

Monika Pobiega, Jadwiga Wójkowska-Mach, Piotr B. Heczko

TYPOWANIE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* W CELU OKREŚLENIA DRÓG SZERZENIA SIĘ LEKOOPORNYCH SZCZEPÓW W ŚRODOWISKU SZPITALNYM I POZASZPITALNYM

Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

STRESZCZENIE

Staphylococcus aureus jest jednym z najważniejszych czynników etiologicznych zarówno zakażeń szpitalnych, jak i pozaszpitalnych. Często izolowane są szczepy wielolekooporne, co jest związane ze stosowaną na danym oddziale antybiotykoterapią, sprzyjającą m. in. selekcji szczepów opornych. Szczepy charakteryzujące się wielolekoopornością i wysoką zjadliwością, mogą klonalnie rozprzestrzeniać się zarówno wewnątrz szpitala, jak i pomiędzy szpitalami. Badania wykazują często dominację konkretnego klonu na terenie danego państwa, jak i rozprzestrzenienie się tego klonu na tereny sąsiednich państw.

Metody typowania drobnoustrojów są narzędziami pomocnymi w kontroli zakażeń. Nowoczesne metody, bazujące na sekwencjonowaniu, stają się użyteczne przy racjonalizacji programów kontroli zakażeń i ograniczaniu szerzenia się infekcji. Za złoty standard w typowaniu *Staphylococcus aureus* uważana jest elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), polegająca na rozdziale fragmentów DNA uzyskanych wskutek cięcia genomu bakteryjnego za pomocą enzymu restrykcyjnego *Sma*I. Metoda MLST (ang. *Multi Locus Sequence Typing*) opiera się na porównaniu konserwatywnych sekwencji genów „housekeeping”, które kontrolują podstawowe funkcje życiowe komórki. Dzięki metodzie MLST jest możliwe wykazanie szerokiego, często międzynarodowego zasięgu konkretnych szczepów. Jednak dla dochodzeń epidemiologicznych MLST wydaje się zbyt pracochłonne i kosztowne do zastosowania jako podstawowe narzędzie do typowania. Metodą uzupełniającą jest typowanie *spa*, bazujące na sekwencjonowaniu krótkich sekwencji repetytywnych z polimorficznego regionu X genu kodującego białko A. Metoda ta może być wykorzystana zarówno do studiowania molekularnej ewolucji *S. aureus*, a także do badania epidemii szpitalnych. Jest metodą szybszą i tańszą, niż MLST. Niezbędne staje się subtypowanie mobilnych elementów odpowiedzialnych za oporność na metycylinę (SCCmec), które pozwalają na rozróżnianie klonów MRSA (ang. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) posiadających wspólnego przodka, ale różnego pochodzenia epidemiologicznego. Typowanie drobnoustrojów obejmuje metody, które pozwalają odtworzyć drogi szerzenia się patogenów, a także porównać je z globalnym rozprzestrzenianiem się szczepów szczególnie zjadliwych. Należy pamiętać, że nie ma jednej uniwersalnej metody typowania dobrej w każdym przypadku, wszystkie zaś obarczone są swoistymi wadami i zaletami.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, MRSA, typowanie, elektroforeza pulsacyjna, MLST

Staphylococcus aureus pozostaje jednym z ważniejszych drobnoustrojów potencjalnie patogennych, obecnych we florze komensalnej człowieka. Niszą najczęściej zasiedlaną przez *S. aureus* jest ciepłe i wilgotne środowisko śluzówek, szczególnie przedsionka nosa, gdzie znajdują się jego receptory. Dane literaturowe wskazują również, że kolonizacja przedsionka nosa (stwierdzana nawet u 58% pacjentów bądź rezydentów) zwykle wiąże się z przejściową kolonizacją gardła (1,2). Wcześniejsza kolonizacja tym drobnoustrojem

jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju zakażenia. Różne szczepy są zdolne do produkcji rozmaitych toksyn i czynników wirulencji, które ułatwiają bakteriom inwazję oraz negatywnie wpływają na układ immunologiczny gospodarza (3). Wiele szczepów jest opornych na liczne antybiotyki, co ogranicza możliwości terapii i powoduje rozprzestrzenianie genów oporności na szczepy wrażliwe (3). Metycylinooporny *S. aureus* (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) stanowi istotną przyczynę zarówno zakażeń pozasz-

pitalnych (*community-acquired* MRSA, CA-MRSA), jak i nabytych w placówkach opieki zdrowotnej (*health care-associated* MRSA, HA-MRSA) (4). Szczepy CA-MRSA, w odróżnieniu od szczepów HA-MRSA, pozostają zazwyczaj wrażliwe na wiele leków, poza beta-laktamami, (5). *Munckhof* zaproponował nawet, aby wprowadzić wrażliwość na więcej niż 2 leki nie-β-laktamowe jako kryterium rozpoznania CA-MRSA (6). CA-MRSA są jednak zazwyczaj dużo bardziej wirulentne, a wiele z nich ma zdolność wytwarzania leukocydyny Panton-Valentine (5).

