka 1, stafilokokne enterotoksine od A do G, stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J in toksin alfa. Sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz rane in nosu pri istem bolniku z OKMT, smo ugotavljali z metodo elektroforeze v pulzirajočem električnem polju z makrorestrikcijo z encimom *Sma*I. OKMT, ki jo je povzročil *S. aureus*, smo dokazali pri 23,6 % bolnikov. Ugotovili smo, da je proti meticilinu odporen *S. aureus* (MRSA) redek (2,8 %) povzročitelj OKMT ter da je večina SAb in SAk odpornih le proti penicilinu. Med SAb in SAk smo dokazali zelo heterogene izolate, ki so pripadali številnim CC in še številčnejšim *spa*-tipom, večina SAb in SAk pa je spadala v sedem poglavitnih humanih stafilokoknih linij. CC so bili, z izjemo CC121 in CC15, enakomerno zastopani med SAb in SAk. CC121 smo pogosteje dokazali med SAb (22,0 % SAb proti 3,0 % SAk, p-vrednost < 0,0001), medtem ko smo CC15 pogosteje dokazali med SAk (0,9 % SAb proti 3,0 % SAk, p-vrednost 0,0294). Podobno kot drugod po svetu je tudi pri nas med povzročitelji OKMT najpogostejši *pvl* (*lukSF-PV*)-pozitiven za meticilin občutljiv *S. aureus*, ki spada v CC121. Med SAk je bil najpogostejši zelo heterogen CC45, v katerem smo dokazali največ različnih toksinov. Poglavitni *spa*-tip med SAb in SAk je bil t091. Med SAb smo pogosteje dokazali *pvl* (*lukSF-PV*) (31,2 % SAb proti 3,6 % SAk, p-vrednost < 0,0001), gen za stafilokokni enterotoksin C smo pogosteje dokazali med SAk (1,6 % SAb proti 17,0 % SAk, p-vrednost 0,0006). Slaba tretjina bolnikov je bila tudi nosilcev *S. aureus* v nosu. Pri 64,3 % bolnikov, pri katerih je bil *S. aureus* izoliran iz rane in nosu, smo iz obeh kužnin dokazali enaka seva in s tem potrdili, da je nosilstvo *S. aureus* pomemben dejavnik tveganja za OKMT. Z analizo demografskih, epidemioloških in kliničnih podatkov o bolnikih smo ugotovili, da so bile med OKMT najpogostejše okužbe podkožja ter da na razvoj OKMT, ki jih je povzročil

S. aureus, pomembno vplivajo starost in število družinskih članov v gospodinjstvu. Podatki o nizki prevalenci MRSA in dobri občutljivosti izolatov *S. aureus* pri OKMT ter dejstvo, da smo pri skoraj tretjini SAb določili *pvl (lukSF-PV)*, bodo koristni za oblikovanje smernic za predpisovanje protimikrobnih zdravil v Sloveniji, medtem ko bo molekularna opredelitev izolatov koristna za razumevanje populacijske strukture in širjenja *S. aureus* na nacionalni in mednarodni ravni.

6.1 SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the leading causes of skin and soft-tissue infections (SSTIs). In the last two decades community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) has been causing SSTI epidemics all around the world and is also the reason for higher incidence of such infections. In the majority of uncomplicated SSTIs there is no routine microbiological sampling to determine the cause, and therefore we do not have precise data on CA-MRSA prevalence. Just as scarce is the data on antimicrobial susceptibility, virulence potential and molecular epidemiology of *S. aureus* isolates causing SSTIs in Slovenia. The aim of the doctoral thesis is to determine the prevalence of CA-MRSA in SSTIs in Slovenia, potential differences between *S. aureus* isolates from wound samples of SSTI patients (SA_{pg}) and *S. aureus* isolates from wound and nasal samples of healthy carriers (SA_{cg}), as well as relatedness of *S. aureus* isolates from wound and nasal samples in the same patient. To this end we prospectively took wound and nasal samples from 461 SSTI patients and 451 nasal samples from healthy individuals, collecting 344 *S. aureus* isolates. We determined the antimicrobial susceptibility, sequence types/clonal complexes (CC) by using multilocus sequence typing (MLST), *spa* types with *spa* typing, and the toxin profile, the latter by detecting the presence of genes for Pantone-Valentine leukocidin (*pvl (lukSF-PV)*), toxic shock syndrome toxin-1, staphylococcal enterotoxins A to G, staphylococcal enterotoxins-like proteins H to J and alpha-toxin. Relatedness of *S. aureus* isolates from wound and nasal samples in the same SSTI patient was determined with the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Sma*I enzyme macrorestriction method. SSTIs caused by *S. aureus* were confirmed in 23.6% of patients. We observed that methicillin-resistant *S. aureus* was a rare (2.8%) cause of SSTIs and that the majority of SA_{pg} and SA_{cg} were resistant only to penicillin. Among SA_{pg} and SA_{cg} we found highly heterogeneous isolates belonging to numerous CCs and an even larger number of *spa* types, but nevertheless the majority belonged to seven main human staphylococcal lines. With the exception of CC121 and CC15, CCs were evenly represented among SA_{pg} and SA_{cg}. CC121 was more often determined among SA_{pg} (22.0% SA_{pg} vs. 3.0% SA_{cg}, p-value < 0.0001), whereas CC15 was more often determined among SA_{cg} (0.9% SA_{pg} vs. 3.0% SA_{cg}, p-value 0.0294). Similarly as elsewhere in the world, the most frequent cause of SSTIs in our country is the *pvl (lukSF-PV)*-positive methicillin-susceptible *S. aureus* belonging to CC121. Among SA_{cg} the most common was the very heterogeneous CC45 in which the greatest diversity of

