

Laboratorinė medicina.
2021, t. 23, Nr. 2(88), p. 67–73.

Iš klinikinės medžiagos išskirtų *Staphylococcus aureus* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Agnė Kirkliauskienė¹
Lina Kaplerienė¹
Vida Strumskienė²
Jolanta Miciulevičienė³
Narimantas Markevičius³
Rafal Sinkevič⁴

Santrauka

Tyrimo tikslas – įvertinti *Staphylococcus aureus*, išskirtų iš klinikinės medžiagos, atsparumą antimikrobinėms medžiagoms bei nustatyti pagrindinius atsparumą antimikrobiniam vaistams koduojančius genus.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Tyrimas atliktas nuo 2017 m. kovo iki 2018 m. balandžio mėnesio Vilniaus miesto klinikinėje ligoninėje. *S. aureus* išskirtas iš klinikinės medžiagos ir identifikuotas masių spektrometrijos sistema VITEK MS. Išskirtų *S. aureus* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms ištirtas laikantis Europos antimikrobinio jautrumo tyrimo komiteto rekomendacijų. *S. aureus* padermių, atsparių tetraciklinui ar eritromicinui, genams nustatyti taikyta dauginė polimerazės grandinės reakcija.

Rezultatai. Ištirta 364 *S. aureus* padermės, išskirtos iš klinikinės medžiagos. 67,6 % *S. aureus* išskirta iš odos ir minkštųjų audinių, 12,9 % – iš kraujo, 14,3 % – iš apatinių kvėpavimo takų ir kt. Nustatyta, kad visos 364 padermės buvo jautrios rifampicinui ir vankomicinui. 22,3 % izoliatų – jautrūs visoms tirtoms antimikrobinėms medžiagoms. Didžiausias atsparumas buvo penicilinui ir siekė 73,9 %. Išskirtų *S. aureus* padermių atsparumas eritromicinui ir tetraciklinui buvo atitinkamai 9,9 % ir 6,3 %. Mažiau kaip 4 % tirtų *S. aureus* padermių buvo atsparios fuzidino rūgščiai ir cefoksitinui. Keturios meticilinui atsparios padermės išskirtos iš kraujo, aštuonios – iš odos ir minkštųjų audinių paimtų mėginių. 87 % tetraciklinui atsparių *S. aureus* padermių nustatytas *tetK* genas, 72,2 % eritromicinui atsparių padermių nustatytas *ermC* genas, 19,5 % – *ermA* genas.

Išvados. Nustatytas didelis iš klinikinės medžiagos išskirtų *S. aureus* padermių atsparumas penicilinui. Visos išskirtos *S. aureus* padermės buvo jautrios rifampicinui ir vankomicinui. 3,6 % tirtų *S. aureus* padermių atsparios meticilinui. Tarp tetraciklinui atsparių padermių dominuoja *tetK*, tarp eritromicinui atsparių – *ermC* genai.

Reikšminiai žodžiai: *Staphylococcus aureus*, atsparumas, antimikrobinės medžiagos, atsparumą koduojantys genai.

¹Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas: agne.kirkliauskienė@mf.vu.lt

²Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras

Life Science Center, Vilnius University

³Vilniaus miesto klinikinė ligoninė
Vilnius City Clinical Hospital

⁴Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas
Faculty of Medicine, Vilnius University

ĮVADAS

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) yra vienas iš bakteremijų, endokardito, odos ir minkštųjų audinių, kaulų ir sąnarių sistemų infekcinių ligų bei hospitalinių infekcijų sukėlėjų [1]. Per

pastaruosius du dešimtmečius pastebima *S. aureus* infekcijų epidemiologijos pokyčių: daugėja su sveikatos priežiūra susijusių infekcijų, ypač infekcinių endokarditų ir protezų infekcijų, bei odos ir minkštųjų audinių infekcijų, kurias sukelia padermės, turinčios

tam tikrus virulentiškumo veiksnius ir atsparumą -laktaminiams antibiotikams [2]. Atsparumas -laktamams įgaunamas įgyjant geną, koduojantį peniciliną surišantį baltymą (PBP2a), kuris labai sumažina jautrumą -laktaminiams antibiotikams [3]. Antimikrobinio atsparumo vystymasis yra natūralus reiškinys, kurį sukelia bakterijų genų mutacijos arba horizontalus atsparumo genų perdavimas tarp bakterijų. Bakterijos gali įgyti skirtingus atsparumo mechanizmus ir tapti atsparios kelioms antimikrobinėms medžiagoms [4]. Atsparumo mechanizmai susiję su atsparių antibiotikams, ypač meticilinui atsparių *Staphylococcus aureus* (angl. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) padermių plitimu [5]. Antimikrobinę medžiagų vartojimas skatina antimikrobinio atsparumo vystymąsi, o neefektyvi infekcijų prevencija ir kontrolė lemia šių bakterijų plitimą [4]. Nors invazinių MRSA infekcijų skaičius daugelyje šalių mažėja (ES šalyse nuo 19,6 % 2014 m. iki 16,9 % 2017 m.), Lietuvos invazinių MRSA infekcijų skaičius išlieka nepakitęs (Lietuvoje nenustatyta statistiškai reikšmingos MRSA dažnio dinamikos: 2014 m. – 7,8 %, 2017 m. – 8,8 %), o kai kuriose šalyse (Ispanijoje, Kroatijoje) MRSA dažnis išlieka augantis, todėl reikia ir toliau ieškoti naujų priemonių siekiant įveikti MRSA infekcijas [4, 5]. Nors kai kuriuose pasaulio regionuose MRSA dažnis mažėja, tačiau vis dar kelia didelę klinikinę grėsmę dėl didelio ligonių mirtingumo ir atsparumo antimikrobinėms medžiagoms [6].