Z punktu widzenia epidemiologii szpitalnej i nadzoru nad zakażeniami najistotniejsze są zakażenia skóry i tkanek miękkich, zakażenia krwi oraz zapalenia płuc. Zakażenia te mogą pojawić się u pacjentów w oddziale szpitalnym czy u rezydentów opieki długoterminowej jako zakażenia endemiczne, jak i stawać się przyczyną epidemii. Szacuje się, że *S. aureus* jest najczęściej identyfikowanym czynnikiem etiologicznym zakażeń (7) i jest powodem około 1% wszystkich przypadków zakażeń szpitalnych (zakładowych, instytucjonalnych, ang. *nosocomial infections*). Około połowa zakażeń o tej etiologii wśród pacjentów hospitalizowanych to zakażenia szpitalne (8,9). W Stanach Zjednoczonych zachorowalność na zakażenia o etiologii *S. aureus* szacowana jest na 9,13/1000 przyjęć, z czego 43% to przypadki związane ze szczepami metycylinoopornymi MRSA (8). Zazwyczaj *S. aureus* jest najważniejszym patogenem w zakażeniach na oddziale intensywnej terapii (OIT), zarówno dorosłych (10), jak i noworodków (11).

Nadzór nad obecnością MRSA, a co za tym idzie: obniżenie częstości pojawiania się zakażeń o tej etiologii, może mieć bezpośrednie przełożenie na powszechność występowania MRSA w populacji ogólnej, a więc i ryzyko kolonizacji personelu oddziałów, tym bardziej że MRSA jest równie często obserwowany w zakażeniach pozaszpitalnych (12). Należy pamiętać, że znaczącym czynnikiem ryzyka zakażenia o etiologii MRSA jest kolonizacja takim szczepem (3).

Coraz więcej krajów wprowadza powszechny obowiązek badań przesiewowych w kierunku MRSA w stosunku do pacjentów przyjmowanych w trybie planowym do szpitali (z wyjątkiem pobytów dziennych, dermatologii i innych) (13). Prowadzony jest także obowiązkowy nadzór nad metycylinoopornymi izolatami gronkowca złocistego, który jako patogen znaczący w epidemiologii szpitalnej podlega obowiązkowi szczególnego nadzorowania w ramach kontroli zakażeń szpitalnych. Dzieje się tak w polskich szpitalach i od wielu już lat w Finlandii, Norwegii, Szwecji czy Holandii (14).

Antybiotykoterapia stosowana na oddziale wywiera presję i sprzyja selekcji szczepów opornych. Szczepy charakteryzujące się wielolekoopornością, a także

wysoką zjadliwością, mogą klonalnie rozprzestrzeniać się zarówno wewnątrz szpitala, jak i pomiędzy szpitalami. Na terenie danego państwa dominuje często jeden konkretny klon. Z czasem może dochodzić do rozprzestrzenienia się tego klonu na tereny sąsiednich państw i całego kontynentu. Dzięki metodzie MLST (ang. *Multi Locus Sequence Typing*) istnieje możliwość wykazania szerokiego, często międzynarodowego zasięgu konkretnych klonów. Może ona także być zastosowana do badania molekularnej ewolucji *S. aureus* (15) i jest metodą referencyjną dla określenia podstawowej struktury genetycznej populacji *S. aureus*, zdominowanej przez kilkanaście największych kompleksów klonów i obejmuje kilkaset typów sekwencji (ang. *Sequence Type, ST*) (16). Metoda MLST opiera się na porównaniu konserwatywnych sekwencji genów „housekeeping”, które kontrolują podstawowe funkcje życiowe w każdej żywej komórce. Pierwszym etapem reakcji sekwencjonowania jest przeprowadzenie amplifikacji siedmiu genów (*arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi, yqiL*) z siedmioma parami starterów (16). Uzyskane sekwencje nukleotydowe są następnie porównywane do znanych alleli dla każdego locus genu przy użyciu oprogramowania dostępnego w bazie MLST (<http://www.mlst.net/>). Dla każdego izolatu generowanych jest siedem cyfrowych profili allelicznych, które definiują dany typ ST. Ponieważ w każdym z siedmiu badanych loci znajduje się wiele alleli, nie jest możliwe, by dwa izolaty posiadały ten sam profil przypadkowo. Izolaty o tym samym profilu mogą zatem być sklasyfikowane do tego samego typu klonalnego (17). Profile uzyskane dzięki metodzie MLST można łatwo porównywać pomiędzy laboratoriami. W przypadku gronkowców, stosowanie metody MLST może być czasochłonne i wymaga sekwencjonowania dużej liczby nukleotydów (18). Dla celów dochodzeń epidemiologicznych, MLST wydaje się zbyt pracochłonne i kosztowne do zastosowania jako podstawowego narzędzia do typowania. Do tej pory opisano ponad 2400 typów ST dla gronkowca złocistego.