toxins was demonstrated. The main *spa* type among SApg and SAcg was t091. Among SApg *pvl* (*lukSF-PV*) was most frequently identified (31.2% SApg vs. 3.6% SAcg, p-value < 0.0001), and the staphylococcal enterotoxin C gene was more often identified among SAcg (1.6% SApg vs. 17.0% SAcg, p-value 0.0006). Almost a third of patients were also nasal carriers of *S. aureus*. In 64.3% patients with *S. aureus* isolated from wound and nasal samples we identified related strains in both samples and thus confirmed that the *S. aureus* carrier state is an important risk factor for SSTIs. The analysis of demographic, epidemiological and clinical data on patients has shown that subcutaneous tissue infections were most common among SSTIs, and that the development of SSTIs caused by *S. aureus* is significantly affected by age and number of household members. Data on low prevalence of MRSA and good susceptibility of *S. aureus* isolates in SSTIs, and the fact that we identified *pvl* (*lukSF-PV*) in almost one third of SApg will be useful for developing antimicrobial drug prescription guidelines in Slovenia, whereas the molecular identification of isolates will be helpful for understanding the population structure and spread of *S. aureus* at the national and international level.

7 VIRI

- Alibayov B., Baba-Moussa L., Sina H., Zdeňková K., Demnerová K. 2014. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Molecular Biology Reports*, 41, 8: 5005–5018
- Andrews J.M., BSAC Working Party on Susceptibility Testing. 2009. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 3: 454–489
- Applied Maths. 2016. Bionumerics: Applications: *Staphylococcus aureus spa* typing. Sint-Martens-Latem, Applied Maths: 2 str.
<http://www.applied-maths.com> (marec 2016)
- Baranovich T., Zaraket H., Shabana I.I., Nevzorova V., Turcutyucov V., Suzuki H. 2010. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 6: 575–582
- Baron E.J., Thomson R.B., jr. 2011. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. V: *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen G.F., Landry M.F., Warnock D.V. (eds.). Washington D.C., American Society for Microbiology: 228–271
- Bartlett A.H., Hulten K.G. 2010. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29, 9: 860–861
- Becker K., von Eiff C. 2011. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci*. V: *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen G.F., Landry M.F., Warnock D.V. (eds.). Washington D.C., American Society for Microbiology: 308–330
- Berube B.J., Bubeck W. J. 2013. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5, 6:1140–1166
- Bosch T., Verkade E., van Luit M., Landman F., Kluytmans J., Schouls L.M. 2015. Transmission and persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians and their household members. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1:124–129
- Brown D.F., Edwards D.I., Hawkey P.M., Morrison D., Ridgway G.L., Towner K.J., Wren M.W.; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 6: 1000–1018

- Budimir A., Deurenberg R.H., Plecko V., Vink C., Kalenic S., Stobberingh E.E. 2006. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 2: 331–334
- Calfee D.P. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25, 4: 385–394
- CDC. 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997 - 1999. *Journal of the American Medical Association*, 282, 12: 1123–1125
- CDC. 2014. Federal select agent program: Select agents and toxins list: Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.
<http://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html> (marec, 2016)
- Cespedes C., Said-Salim B., Miller M., Lo S.H., Kreiswirth B.N., Gordon R.J., Vavagiakis P., Klein R.S., Lowy F.D. 2005. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 3: 444–452
- Chambers H.F., Deleo F.R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 9: 629–641
- Chua K.Y., Howden B.P., Jiang J.H., Stinear T., Peleg A.Y. 2014. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 554–562
- CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute: 183 str.
- Conceição T., Aires-de-Sousa M., Pona N., Brito M.J., Barradas C., Coelho R., Sardinha T., Sancho L., de Sousa G., Machado Mdo C., de Lencastre H. 2011. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30, 2: 293–297
- Cookson B.D., Robinson D.A., Monk A.B., Murchan S., Deplano A., de Ryck R., Struelens M.J., Scheel C., Fussing V., Salmenlinna S., Vuopio-Varkila J., Cuny C., Witte W., Tassios P.T., Legakis N.J., van Leeuwen W., van Belkum A., Vindel A., Garaizar J., Haeggman S., Olsson-Liljequist B., Ransjö U., Müller-Premru M., Hryniewicz W., Rossney A., O'Connell B., Short B.D., Thomas J., O'Hanlon S., Enright M.C. 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 6: 1830–1837

- Cuny C., Wieler L.H., Witte W. 2015. Livestock-associated MRSA: The impact on humans. *Antibiotics*, 4, 4: 521-543, doi: 10.3390/antibiotics4040521: 23 str.
- Cvitković Špik V., Grmek Košnik I., Lorenčič Robnik S., Žohar Čretnik T., Sarjanović L., Kavčič M., Harlander T., Štrumbelj I., Tomič V., Piltaver Vajdec J., Fišer J., Kolman J., Mueller Premru M. 2009. Genetska opredelitev za meticilin občutljivih in proti meticilinu odpornih sevov *Staphylococcus aureus*, izoliranih iz hemokultur v slovenskih bolnišnicah, s tipizacijo *spa*. *Zdravstveno Varstvo*, 48: 78–84
- Čižman M., Beović B. 2013. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. 2. izd. Ljubljana, Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva: 143–145
- DeLeo F.R., Chambers H.F. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *Journal of Clinical Investigation*, 119, 9: 2464–2474
- DeLeo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N., Chambers H.F. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375, 9725: 1557–1568
- Denton M., O'Connell B., Bernard P., Jarlier V., Williams Z., Henriksen A.S. 2008. The EPISA study: antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing primary or secondary skin and soft tissue infections in the community in France, the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 3: 586–588
- Dermota U., Mueller-Premru M., Švent-Kučina N., Petrovič Ž., Ribič H., Rupnik M., Janežič S., Zdovc I., Grmek-Košnik I. 2015. Survey of community-associated-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Slovenia: identification of community-associated and livestock-associated clones. *International Journal of Medical Microbiology*, 305, 6: 505–510
- Deurenberg R.H., Stobberingh E.E. 2009. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Molecular Medicine*, 9, 2: 100–115
- Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A., Stobberingh E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 3: 222–235
- Dryden M.S. 2009. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, Suppl. 1: S2–S7
- Dryden M.S. 2010. Complicated skin and soft tissue infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, Suppl. 3: iii35–iii44