TIKSLAS

Šio tyrimo tikslas – įvertinti *Staphylococcus aureus*, išskirtų iš klinikinės medžiagos, atsparumą antimikrobinėms medžiagoms bei nustatyti pagrindinius atsparumą tetraciklinui ir eritromicinui koduojančius genus.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tiriamosios medžiagos surinkimas

Gavus Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų komiteto leidimą Nr. 158200-17-969-481, tyrimas buvo atliekamas Vilniaus mieste nuo 2017 m. kovo iki 2018 m. balandžio. Tyrime sutikusioje dalyvauti Vilniaus miesto klinikinėje ligoninėje (VMKL) iš sergančio infekcine liga paciento pagal klinikinės indikacijas paimta tiriamosios medžiagos (pūlių, skreplių, opų, žaizdų eksudato, kraujo ir kt.) ir ji nugabenta į ligoninės Mikrobiologinių tyrimų laboratoriją, kur atlikti mikrobiologiniai tyrimai. VMKL Mikrobiologinių tyrimų laboratorijoje liekamoji medžiaga užkoduota ir atvežta į Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Mikrobiologijos skyrių. Gauti patogenai pakartotinai identifiukuoti, nustatytas jų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms, tirti atsparumą kai kurioms antimikrobinėms medžiagoms koduojantys genai.

Staphylococcus aureus išskyrimas ir identifikacija

VMKL Mikrobiologinių tyrimų laboratorijoje klinikinę medžiagą išsėta į chromogeninį STAPH AUREUS (*Oxoid*, Jungtinė Karalystė), chromogeninį MRSA (*Oxoid*, Jungtinė Karalystė) ar 5 % Kolumbijos avies kraujo (*Mast Diagnostica GmbH*, Vokietija) agarus. Bakterijos identifiukuotos masių spektrometrijos sistema VITEK MS (*BIOMERIEUX*, Prancūzija).

Liekamoji medžiaga Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Mikrobiologijos skyriuje išsėta į 5 % Kolumbijos avies kraujo (*Bio-Rad*, Prancūzija) bei manitolio druskos (*Liofilchem*, Italija) agarus. Pasėliai kultivuoti

16–20 val. 35±1 °C temperatūroje. Identifikuojant išskirtus mikroorganizmus remtasi augimo pobūdžiu mitybinėse terpėse, latekso agliutinacijos (*Bio-Rad*, Prancūzija), DNazės (*bioMerieux sa*, Prancūzija), plazmo-koagulazės (*Bio-Rad*, Prancūzija) testais ir mikroskopija. Mitybinių terpių ir diagnostinių testų kontrolei naudota *S. aureus* ATCC 29213.

Išskirtų padermių jautrumo antimikrobinėms medžiagoms įvertinimas

Išskirtų *S. aureus* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms vertintas taikant Europos antimikrobinio jautrumo tyrimo komiteto (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*, EUCAST) rekomendacijas [7]. Diskų difuzijos metodu, naudojant *Oxoid (Limited)*, Jungtinė Karalystė) diskus, nustatytas visų išskirtų padermių atsparumas cefoksitinui (30 g), rifampicinui (5 g), fuzidino rūgščiai (10 g), eritromicinui (15 g), klindamicinui (2 g), tetraciklinui (30 g), penicilinui (1 TV), ciprofloksacinui (5 g), norfloksacinui (10 g), gentamicinui (10 g). Atsparumas meticilinui nustatytas naudojant cefoksitino diską, atsparumo vankomicinui minimali slopinamoji koncentracija – taikant gradiento metodą (*AB Biodisk*, Solna, Švedija), indukuotas atsparumas klindamicinui – naudojant D-zonos testą [7]. Atsparumo rezultatų patikimumui patvirtinti naudota etaloninė *S. aureus* ATCC 29213 padermė.

Matricinės *S. aureus* DNR paruošimas

Trys keturios *S. aureus* kolonijos 24 val. kultivuotos triptozės sojos agarė (*Liofilchem*, Italija), idėtos į mėgintuvėlius su 500 l sterilaus dejonizuoto vandens. *S. aureus* suspensijos 10 min. inkubuotos 100 °C temperatūroje. Lizatai centrifuguoti 10 min. 10000 aps./min. greičiu. Atvėsinus kambario temperatūroje supernatantai perkelti į sterilius mėgintuvėlius ir iki tyrimo dienos saugoti -20 °C temperatūroje.