Jako metodę uzupełniającą typowanie MLST, proponuje się typowanie *spa* (ang. *Spa Typing*). Bazuje ono na sekwencjonowaniu krótkich sekwencji repetytywnych (ang. *short sequence repeats, SSR*) z polimorficznego regionu X genu kodującego białko A (*spa*) (18,19). W tym regionie zachodzą mogą liczne spontaniczne mutacje (włącznie z utratą lub pozyskaniem całych sekwencji repetytywnych) (20). Do tej pory opisano około 600 różnych jednostek repetytywnych i ponad 11000 typów *spa* (15). Różne warianty SSR korelują z patogennością i wirulencją bakterii (21). Różnorodność w obrębie genu *spa*, który składa się głównie z 24-zasadowych powtórzeń, jest spowodowana mutacjami punktowymi (zarówno delecjami, jak i duplikacjami) (22). Porównanie typów *spa* w obrębie

Europy oraz całego świata możliwe jest dzięki międzynarodowej bazie danych Ridom StaphType (Ridom GmbH, Niemcy, <http://spaserver.ridom.de>). Dostępne na wymienionej stronie internetowej oprogramowanie automatycznie wykrywa liczbę sekwencji repetytywnych i przypisuje do odpowiedniego typu *spa*. Metoda typowania *spa* może być wykorzystana zarówno do studiowania molekularnej ewolucji *S. aureus*, a także do badania epidemii szpitalnych. Jest metodą szybszą i tańszą, niż MLST. Należy jednak podkreślić, że potencjał dyskryminacyjny typowania *spa* jest niższy, niż metody PFGE. Najczęściej identyfikowanym typem *spa* jest t032, pojawiający się z częstością ok. 11% w wielu różnych krajach Europy (ale nie w Polsce), a także w Stanach Zjednoczonych czy Australii. Kolejne często występujące typy o zasięgu globalnym to t003, t002 i t008, wszystkie identyfikowane na terenie naszego kraju (23).

Oporność *S. aureus* na metycylinę jest wynikiem syntezy transpeptydazy PBP2a. Białko to ma małe powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych i w rezultacie nawet w obecności tych antybiotyków budowa ściany komórkowej nie jest zaburzona, w związku z czym bakterie są zdolne do przeżycia (15). Gen *mecA*, kodujący PBP2a, jest zlokalizowany we wnętrzu operonu *mec* wraz z genami regulatorowymi (15). Ponieważ coraz więcej szczepów *S. aureus* cechuje się obecnością genu *mecA*, niezbędne staje się więc także subtypowanie mobilnych elementów odpowiedzialnych za oporność na metycylinę. Te elementy, nazywane chromosomalną gronkowcową kasetą *mec* (ang. *staphylococcal chromosomal cassette mec*, *SCCmec*), pozwalają na rozróżnianie klonów MRSA (ang. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) posiadających wspólnego przodka, ale różnego pochodzenia epidemiologicznego (16). Cechy charakterystyczne elementów *SCCmec* to:

- obecność kompleksu genu *mec*, który składa się z genu oporności na metycylinę *mecA* i genów regulatorowych (*mecR1* oraz *mecI*) oraz sekwencji insercyjnych (*IS1272* oraz *IS431*),
- obecność kompleksu genu *ccr*, składającego się z genów kodujących rekombinazy, które katalizują wycinanie i integrację elementów *SCCmec* do chromosomu bakteryjnego, a tym samym są odpowiedzialne za mobilność tego elementu oraz elementów otaczających,
- obecność charakterystycznych sekwencji powtórzonych i odwrotnych sekwencji komplementarnych na obu końcach (trzy regiony J – J1 zlokalizowany z prawej strony całej kasety, J2 zlokalizowany pomiędzy kompleksami *mec* i *ccr* oraz J3, zlokalizowany po lewej stronie kasety). Regiony te mogą włączać plazmidy lub transpozony, niosące determinanty oporności na antybiotyki lub jony metali ciężkich (24),
- zdolność do integracji na końcu 3' otwartych ramek odczytu (ORF, ang. *open reading frame*).