- Dryden M., Andrasevic A.T., Bassetti M., Bouza E., Chastre J., Baguneid M., Esposito S., Giamarellou H., Gyssens I., Nathwani D., Unal S., Voss A., Wilcox M. 2015. Managing skin and soft-tissue infection and nosocomial pneumonia caused by MRSA: a 2014 follow-up survey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 45, Suppl. 1: S1–S14
- DSMZ. 2016. German collection of microorganisms and cell cultures: Permissions and restrictions: Braunschweig, Leibniz Institute DSMZ: 2 str.
<https://www.dsmz.de/?id=294#c744> (januar 2016)
- Dumitrescu O., Boisset S., Badiou C., Bes M., Benito Y., Reverdy M.E., Vandenesch F., Etienne J., Lina G. 2007. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 4: 1515–1519
- eBURST. 2014. London, Imperial College: baza podatkov.
<http://eburst.mlst.net/> (april 2014)
- ECDC. 2016. Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net): Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates to methicillin in Slovenia, 2011 - 2014: Solna, European Centre for Disease Prevention and Control: baza podatkov.
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx (marec 2016)
- Emilda J.K., Shenoy S.M., Chakrapani M., Kumar P., Bhat K.G. 2014. Clinical spectrum and antimicrobial resistance pattern of skin and soft tissue infections caused by community acquired-methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 80, 6: 539–540
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3: 1008–1015
- Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11: 7687–7692
- Enright M.C., Spratt B.G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7, 12: 482–487
- Feavers I.M., Suker J., McKenna A.J., Heath A.B., Maiden M.C. 1992. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity*, 60, 9: 3620–3629

- Feil E.J., Cooper J.E., Grundmann H., Robinson D.A., Enright M.C., Berendt T., Peacock S.J., Smith J.M., Murphy M., Spratt B.G., Moore C.E., Day N.P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*, 185, 11: 3307–3316
- Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 186, 5: 1518–1530
- Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 4: 430–440
- Fraser J.D., Proft T. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews*, 225: 226–243
- Gagliotti C., Monaco M., Sabia C., Gargiulo R., Sarti M., Sanchini A., Marchi M., Ambretti S., Calanca F., Carillo C., Cipolloni A.P., Confalonieri M., Di Carlo C., Pedna M.F., Ricci L., Rossi M.R., Incerti S.S., Testa G., Venturelli C., Pantosti A., Moro M.L. 2012. *Staphylococcus aureus* in a northern Italian region: phenotypic and molecular characterization. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44, 1: 24–28
- García-Álvarez L., Holden M.T., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J., Holmes M.A. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 11, 8: 595–603
- Gonano M., Hein I., Zangerl P., Rammelmayr A., Wagner M. 2009. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. *Epidemiology and Infection*, 137, 5: 688–699
- Grmek Košnik I., Kraigher A., Hočevar Grom A., Perpar Veninšek I., Premru M. 2005. Monitoring CA-MRSA infections in Slovenia. *Eurosurveillance*, 10, 37: pii2793: 2 str. <http://www.eurosurveillance.org/viewarticle.aspx?articleid=2793> (april 2016)
- Grumann D., Nübel U., Bröker B.M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins - their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 583–592
- Grundmann H., Aanensen D.M., van den Wijngaard C.C., Spratt B.G., Harmsen D., Friedrich A.W., European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. 2010. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Medicine*, 7: e1000215, doi: 10.1371/journal.pmed.1000215: 15 str.

- Grundmann H., Schouls L.M., Aanensen D.M., Pluister G.N., Tami A., Chlebowicz M., Glasner C., Sabat A.J., Weist K., Heuer O., Friedrich A.W., ESCMID Study Group on Molecular Epidemiological Markers, European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. 2014. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *Eurosurveillance*, 19, 49: pii20987: 10 str.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20987> (april 2016)
- Gu F.F., Hou Q., Yang H.H., Zhu Y.Q., Guo X.K., Ni Y.X., Han L.Z. 2015. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from non-native patients with skin and soft tissue infections in Shanghai. *PloS One*, 10, 4: e0123557, doi: 10.1371/journal.pone.0123557. eCollection 2015: 12 str.
- Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothgänger J., Claus H., Turnwald D., Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 12: 5442–5448
- Heinze G., Schemper M. 2002. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statistics in Medicine*, 21: 2409–2419
- Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2, 3: 677–684
- Holden M.T., Feil E.J., Lindsay J.A., Peacock S.J., Day N.P., Enright M.C., Foster T.J., Moore C.E., Hurst L., Atkin R., Barron A., Bason N., Bentley S.D., Chillingworth C., Chillingworth T., Churcher C., Clark L., Corton C., Cronin A., Doggett J., Dowd L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard N., Line A., Mayes R., Moule, S., Mungall K., Ormond D., Quail M.A., Rabinowitsch E., Rutherford K., Sanders M., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G., Spratt B.G., Parkhill J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 26: 9786–9791
- Holtfreter S., Grumann D., Schmudde M., Nguyen H.T., Eichler P., Strommenger B., Kopron K., Kolata J., Giedrys-Kalemba S., Steinmetz I., Witte W., Bröker B.M. 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2669–2680
- Isenberg H.D. 2010. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis: Application to molecular epidemiology. V: *Clinical microbiology procedures handbook*. 3rd ed. Garcia L.S., Isenberg H.D. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 12451–12457