S. aureus atsparumą antimikrobinėms medžiagoms koduojančių genų nustatymas

S. aureus padermių, atsparių eritromicinui ar tetraciklinui, atsparumą koduojantys *ermA*, *ermC*, *tetK*, *tetM* genai nustatyti taikant dauginę polimerazės grandinės reakciją (PCR) ir

1 lentelė. Pradmenų sekos ir PCR produktų dydžiai
Table 1. Sequences of primers and PCR product sizes

Genas	T/A*	Pradmens seka (5' - 3')	Produkto dydis (bp)	Šaltinis
<i>ermA</i>	T	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A	190	[8]
	A	TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC		
<i>ermC</i>	T	AATCGTCAATTCTGTCATGT	299	[8]
	A	TAATCGTGGAATACGGGTTTG		
<i>tetK</i>	T	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT	360	[8]
	A	GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA		
<i>tetM</i>	T	AGT GGA GCG ATT ACA GAA	158	[8]
	A	CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA		

*T – tiesioginis, A – atvirkštinis, bp – bazių porų skaičius

naudojant pradmenų poras, pateiktas 1 lentelėje.

Dauginė PGR reakcija vykdyta 20 l tūrio mišinyje, sudarytame iš 1x *Taq* polimerazės buferio (*ThermoFisher Scientific*, Lietuva), 2,5 mM kiekvieno tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (*Metabion*, Vokietija), 0,2 mM kiekvieno dNTP (*ThermoFisher Scientific*, Lietuva), 2 mM MgCl₂, 1,25 U *Taq* polimerazės (*ThermoFisher Scientific*, Lietuva), 100–200 ng (1–2 l terminio lizato) DNR matricos. PGR reakcijos pradinė denatūracija vykdyta 95 °C 5 min., denatūracija – 95 °C 30 sek., pradmens prikibimas – 59 °C 30 sek., grandinės sintezė – 72 °C 1 min., galutinė sintezė – 72 °C 8 min., taikyta 34 ciklai. Reakcijos produktai vizualizuoti 2 % agarozės gelyje naudojant etidžio bromidą (0,5 g/ml). PGR reakcijos kontrolei naudotos detaliosi išanalizuotos *S. aureus* laboratorinės padermės.

Tyrimo duomenys analizuoti naudojant statistinio duomenų apdorojimo paketo SSPS (*Statistical Package for Social Sciences*) 23 versiją. Duomenų analizei naudoti standartiniai aprašomosios statistikos rodikliai: parametru aritmetinis vidurkis, standartinis nuokrypis, mediana, moda, minimali ir maksimali, procentinės reikšmės.

REZULTATAI

Per tiriamąjį laikotarpį buvo surinkta ir ištirta 364 Viliaus miesto klinikinėje ligoninėje iš klinikinės medžiagos išskirtos *S. aureus* padermės. 67,6 % (n = 246) *S. aureus* išskirta iš odos ir minkštųjų audinių (trofinių opų, pragulų, diabetinės pėdos, pooperacinių žaizdų, pūlinių), 12,9 % – iš kraujo, 14,3 % – apatinių kvėpavimo takų (skreplių, sekreto iš trachėjos), 3,0 % – iš šlapimo, 2,2 % – iš kitur (gimdos, pilvo ertmės, sąnario skysčio ir kt.).

Vyrams išskirta 51,4 % (n = 187) tiriamų *S. aureus* padermių, moterims – 48,6 % (n = 177). Bendras tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo 42,4 metų. Jauniausias tyrimo dalyvis buvo 18 metų, vyriausias – 92 metų. Tyrimo dalyvių, iš kurių tiriamosios medžiagos išskirtos ir į tyrimą įtrauktos *S. aureus* padermės, demografinis apibūdinimas pateikiamas 2 lentelėje.

Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Ištyrus 364 klinikinių *S. aureus* padermių atsparumą antimikrobinėms vaistams nustatyta, kad visos jos buvo jautrios rifampicinui ir vankomicinui. 22,3 % (n = 81) izoliatų buvo jautrūs

2 lentelė. Tyrimo dalyvių, iš kurių tiriamosios medžiagos išskirtos ir į tyrimą įtrauktos *S. aureus* padermės, demografinis apibūdinimas

Table 2. The study participants' demographic characteristics

Lytis	Abs. sk. (%)	Amžius				Standartinis nuokrypis
		Minimalus	Maksimalus	Vidurkis	Mediana	
Moterys	177 (48,6)	18	92	42,3	31	24,2
Vyrai	187 (51,4)	18	90	42,6	34	22,4
Iš viso	364 (100)	18	92	42,4	33	23,3