Po raz pierwszy elementy *SCCmec* zostały opisane i scharakteryzowane w 1999 roku (25). Dotychczas zidentyfikowano w sumie jedenaście różnych typów *SCCmec* (26). Studia epidemiologiczne dowodzą, że aby prawidłowo zaklasyfikować klon, należy wykonać nie tylko MLST i typowanie *spa*, ale także *SCCmec* (15,26). Można wyróżnić trzy różne podejścia w typowaniu elementów *SCCmec*: metody oparte o łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *Polymerase chain reaction*, PCR) i jej odmianę w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time PCR*) lub metody bazujące na trawieniu restrykcyjnym. Jednak najbardziej obiecująca jest metoda zaproponowana przez Kondo *et al.* (27), bazująca na sześciu reakcjach multipleks-PCR:

- M-PCR 1 amplifikuje *ccr* (1-4) wraz z genem *mecA*
- M-PCR 2 amplifikuje klasy *mec* A, B i C2
- M-PCR 3 amplifikuje ORF z regionu J1 *SCCmec* typów I i IV
- M-PCR 4 amplifikuje ORF regionu J1 z *SCCmec* typów II, III i V
- M-PCR 5 i 6 amplifikują geny zlokalizowane w regionach J2 i J3

Metoda ta jednak jest czasochłonna i wymaga przeprowadzenia dużej ilości reakcji. W większości wypadków do celów epidemiologicznych wystarcza jednak przeprowadzenie reakcji M-PCR 1 i 2. Reakcje M-PCR 3 i 4 służą do subtypowania różnic w regionie J1, zaś M-PCR 5 i 6 identyfikują zintegrowane kopie transpozonów i plazmidów. Jak dotychczas, nie opracowano jednak metod typowania *SCCmec* typu VII, X i XI.

Przeprowadzenie analizy genotypowego podobieństwa *S. aureus* można wykonywać także przy pomocy elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE). W przypadku typowania *S. aureus*, jest ona uznawana za złoty standard. PFGE polega na rozdzielaniu elektroforetycznym w zmiennym polu elektrycznym fragmentów DNA uzyskanych wskutek cięcia genomu bakteryjnego za pomocą wybranego enzymu restrykcyjnego (dla *S. aureus* jest to *SmaI*). Rozdzielone na żelu fragmenty DNA widoczne są w formie prążków, które formują specyficzny dla danego szczepu wzór prążkowy. W przypadku większości bakterii, rozdzielane fragmenty mają wielkość od 30kb do 1Mb. Uzyskane wzory restrykcyjne mogą być następnie analizowane przy pomocy kryteriów zaproponowanych przez Tenovera *et al.* w celu wyodrębnienia grup klonalnych (28) z użyciem odpowiedniego oprogramowania do analizy pokrewieństwa szczepów (np. GelCompar firmy Applied Maths, GeneProfiler i inne). Dodatkowo, w przypadku inercji lub delecji dużych mobilnych elementów genetycznych do genomu bakteryjnego, widoczne będą zmiany we wzorach prąż-

kowych (29). Co więcej, plazmidowe DNA o wielkości do 50kb nie zaburza rozdzielności elektroforetycznej i późniejszych analiz, ze względu na zbyt mały rozmiar plazmidów (29). Metoda PFGE jest wykorzystywana do analizy genotypowego podobieństwa między izolatami, głównie w dochodzeniach epidemiologicznych. Jest wysoce dyskryminacyjna, ale czasochłonna i wymagająca odpowiedniej aparatury, zaś dodatkowym problemem może być brak miejsc cięć restrykcyjnych u niektórych szczepów, co czyni je niemożliwymi do typowania tą metodą (30). Ponadto, rezultaty z różnych laboratoriów często nie mogą być porównane między sobą.

Typowanie drobnoustrojów obejmuje metody, które pozwalają odtworzyć drogi szerzenia się patogenów, a także porównać je z globalnym rozprzestrzenianiem się szczepów szczególnie zjadliwych. Daje to możliwość poznania zjawiska zakażeń o etiologii *S. aureus* w różnych populacjach pacjentów, a także przyczynia się do ich ograniczania. Należy pamiętać, że nie ma jed-

nej uniwersalnej metody typowania, dobrej w każdym przypadku, wszystkie zaś obciążone są swoistymi wadami i zaletami. Kolejną istotną informacją jest fakt, że różnice znajdowane przy pomocy jednej z metod wcale nie muszą być wykryte, gdy zastosowana zostanie inna technika. Dlatego, w niektórych sytuacjach, zalecane jest zastosowanie jednocześnie kilku metod typowania w celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji

Otrzymano: 8.11.2012 r.

Zaakceptowano do druku: 21.02.2013 r.

Adres do korespondencji:

Mgr Monika Pobiega

Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Ul. Czysta 18, 31-121 Kraków; Tel. +48 12 633 25 67

e-mail: monika.pobiega@gmail.com