- Ito T., Kuwahara K., Hiramatsu K. 2007. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. *Methods in Molecular Biology*, 391: 87–102
- Jarraud S., Peyrat M.A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougel C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M., Lina G. 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, 166, 1: 669–677
- Knox J., Uhlemann A.C., Lowy F.D. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends in Microbiology*, 23, 7: 437–444
- Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *American Journal of Pathology*, 185, 6: 1518–1527
- Koerner R., Johnson A.P. 2011. Changes in the classification and management of skin and soft tissue infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2: 232–234
- Kumar N., David M.Z., Boyle-Vavra S., Sieth J., Daum R.S. 2015. High *Staphylococcus aureus* colonization prevalence among patients with skin and soft tissue infections and controls in an urban emergency department. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 3: 810–815
- Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S., Brown E.L., Bes M., Benito Y., Barbu E.M., Vazquez V., Höök M., Etienne J., Vandenesch F., Bowden M.G. 2007. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315, 5815: 1130–1133
- Lamers R.P., Stinnett J.W., Muthukrishnan G., Parkinson C.L., Cole A.M. 2011. Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. *PLoS One*, 6, 1: e16426, doi: 10.1371/journal.pone.0016426: 12 str.
- Larsen A.R., Skov R.L., Jarlier V., Henriksen A.S. 2008. Epidemiological differences between the UK and Ireland versus France in *Staphylococcus aureus* isolates resistant to fusidic acid from community-acquired skin and soft tissue infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 3: 589–594
- Lee M.H., Arrecubieta C., Martin F.J., Prince A., Borczuk A.C., Lowy F.D. 2010. A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 201, 4: 508–515
- Lindsay J.A. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 2–3: 98–103

- Lindsay J.A. 2013. Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance-what have we learned from genomics. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 6–7: 318–323
- Lindsay J.A. 2014a. Evolution of *Staphylococcus aureus* and MRSA during outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 548–553
- Lindsay J.A. 2014b. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 2: 103–109
- Lindsay J.A., Holden M.T. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in Microbiology*, 12, 8: 378–385
- Lindsay J.A., Holden M.T. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Functional & Integrative Genomics*, 6, 3: 186–201
- Lindsay J.A., Moore C.E., Day N.P., Peacock S.J., Witney A.A., Stabler R.A., Husain S.E., Butcher P.D., Hinds J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *Journal of Bacteriology*, 188, 2: 669–676
- Lotrič Furlan S. 2014. Okužbe kože in mehkih tkiv. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (ur.). Ljubljana, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo Ljubljana: 151–162
- Lowy F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339, 8: 520–532
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190–212
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292–1305
- Masiuk H., Kopron K., Grumann D., Goerke C., Kolata J., Jursa-Kulesza J., Giedrys-Kalemba S., Bröker B.M., Holtfreter S. 2010. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 5: 1527–1535
- McCarthy A.J., Lindsay J.A. 2013. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infection, Genetics and Evolution*, 19: 7–14

- McCarthy A.J., van Wamel W., Vandendriessche S., Larsen J., Denis O., Garcia-Graells C., Uhlemann A.C., Lowy F.D., Skov R., Lindsay J.A. 2012. *Staphylococcus aureus* CC398 clade associated with human-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 24: 8845-8848
- McDonald R.R., Antonishyn N.A., Hansen T., Snook L.A., Nagle E., Mulvey M.R., Levett P.N., Horsman G.B. 2005. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 12: 6147-6149
- Milheiriço C., Oliveira D.C., de Lencastre H. 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1: 42–48
- Miller L.G., Eells S.J., David M.Z., Ortiz N., Taylor A.R., Kumar N., Cruz D., Boyle-Vavra S., Daum R.S. 2015. *Staphylococcus aureus* skin infection recurrences among household members: an examination of host, behavioral, and pathogen-level predictors. *Clinical Infectious Diseases*, 60, 5: 753–763
- MLST. 2014. Multi locus sequence typing: *Staphylococcus aureus*: London, Imperial College, Wellcome Trust: baza podatkov.
<http://saureus.mlst.net/> (april 2014)
- Monecke S., Coombs G., Shore A.C., Coleman D.C., Akpaka P., Borg M., Chow H., Ip M., Jatzwauk L., Jonas D., Kadlec K., Kearns A., Laurent F., O'Brien F.G., Pearson J., Ruppelt A., Schwarz S., Scicluna E., Slickers P., Tan H.L., Weber S., Ehricht R. 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6, 4: e17936, doi: 10.1371/journal.pone.0017936: 24 str.
- Monecke S., Luedicke C., Slickers P., Ehricht R. 2009. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 9: 1159–1165
- Monecke S., Müller E., Dorneanu O.S., Vremeră T., Ehricht R. 2014. Molecular typing of MRSA and of clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Iași, Romania. *PLoS One*, 9, 5: e97833, doi: 10.1371/journal.pone.0097833: 9 str.
- Monecke S., Slickers P., Ehricht R. 2008. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53, 2: 237–251

- Monecke S., Slickers P., Ellington M.J., Kearns A.M., Ehricht R. 2007. High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 12: 1157–1164
- Müller-Premru M., Strommenger B., Alikadic N., Witte W., Friedrich A.W., Seme K., Kučina N.S., Smrke D., Špik V., Gubina M. 2005. New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24, 12: 848–850
- Muthukrishnan G., Lamers R.P., Ellis A., Paramanandam V., Persaud A.B., Tafur S., Parkinson C.L., Cole A.M. 2013. Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. *BMC Infectious Diseases*, 13: 221, doi: 10.1186/1471-2334-13-221: 13 str.
- Noble W.C., Virani Z., Cree R.G. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 72, 2: 195–198
- Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 8: 541–551
- Otter J.A., French G.L. 2012. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. *Journal of Hospital Infection*, 81, 3: 143–148
- Otter J.A., French G.L. 2010. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 4: 227–239
- Otto M. 2013. Community-associated MRSA: what makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 6–7: 324–330
- Otto M. 2012. How *Staphylococcus aureus* breaches our skin to cause infection. *Journal of Infectious Diseases*, 205, 10: 1483–1485
- Otto M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17: 32–37
- Pardos de la Gandara M., Raygoza Garay J.A., Mwangi M., Tobin J.N., Tsang A., Khalida C, D'Orazio B., Kost R.G., Leinberger-Jabari A., Coffran C., Evering T.H., Coller B.S., Balachandra S., Urban T., Parola C., Salvato S., Jenks N., Wu D., Burgess R., Chung M., de Lencastre H., Tomasz A. 2015. Molecular types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-sensitive *S. aureus* strains causing skin and soft tissue infections and nasal colonization, identified in community health centers in New York city. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 8: 2648–2658