3 lentelė. Iš klinikinės medžiagos išskirtų *S. aureus* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Table 3. Antimicrobial resistance of *S. aureus* isolated from clinical material

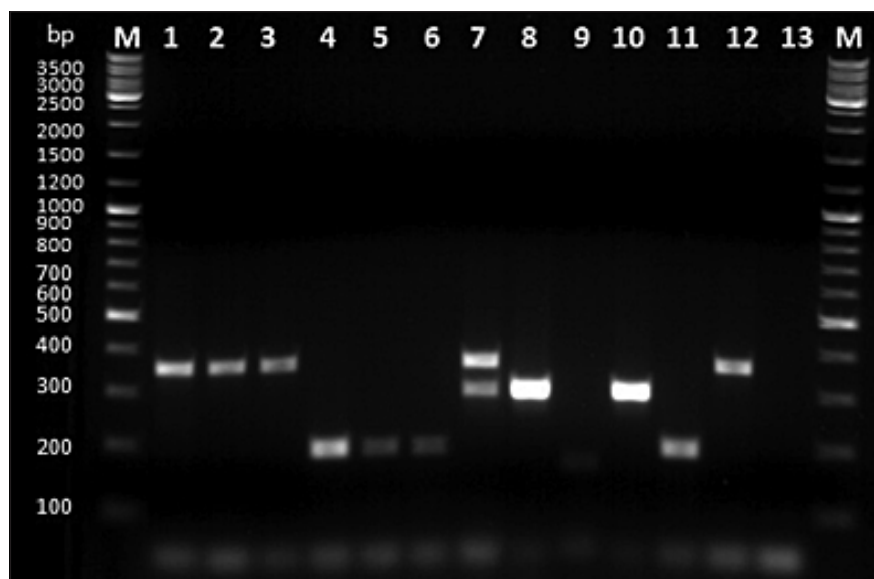
Antimikrobinė medžiaga	S. aureus padermės (n = 364)				MRSA atsparumas (n = 13)	
	Jautrios		Atsparios			
	n	%	n	%	n	%
Penicilinas	95	26,1	269	73,9	13	100
Eritromicinas	328	90,1	36	9,9	10	76,9
Tetraciklinas	341	93,7	23	6,3	3	23,1
Klindamicinas	345	94,8	19	5,2	5	38,5
Norfloksacinas	348	95,6	16	4,4	8	61,5
Ciprofloksacinas	349	95,9	15	4,1	8	61,5
Gentamicinas	349	95,9	15	4,1	0	0
Fuzidino rūgštis	350	96,2	14	3,8	1	7,7
Cefoksitinas	351	96,4	13	3,6	13	100
Rifampicinas	364	100	0	0	0	0
Vankomicinas	364	100	0	0	0	0

visoms tirtoms antimikrobinėms medžiagoms.

Tyrimo duomenimis, didžiausias atsparumas buvo penicilinui ir siekė 73,9 % (n = 269). Išskirtų *S. aureus* padermių atsparumas eritromicinui ir

tetraciklinui buvo atitinkamai 9,9 % ir 6,3 %. Mažiau kaip 4 % tirtų *S. aureus* atsparūs fuzidino rūgščiai (3,8 %) ir cefoksitinui (3,6 %) (3 lentelė).

5,2 % *S. aureus* buvo atsparūs klindamicinui. Iš 19 klindamicinui atspa-



Pav. Dauginės PGR metodu nustatytų *ermA*, *ermC*, *tetK* ir *tetM* genų *S. aureus* padermėse vaizdas, matomas po elektroforezės 2 % agarozės gelyje bp – bazių porų skaičius, M – molekulinis žymuo. Takelio nr.: 1–3 – nustatytas *tetK* genas, 4–6 – nustatytas *ermA* genas, 7 – nustatyti *tetK* ir *ermC* genai, 8 – nustatytas *ermC* genas, 9 – teigiama *tetM* kontrolė, 10 – teigiama *ermC* kontrolė, 11 – teigiama *ermA* kontrolė, 12 – teigiama *tetK* kontrolė, 13 – neigiama kontrolė

Fig. Image of the *ermA*, *ermC*, *tetK* and *tetM* genes in 2% agarose gel as a result of the multiplex PCR test

4 lentelė. *S. aureus* padermių dauginio atsparumo apibūdinimas
Table 4. Characterization of multiple resistance of *S. aureus* strains