- Peacock S.J., de Silva I., Lowy F.D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? Trends in Microbiology, 9, 12: 605–610
- Peacock S.J., Moore C.E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., O'Neill G., Day N.P. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity, 70, 9: 4987–4996
- Pulia M.S., Calderone M.R., Meister J.R., Santistevan J., May L. 2014. Update on management of skin and soft tissue infections in the emergency department. Current Infectious Disease Reports, 16, 9: 418, doi: 10.1007/s11908-014-0418-9: 9 str.
- PVL sub-group of the Steering Group on Healthcare Associated Infection. 2008. Guidance on the diagnosis and management of PVL-associated *Staphylococcus aureus* infections (PVL-SA) in England. 2nd ed. London, Health Protection Agency: 49 str.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing: Vienna, R Foundation for Statistical Computing: programska oprema.
<http://www.r-project.org> (julij 2014)
- Rasmussen G., Monecke S., Ehricht R., Söderquist B. 2013. Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden. PLoS One, 8, 10: e77477, doi: 10.1371/journal.pone.0077477: 10 str.
- Ridom Spa Server. 2014. Münster, Ridom GmbH: baza podatkov.
<http://www.spaserver.ridom.de/> (april 2014)
- Rolo J., Miragaia M., Turlej-Rogacka A., Empel J., Bouchami O., Faria N.A., Tavares A., Hryniewicz W., Fluit A.C., de Lencastre H.; CONCORD Working Group. 2012. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. PLoS One, 7: e34768, doi: 10.1371/journal.pone.0034768: 10 str.
- Rossney A.S., Shore A.C., Morgan P.M., Fitzgibbon M.M., O'Connell B., Coleman D.C. 2007. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. Journal of Clinical Microbiology, 45, 8: 2554–2563
- Salgado-Pabón W., Breshears L., Spaulding A.R., Merriman J.A., Stach C.S., Horswill A.R., Peterson M.L., Schlievert P.M. 2013. Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. mBio, 4: e00494-13, doi: 10.1128/mBio.00494-13: 9 str.
- Salgado-Pabón W., Case-Cook L.C., Schlievert P.M. 2014. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods in Molecular Biology, 1085: 169–185

- Sampedro G.R., DeDent A.C., Becker R.E., Berube B.J., Gebhardt M.J., Cao H., Bubeck Wardenburg J. 2014. Targeting *Staphylococcus aureus* α -toxin as a novel approach to reduce severity of recurrent skin and soft-tissue infections. *Journal of Infectious Diseases*, 210, 7: 1012–1018
- Sauer P., Síla J., Stosová T., Vecerová R., Hejnar P., Vágnerová I., Kolár M., Raclavský V., Petrzalová J., Lovecková Y., Koukalová D. 2008. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 403–410
- Schlievert P.M. 2014. The dream of staphylococcal vaccination. *Journal of Experimental Medicine*, 211, 12: 2326–2326
- Schlievert P.M., Strandberg K.L., Lin Y.C., Peterson M.L., Leung D.Y. 2010. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 1: 39–49
- Shambat S., Nadig S., Prabhakara S., Bes M., Etienne J., Arakere G. 2012. Clonal complexes and virulence factors of *Staphylococcus aureus* from several cities in India. *BMC Microbiology*, 12: 64, doi: 10.1186/1471-2180-12-64: 9 str.
- Shopsin B., Gomez M., Montgomery S.O., Smith D.H., Waddington M., Dodge D.E., Bost D.A., Riehman M., Naidich S., Kreiswirth B.N. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 11: 3556–3563
- Síla J., Sauer P., Kolar M. 2009. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, Panton-Valentine leukocidin and TSST-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in Olomouc. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 153, 3: 215–218
- Skov R.L., Jensen K.S. 2009. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 73, 4: 364–370
- Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y., Schlievert P.M. 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 3: 422–447
- Stevens D.L., Bisno A.L., Chambers H.F., Dellinger E.P., Goldstein E.J., Gorbach S.L., Hirschmann J.V., Kaplan S.L., Montoya J.G., Wade J.C., Infectious Diseases Society of America. 2014. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 59, 2: e10–e52

- Strommenger B., Braulke C., Heuck D., Schmidt C., Pasemann B., Nübel U., Witte W. 2008. *Spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2: 574–581
- Sung J.M., Lloyd D.H., Lindsay J.A. 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*, 154: 1949–1959
- SURS. 2016. Prebivalstvo po starosti in spolu. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije: 1 str.
<http://www.stat.si/> (marec 2016)
- Swartz M.N., Pastenack M.S. 2005. Skin and soft tissue infections. V: Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.). Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone: 1172–1194
- Švent-Kučina N., Gubina M., Müller-Premru M., Pirš M., Smrke D., Andlovic A., Jeverica S. 2007. Najpogostejši bakterijski povzročitelji okužb ran, mehkih tkiv in kože iz Kliničnega centra v Ljubljani v letu 2006. V: II. Konferenca o ranah z mednarodno udeležbo. Smrke D.M., Triller C., Nikolič J., Trifunovič D. (ur.). Ljubljana, Klinični oddelek za kirurške okužbe, Kirurška klinika, Klinični center: 29–40
- Švent-Kučina N., Pirš M., Kofol R., Blagus R., Smrke D.M., Bilban M., Seme K. 2016. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections samples and healthy carriers in the Central Slovenia region. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 124: 309–318
- Takeuchi S., Ishiguro K., Ikegami M., Kaidoh T., Hayakawa Y. 1996. Detection of toxic shock syndrome toxin-1 gene in *Staphylococcus aureus* bovine isolates and bulk milk by the polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58, 11: 1133–1135
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 9: 2233–2239
- Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G., jr. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 3: 603–661
- Turner K.M., Feil E.J. 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 2: 129–135
- Uhlemann A.C., Otto M., Lowy F.D., DeLeo F.R. 2014. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 563–574

- van Belkum A., Melles D.C., Snijders S.V., van Leeuwen W.B., Wertheim H.F., Nouwen J.L., Verbrugh H.A., Etienne J. 2006. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4: 1555–1557
- van Belkum A., Schrenzel J. 2014. *Staphylococcus aureus*: the innocent culprit? *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 509–509
- van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M., European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, Suppl. 3: 1–46
- van Cleef B.A., Monnet D.L., Voss A., Krziwanek K., Allerberger F., Struelens M., Zemlickova H., Skov R.L., Vuopio-Varkila J., Cuny C., Friedrich A.W., Spiliopoulou I., Pászti J., Hardardottir H., Rossney A., Pan A., Pantosti A., Borg M., Grundmann H., Mueller-Premru M., Olsson-Liljequist B., Widmer A., Harbarth S., Schweiger A., Unal S., Kluytmans J.A. 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 3: 502–505
- van de Sande-Bruinsma N., Leverstein van Hall M.A., Janssen M., Nagtzaam N., Leenders S., de Greeff S.C., Schneeberger P.M. 2015. Impact of livestock-associated MRSA in a hospital setting. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 4: 11, doi: 10.1186/s13756-015-0053-8. eCollection 2015: 6 str.
- Waldron D.E., Lindsay J.A. 2006. SauI: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *Journal of Bacteriology*, 188, 15: 5578—5585
- Wattinger L., Stephan R., Layer F., Johler S. 2012. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 4: 455–464
- Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L. 2005a. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*, 5, 12: 751–762
- Wertheim H.F., van Leeuwen W.B., Snijders S., Vos M.C., Voss A., Vandembroucke-Grauls C.M., Kluytmans J.A., Verbrugh H.A., van Belkum A. 2005b. Associations between *Staphylococcus aureus* genotype, infection, and in-hospital mortality: A nested case-control study. *Journal of Infectious Diseases*, 192, 7: 1196–1200

- Willems R.J., Hanage W.P., Bessen D.E., Feil E.J. 2011. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 5: 872–900
- Wu D., Wang Q., Yang Y., Geng W., Wang Q., Yu S., Yao K., Yuan L., Shen X. 2010. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67, 1: 1–8
- Wulf M.W., Markestijn A., van der Linden F.T., Voss A., Klaassen C., Verduin C.M. 2008. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Eurosurveillance*, 13, 9: pii: 8051: 2 str. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8051> (marec 2016)
- WVDL. 2013. Real time PCR Ct values: Wisconsin, Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory: 1 str. http://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2013/01/WVDL.Info_.PCR_Ct_Values1.pdf (marec 2013)
- Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5026–5033
- Xie Y., He Y., Gehring A., Hu Y., Li Q., Tu S.I., Shi X. 2011. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS One*, 6: e28276, doi: 10.1371/journal.pone.0028276: 11 str.
- Yamaguchi T., Nishifuji K., Sasaki M., Fudaba Y., Aepfelbacher M., Takata T., Ohara M., Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M. 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity*, 70, 10: 5835–5845
- Yu F., Yang L., Pan J., Chen C., Du J., Li Q., Huang J., Zhang X., Wang L. 2011. Prevalence of virulence genes among invasive and colonising *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Hospital Infection*, 77, 1: 89–91

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za strokovno vodenje, koristne nasvete in vzpodbudo pri nastajanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se tudi somentorici prof. dr. Dragici Maji Smrke, dr. med., za koristne strokovne nasvete, pomoč pri koordinaciji odvzema kužnin za mikrobiološke preiskave pri bolnikih in vzpodbudo pri nastajanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. Marjanu Bilbanu, dr. med., ker mi je omogočil in pomagal koordinirati odvzem kužnin za mikrobiološke preiskave pri zdravih osebah.

Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in zelo koristne nasvete se zahvaljujem doc. dr. Roku Blagusu, univ. dipl. ekon.

Za hiter in strokoven pregled, ter koristne nasvete se zahvaljujem komisiji za doktorat, doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin, univ. dipl. biolog., prof. dr. Evi Ružič-Sabljič, dr. med. in doc. dr. Ireni Zdovc, dr. vet. med.

Zahvaljujem se zdravstvenemu osebju v ambulanti Kliničnega oddelka za kirurške okužbe Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana in v laboratoriju Zavoda za varstvo pri delu Ljubljana, Mihi Oražmu in Nini Ovsenik za pomoč pri odvzemu kužnin za mikrobiološke preiskave.

Iskrena hvala vsem mojim sodelavcem na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo medicinske fakultete v Ljubljani (IMI) za nesebično strokovno pomoč in prijateljske nasvete, ter vzpodbudno raziskovalno okolje. Za strokovno pomoč in vzpodbudo se še posebej zahvaljujem predstojniku IMI prof. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., in svojim najožjim sodelavkam Romini Kofol, univ. dipl. mikrobiol., Ireni Sušnik, san. inž., Suzani Rednak, lab. teh., Karmen Šturm, dipl. inž. kem. tehnol., in doc. dr. Mateji Pirš, dr. med.