Dauginių atsparumų pasižymintios tirtos <i>S. aureus</i> padermės (n = 38)			
Antimikrobinų medžiagų, kurioms atsparios tirtos <i>S. aureus</i> padermės, skaičius	<i>S. aureus</i> padermių, turinčių nurodytą dauginį atsparumą, skaičius (%)	Antimikrobinų medžiagų, kurioms atsparūs <i>S. aureus</i> , deriniai	Nustatytų <i>S. aureus</i> padermių skaičius su nurodytu dauginiu atsparumu
3	14 (36,8 %)	CD-E-P NOR-P-CIP FR-P-TE E-P-GN NOR-CIP-GN	4 2 1 6 1
4	13 (34,2 %)	CD-E-P-TE NOR-P-CIP-TE CD-E-FR-P E-FR-P-GN FOX-FR-P-TE NOR-P-CIP-GN CD-E-P-GN FOX-CD-E-P	2 2 1 3 1 1 1 2
5	9 (23,7 %)	CD-E-NOR-P-CIP CD-E-FR-P-TE FOX-NOR-P-CIP-TE FOX-E-NOR-P-CIP FOX-CD-E-P-TE	1 1 1 5 1
6	2 (5,3 %)	FOX-CD-E-NOR-P-CIP	2
Iš viso:	38 (100 %)		

Antimikrobinų medžiagų santrumpos: P – penicilinas, E – eritromicinas, TE – tetraciklinas, CD – klindamicinas, NOR – norfloksacinai, CIP – ciprofloksacinai, GN – gentamicinas, FR – fuzidino rūgštis, FOX – cefoksitinas.

rių *S. aureus* padermių 15 (78,9 %) jų nustatytas indukuotas atsparumas šiai antimikrobinei medžiagai.

Tiriant turimų *S. aureus* padermių atsparumą meticilinui naudojant cefoksitino diską nustatyta, kad 13 (3,6 %) jų yra MRSA, kurie taip pat atsparūs penicilinui (100 %), 10 (76,9 %) – eritromicinui, po 8 (61,5 %) – norfloksacinui, ciprofloksacinui bei 5 ir 3 (atitinkamai 38,5 % ir 23,1 %) – klindamicinui ir tetraciklinui. Keturios (30,8 %) MRSA padermės išskirtos iš kraujo, aštuonios (61,5 %) – iš odos ir minkštųjų audinių paimtų mėginių, viena (7,7 %) – iš apatinių kvėpavimo takų mėginio.

Iš tirtų *S. aureus* 10,4 % (n = 38) turėjo dauginį atsparumą (buvo atsparūs trimis ir daugiau) tirtoms antimikrobinėms medžiagoms; 7,4 % (n = 27 iš 364) tirtų *S. aureus* padermių atsparios trimis keturioms tirtoms antimikrobinėms medžiagoms, 3,0 % (n = 11) – penkioms šešioms (4 lentelė).

Atsparumą tetraciklinui ir eritromicinui koduojančių genų paplitimas *S. aureus* padermėse

Remiantis gautais *S. aureus* padermių atsparumo antimikrobinėms medžiagoms duomenimis, 23 (6,3 %) padermės buvo atsparios tetraciklinui. 87 % šių padermių dauginės polimerazės grandinės reakcijos būdu nustatytas

tetK genas, 8,7 % – abu *tetK* ir *tetM* genai, vienai *S. aureus* padermei *tet* genas neaptiktas.

36 (9,9 %) *S. aureus* padermės buvo atsparios eritromicinui. Tiriant atsparumą šiai antimikrobinei medžiagai koduojančių genų paplitimą nagrinėtoje padermėse dažniausiai nustatytas *ermC* genas (72,2 %, n = 26), 19,5 % – *ermA* genas. Trims (8,3 %) eritromicinui atsparioms padermėms *erm* genas nenustatytas. Nustatytų genų vaizdas, matomas po elektroforezės, vaizduojamas paveiksle.

DISKUSIJA

Antimikrobiniai vaistai – vienas didžiausių praėjusio šimtmečio medicinos laimėjimų. Šie vaistai sumažina pooperacinių žaizdų infekcijų dažnį, pagerina infekcinių ligų baigtį. Tačiau pastaruoju metu dėl didėjančio bakterijų atsparumo antimikrobiniais vaistams nuogastaujama, kad nesimant jokių priemonių galima sulaukti antibiotikų eros pabaigos. Atsparių antimikrobiniais vaistams bakterijų sukeltos infekcijos didina sergamumą, gydymo išlaidas, ilgina hospitalizacijos laiką ir mirštamumą [8]. Higienos instituto duomenimis, Lietuvoje *S. aureus* 2018 m. nulėmė 10,3 %, o MRSA – 2,5 % visų hospitalinių infekcijų [9]. *S. aureus* išlieka svarbiu infekcijų sukėlėju, galinčiu užkrėsti bet kuriuos žmogaus organizmo audinius

ir sukelti nuo lengvų iki sunkių ar net mirtinų ligų [10]. Mūsų atliktas tyrimas parodė, kad *S. aureus* padermės dažniausiai išskiriamos iš odos ir minkštųjų audinių mėginių (67,6 %). Palyginus rezultatus su Vokietijos mokslininkų duomenimis pastebėta, kad iš kraujo išskiriamas panašus kiekis *S. aureus* padermių (9 % ir 12,9 %), tačiau Vokietijoje *S. aureus* dažniau išskiriamas iš šlapimo (15 % ir 3,0 %) [11]. Hospitalinių *S. aureus* padermių plitimas siejamas su padidėjusiu chirurginių procedūrų skaičiumi, invazinių prietaisų naudojimu, dažnėjančiomis imunosupresijos būklėmis dėl transplantacijų, vėžio gydymo ar ŽIV infekcijų [12].