Zahvaljujem se lektorici za skrben pregled in lekture.

Najlepša hvala mojim prijateljem Ani Mavko, Lili Stevanovič, Primožu Dušanu Jenkoletu, Meliti Pretnar Silvester, skupini iz Kranja in Biofita za prijetno družbo, nasvete in posluh, kadarkoli sem jih, med nastajanjem tega doktorskega dela, potrebovala.

Velika zahvala gre moji mami, ki me je vedno vzpodbujala k delu in vztrajnosti, hčerki Katji, sinu Bernardu in možu Daretu, ki me navdihujejo, razveseljujejo in mi pomagajo pri osebni rasti.

PRILOGE

Priloga A: Vprašalnik za bolnike.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Zaloška 4, 1000 Ljubljana

T: (01) 543 74 00

F: (01) 543 74 01

Univerzitetni klinični center Ljubljana

Klinični oddelek za kirurške okužbe

Zaloška 7, 1000 Ljubljana

T: (01) 522 23 19

F: (01) 522 23 98

Spoštovani!

Vljudno vas prosimo, da izpolnite priloženi vprašalnik. Podatki so delno zaupni, zato smo vam dodelili šifro, podatki o bolniku bodo znani le glavni raziskovalki (asist. Nataša Švent-Kučina, dr.med.). Pridobljeni podatki nam bodo v pomoč pri ugotavljanju izvora povzročitelja okužbe. V odvzetih kliničnih vzorcih (bris rane in bris nosnic) bomo ugotavljali prisotnost bakterije: *Staphylococcus aureus*. Zanimajo nas značilnosti te bakterije, ali je okužbo povzročila bakterija, proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* – MRSA, ali izvira iz domačega ali iz bolnišničnega okolja ter ali je bakterija prisotna tudi na površini sluznice nosu.

Rezultate preiskav vam bomo v obliki izvida posredovali na dom.

Kakršnekoli dodatne informacije lahko dobite na tel. št. 01 543 74 48 (asist. Nataša Švent-Kučina, dr. med.) med 10. in 14. uro.

asist. Nataša Švent-Kučina, dr. med.

prof. dr. Dragica Maja Smrke, dr. med.

prof. dr. Katja Seme, dr. med.

VPRAŠALNIK 1

SPLOŠNI PODATKI

ŠIFRA PREISKOVANCA _____

Koliko oseb živi v vašem gospodinjstvu?

Ali ste trenutno zaposleni?

DA

NE

Če ste odgovorili z DA, opišite delovno mesto:

OSEBNA ANAMNEZA

Kdaj so se pojavile težave, zaradi katerih ste sedaj poiskali zdravniško pomoč (prekrižajte kvadratake za ustreznim odgovorom)?

Pred nekaj dnevi

Pred enim tednom

Pred več kot enim tednom

Pred več kot enim mesecem

Ali ste že kdaj imeli podobne težave?

DA

NE

Če ste odgovorili z DA:

Kdaj (leto)? _____

Ali ste takrat potrebovali kirurški poseg (operacijo)? DA NE

Ali ste takrat prejeli antibiotike? DA NE

Če ste odgovorili z DA: Katere (napišite)? _____

Ali so takrat ugotovili, da ste okuženi z MRSA? DA NE

Ali ste se v zadnjem letu dni zdravili v bolnišnici?

DA

NE

Če ste odgovorili z DA:

V kateri? _____

Zakaj? _____

Ali ste se bili v zadnjem letu dni nastanjeni v negovalni ustanovi ali domu starejših občanov?

DA

NE

Ali ste se bili v zadnjem letu dni operirani?

DA

NE

Priloga B: Vprašalnik za zdrave osebe.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Zaloška 4, 1000 Ljubljana

T: (01) 543 74 00

F: (01) 543 74 01

Spoštovani!

Vljudno vas prosimo, da izpolnite priloženi vprašalnik. Podatki so zaupni, zato smo vam dodelili šifro. Pridobljeni podatki nam bodo v pomoč pri oceni kriterijev za vključitev oziroma ne vključitev v raziskavo. V odvzetih nadzornih vzorcih (bris nosnic) bomo ugotavljali prisotnost bakterije: *Staphylococcus aureus*. Zanimajo nas značilnosti te bakterije (predvsem občutljivost za antibiotike, sposobnost, da povzroči okužbo, in genetska raznolikost). V raziskavi želimo opredeliti in primerjati izolate *S. aureus*, ki jih bomo osamili pri bolnikih z okužbo kože in mehkih tkiv, z izolati *S. aureus*, ki kolonizirajo zdrave nosilce (spadate v skupino zdravih nosilcev).

Prosimo tudi, da podpišete priloženo soglasje za sodelovanje v raziskavi.

Kakršnekoli dodatne informacije in podatke o rezultatih preiskav lahko na osnovi dodeljene šifre dobite na tel. št. 01 543 74 48 (asist. Nataša Švent-Kučina, dr. med.) ali 01 543 74 30 (mikrobiološki laboratorij) med 10. in 14. uro.

asist. Nataša Švent-Kučina, dr. med.
prof. dr. Dragica Maja Smrke, dr. med.
prof. dr. Katja Seme, dr. med.