Atlikto tyrimo rezultatai atskleidė, kad *S. aureus* padermių atsparumas antimikrobinėms medžiagoms išlieka aktualia medicina problema. Iš Vilniaus miesto klinikinės ligoninės 2017 m. kovo–2018 m. balandžio mėn. sukauptos 364 *S. aureus* kultūros. Nustatyta, kad 73,9 % padermių buvo atsparios penicilinui. 1941 m. penicilinas pradėtas naudoti *S. aureus* sukeltų infekcijų gydymui, tačiau jau po ketverių metų nustatytas jo selekcinis poveikis šioms bakterijoms [13]. Literatūros duomenimis, 1940–1970 m. ligoninėje cirkuliuojančių *S. aureus* atsparumas penicilinui siekė 90–95 % [11]. Klinikinių *S. aureus* padermių atsparumo penicilinui rodikliai įvairiose šalyse 2007–2017 m. atliktuose tyrimuose svyruoja ir siekia

63,3–91 % [1, 14–16]. M. H. Aldman ir kt. [17], ištyrę 140 iš kraujo ir 141 iš žaizdų išskirtą *S. aureus* padermę, nustatė, kad atitinkamai 71 % ir 79 % jų buvo atsparūs penicilinui. Jungtinėse Amerikos Valstijose [18] ištyrus 105 iš kraujo išskirtų *S. aureus* padermių atsparumą penicilinui nustatyta, kad 72 % jų yra atsparios šiai antimikrobinei medžiagai. Švedijos mokslininkų duomenimis, penicilinui atsparios 68,9 % padermių [14], o Suomijos mokslininkai pastebėjo atsparumo penicilinui mažėjimo tendencijas (nuo 76,1 % 2008 m. iki 56,9 % 2015 m.) [19]. Taigi, *S. aureus* atsparumas šiai antimikrobinei medžiagai mažėja ir vis dažniau literatūroje galima aptikti mokslininkų minčių vartoti peniciliną penicilinui jautrioms *S. aureus* sukeltoms infekcijoms gydyti [16, 18].

Išnagrinėjus šio tyrimo rezultatus nustatyta, kad *S. aureus* padermių atsparumas pastebimas ir kitoms antimikrobinėms medžiagoms – cefoksitinui, eritromicinui, fuzidino rūgščiai, norfloksacinui, ciprofloksacinui, tetraciklinui ir gentamicinui. Makrolidų ir tetraciklinų klasėms priklausančios antimikrobinės medžiagos vis dar išlieka svarbios *S. aureus* sukeltoms infekcijoms gydyti. Iš tirtų 364 *S. aureus* padermių 6,3 % buvo atsparios tetraciklinui. Įvairiose šalyse atsparumas tetraciklinui skiriasi. Lenkijoje [20] 10,7 %, Vokietijoje [15] 13,9 % *S. aureus* atsparūs šiai antimikrobinei medžiagai. Izraelyje [1] atliktame stebimajame tyrime nustatyta, kad 1988–1994 m., 1998–2004 m. ir 2005–2010 m. atsparumas tetraciklinui mažėjo (atitinkamai 41,2 %, 16,9 % ir 7,3 %).

Mūsų atlikto tyrimo duomenimis, tirtų *S. aureus* atsparumas eritromicinui siekė 9,9 %. Atsparumas šiam makrolidui visame pasaulyje labai padidėjęs. Estijos mokslininkų [21] teigimu, 25,3 % *S. aureus* yra atsparūs eritromicinui, D. Romaniszyn ir kt. [22], atlikę tyrimą Lenkijoje, nustatė 32,6 %, P. E. Akpaka ir kt. [15] Vokietijoje – 40,1 % *S. aureus* padermių, atsparių šiai antimikrobinei medžiagai. Šie skirtumai parodo, kaip svarbu skatinti racionalų regioninį antimikrobinių vaistų vartojimą ir kad net kaimyninėse šalyse reikšmingai skiriasi jautrumas antimikrobinėms medžiagoms, todėl reikia stebėti skirtingų regionų jautrumą antimikrobinėms vaistams.

S. aureus yra antras pagal dažnį invazinių infekcijų sukėlėjas Lietuvoje [23]. *S. aureus* reikšmingas bakteremiją sukeliantis mikroorganizmas ne tik Lietuvoje, bet ir visame pasaulyje [1, 24, 25]. Daugiausia nerimo kelia meticilinui atsparių *S. aureus* sukeltos bakteremijos. Mes nustatėme 3,6 % meticilinui atsparių *S. aureus*. 12,9 % ($n = 47$) tirtų *S. aureus* buvo išskirta iš kraujo, iš jų 8,5 % – MRSA. Europos antimikrobinio atsparumo stebėsenos tinklo 2017 m. duomenimis, išskiriamų iš kraujo MRSA dalis į šį tinklą įtrauktose šalyse svyruoja nuo 1 % Norvegijoje iki 44,4 % Rumunijoje [4]. Lietuva, kaip ir Latvija, Vokietija, Jungtinė Karalystė, Austrija, Belgija, Liuksemburgas, Slovėnija, priklauso grupei, kurioje iš kraujo išskiriamų MRSA dalis sudaro 5–10 %. 2017 m. EARSS tinklui pateiktais duomenimis, Lietuvoje iš kraujo išskiriamų MRSA dalis sudarė 8,8 % [4]. Tai atspindi ir mūsų atlikto tyrimo rezultatai. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad MRSA sukeltos kraujo infekcijos pasižymi blogesne prognoze – mirtingumas siekia net 26,8 % [26].

Mes nustatėme, kad visos tirtos *S. aureus* padermės jautrios rifampicinui. Rifampicinas, kaip pirmo pasirinkimo antimikrobinis vaistas, vartojamas tuberkuliozei gydyti, o kartu su kitais antimikrobiniais vaistais gali būti skiriamas protezų infekcijoms, bakteremijai bei kitoms MRSA sukeltoms infekcijoms gydyti [27, 28]. Įvairiose pasaulio šalyse pastebimas nevienodas atsparumas rifampicinui, pavyzdžiui, Vokietijoje [15] atliktas tyrimas parodė, kad 5,5 % (20/309) *S. aureus* atsparūs šiai antimikrobinei medžiagai, Italijoje – 0,6 % [29], Graikijoje – 2,7 % [30].

Vankomicinas sėkmingai vartojamas MRSA sukeltoms infekcijoms gydyti, todėl atsparumo vankomicinui atsiradimas yra grėsmingas reiškinys [31]. Pirmasis vankomicinui vidutiniškai atsparus *S. aureus* išskirtas 1997 m. Japonijoje [32], dabar registruojami tik pavieniai vankomicinui atsparių ar vidutiniškai atsparių *S. aureus* atvejai [4]. Jungtinėse Amerikos Valstijose pirmasis vankomicinui atsparus *S. aureus* (angl. *Vancomycin resistant S. aureus*, VRSA) išskirtas 2002 m., o iki 2015 m. iš viso užregistruota 14 VRSA [33]. Visos mūsų tirtos 364 *S. aureus* padermės (iš jų ir

13 MRSA) buvo jautrios šiam glikopeptidui. M. Pomorska-Wesołowska ir kt. [34] Lenkijoje atliktame tyrime taip pat nenustatė *S. aureus* atsparumo vankomicinui. VRSA yra reta, dauginio atsparumo *S. aureus* padermė, atsirandanti atsparumą vankomicinui koduojantiems genams iš vankomicinui atsparių enterokokų patekus į MRSA [33].

Mes išsiaiškinome, kad tarp tetraciklinui atsparių *S. aureus* padermių dominavo *tetK* geno lemiamas atsparumo mechanizmas. F. J. Schmitz ir kt. [35] 2001 metais atliktame tyrime nustatė, kad Europoje atsparumą tetraciklinui dažniausiai kodavo *tetM* genas. Tačiau tyrimai, atlikti 2006 m. Rytų (Estija, Latvija, Lenkija, Rusija, Ukraina ir kt.) ir Vakarų (Belgija, Vokietija, Austrija, Ispanija ir kt.) Europoje bei Šiaurės Afrikoje, atskleidžia, kad tarp tetraciklinui atsparių MRSA ir meticilinui jautrių *S. aureus* padermių dažiau paplitęs *tetK* genas [36].

ermC ir *ermA* atsparumą eritromicinui koduojantys genai nustatyti atitinkamai 72,2 % ir 19,5 % šiam makrolidui atsparių padermių. Danijoje, Tunise atlikti tyrimai rodo, kad atsparumą eritromicinui ir klindamicinui dažniau kodavo *ermA* ir *ermB* genai [37]. Mūsų atlikto tyrimo rezultatai siejasi su tyrimų duomenimis, gautais Ispanijoje [38] ir Serbijoje [39], kur atsparumą eritromicinui dažniau kodavo *ermC* genas. Antimikrobinį atsparumą koduojantys genai palengvina atsparių *S. aureus* padermių selekciją ir jų plitimą bei padidina šių padermių patogeniškumą ir gebėjimą sukelti invazines infekcijas [40, 41].

IŠVADOS

Nustatytas didelis iš klinikinės medžiagos išskirtų *S. aureus* padermių atsparumas penicilinui. Visos išskirtos *S. aureus* padermės buvo jautrios rifampicinui ir vankomicinui. 3,6 % tirtų *S. aureus* padermių atsparios meticilinui. Didžiausia meticilinui atsparių padermių dalis išskirta iš odos ir minkštųjų audinių. Tarp tetraciklinui atsparių padermių dominavo *tetK*, tarp eritromicinui atsparių – *ermC* genai. ♦

Gauta: 2021 05 28
Priimta spaudai: 2021 06 29

Summary

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Agnė Kirkliauskienė, Lina Kaplerienė, Vida Strumskienė, Jolanta Miciulevičienė, Narimantas Markevičius, Rafal Sinkevič

The aim. To determine the resistance to antimicrobials of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples and to identify prevailing resistance genes.