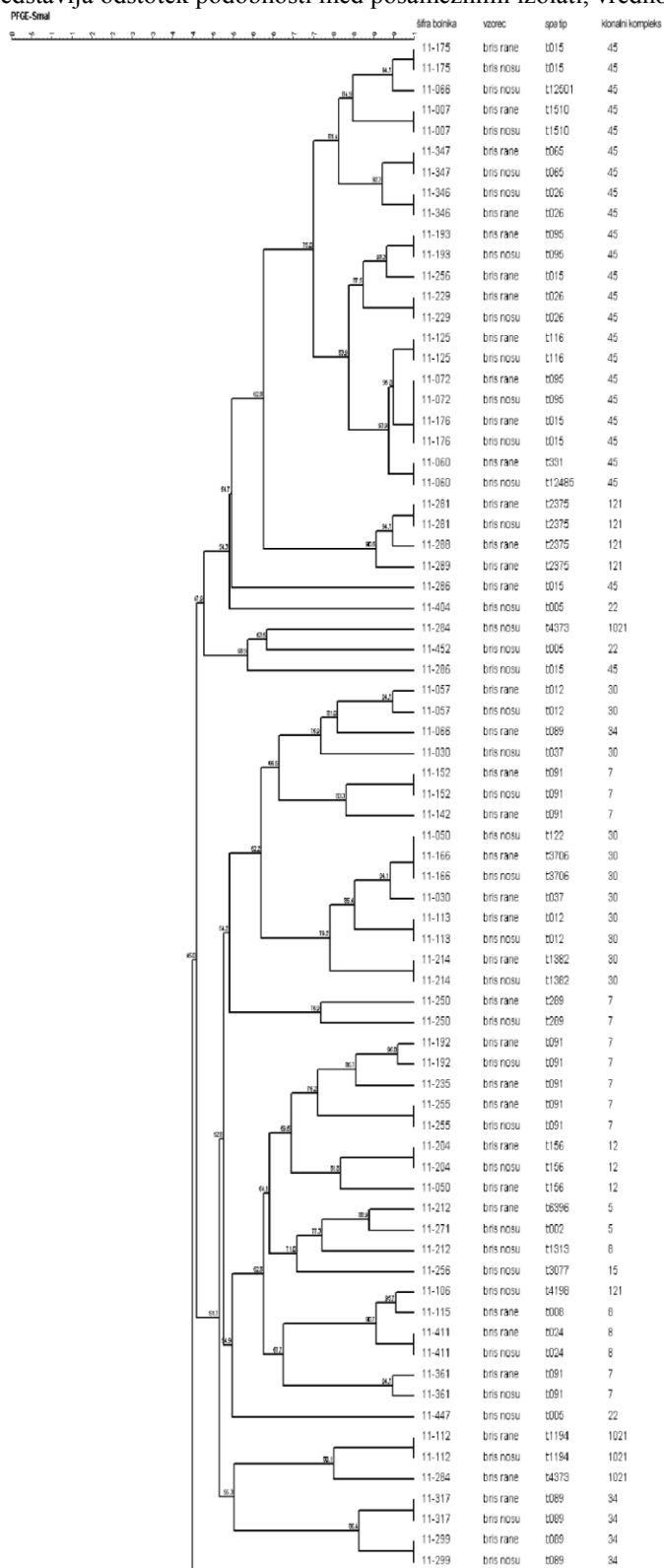
ŠIFRA PREISKOVANCA: _____

Priloga C: Prikaz molekularnih značilnosti 39 izolatov *Staphylococcus aureus*, osamljenih pri desetih zaporednih pozitivnih vzorcih različnih zdravih oseb, pri katerih smo iz primarne plošče osamili in opredelili tri do štiri kolonije *S. aureus* z namenom ugotavljanja možne pristranosti, ker smo pri ostalih vzorcih iz primarnih plošč osamili le po eno kolonijo *S. aureus*.

vzorec/ izolat	CC	spa- tip	<i>hla</i>	<i>pvl</i> (lukSF- PV)	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>selj</i>
1-1	20	t3277	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
1-2	20	t3277	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
1-3	20	t3277	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
1-4	20	t3277	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
2-1	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2-2	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2-3	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2-4	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3-1	398	t3625	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3-2	398	t3625	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3-3	398	t3625	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3-4	398	t3625	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4-1	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4-2	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4-3	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4-4	7	t091	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5-1	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
5-2	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
5-3	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
5-4	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
6-1	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
6-2	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
6-3	5	t002	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
7-1	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
7-2	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
7-3	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
7-4	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
8-1	45	t1714	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
8-2	45	t1714	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
8-3	45	t1714	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
8-4	45	t1714	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
9-1	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
9-2	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
9-3	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
9-4	45	t015	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
10-1	20	t164	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
10-2	20	t164	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
10-3	20	t164	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg
10-4	20	t164	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz	neg

CC, klonalni kompleks; *hla* gen za alfa toksin; *pvl* (lukSF-PV), gen za Panton-Valentinov Leukocidin; *tst*, gen za toksin toksičnega šoka 1; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, geni za stafilokokne enterotoksine od A do G; *seh*, *sei*, *selj*, geni za stafilokoknim enterotoksinom podobne beljakovine od H do J.

Priloga D: Drevo sorodnosti po metodi gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*, klonalni kompleksi (CC) in *spa*-tipi izolatov *Staphylococcus aureus*, ki smo jih osamili iz vzorcev rane in nosu pri 70 bolnikih. Za analizo podatkov smo uporabili programsko opremo BioNumerics 7.1, drevo sorodnosti UPGMA in koeficient podobnosti Dice z 1,375 % toleranco zamika med pasovi. Merilo predstavlja odstotek podobnosti med posameznimi izolati, vrednost so izpisane na razvejiščih.



Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D: Drevo sorodnosti po metodi gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) z makrorestrikcijo z encimom *SmaI*, klonalni kompleksi (CC) in *spa*-tipi izolatov *Staphylococcus aureus*, ki smo jih osamili iz vzorcev rane in nosu pri 70 bolnikih. Za analizo podatkov smo uporabili programsko opremo BioNumerics 7.1, drevo sorodnosti UPGMA in koeficient podobnosti Dice z 1,375 % toleranco zamika med pasovi. Merilo predstavlja odstotek podobnosti med posameznimi izolati. Na razvejiščih so zapisane vrednosti odstotka podobnosti.