Material and methods. The study in Vilnius Clinical Hospital was carried out from March 2017 to April 2018. *S. aureus* strains were isolated from clinical specimens. Antibiotic susceptibility testing was performed according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility guidelines. *S. aureus* strains resistant to tetracycline and

erythromycin had a multiplex PCR performed to detect resistance genes.

Results. 364 *S. aureus* strains isolated from clinical specimens were analyzed. 67.6% strains were isolated from the skin and soft tissues, 12.9% – from blood, 14.3% – from the lower respiratory tract, etc. All 364 isolates were found to be susceptible to rifampicin and vancomycin. 22.3% of the isolated strains were susceptible to all tested antimicrobials. Antimicrobial resistance testing revealed that the highest resistance was to penicillin (73.9%). Resistance to erythromycin and

tetracycline was 9.9% and 6.3%, respectively. Less than 4% *S. aureus* strains tested were resistant to fusidic acid and cefoxitin. four of methicillin resistant strains were isolated from the blood, eight – from skin and soft tissues. 87% of tetracycline resistant *S. aureus* strains harbored *tetK* gene, *ermC* gene was detected in 72.2%, *ermA* – in 19.5% of erythromycin resistant *S. aureus* strains.

Conclusions. *S. aureus* resistance rate to antimicrobials was the highest to penicillin. All tested strains were susceptible to rifampicin and vancomycin. 3.6% of the strains were methicillin-resistant *S. aureus*. *tetK* gene was predominant among *S. aureus* strains resistant to tetracycline and *ermC* gene was predominant among erythromycin resistant strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, resistance to antimicrobials, resistance genes.

LITERATŪRA

- Yahav D, Shaked H, Goldberg E, Yassin S, Raz NE, Paul M, et al. Time trends in *Staphylococcus aureus* bacteremia, 1988–2010, in a tertiary center with high methicillin resistance rates. *Infection* 2017; 45(1): 51–7.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(3): 603–61.
- Sharon J, Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ann Rev Biochem* 2015; 84: 577–601.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Prieiga per internetą: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf> [žiūrėta 2021-01-06].
- Vuong C, Yeh AJ, Cheung GYC, Otto M. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25(1): 73–93.
- Yahav D, Yassin S, Shaked H, Goldberg E, Bishara J, Paul M, et al. Risk factors for long-term mortality of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 785–90.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Internetinė prieiga: <http://www.eucast.org> [žiūrėta 2021-02-20].
- Souverein D, Houtman P, Euser SM, Herpers BL, Kluytmans J, Den Boer JW. Costs and benefits associated with the MRSA search and destroy policy in a hospital in the Region Kennemerland, The Netherlands. *PloS One* 2016; 11(2): e0148175.
- Higienos institutas. Hospitalinių infekcijų epidemiologinės priežiūros duomenų ataskaitos. Internetinė prieiga: <http://www.hi.lt/uploads/pdf/hospitalines/duomenys%20ataskaitos/RITS%202018%20v2.pdf> [žiūrėta 2021-01-10].
- Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR. An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infect Dis* 2017; 10: 1179916117703999.
- Walter J, Noll I, Feig M, Weiss B, Claus H, Werner G, et al. Decline in the proportion of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from non-invasive samples and in outpatient settings, and changes in the co-resistance profiles: an analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Germany 2010 to 2015. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1): 169.
- Naber CK. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin Infect Dis* 2009; 48(Suppl 4): S231–7.
- Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Royal Soc Exper Biol Med* 1942; 51: 386–9.
- Resman F, Thegerstro J, Mansson F, Ahl J, Tham J, Riesbeck K. The prevalence, population structure and screening test specificity of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Malmö, Sweden. *J Infect* 2016; 73(2): 129–35.
- Akpaka PE, Roberts R, Monecke S. Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. *J Infect Public Health* 2017; 10(3): 316–23.
- Cheng MP, Rene P, Cheng AP. Back to the future: penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Am J Med* 2016; 129(12): 1331–3.
- Hagstrand Aldman M, Skovby A, I Pålman L. Penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. *Infect Dis* 2017; 49(6): 454–60.
- Davido B, Lawrence C, Dinh A, Bouchand F. Back to the future with the use of penicillin in penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (PSSA) bacteremia. *Am J Med* 2018; 131(4): e155.
- Jokinen E, Laine J, Huttunen R, Lyytikäinen O, Vuento R, Vuopio J, et al. Trends in incidence and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Dis Lond Engl* 2018; 50(1): 52–8.
- Kot B, Wierchowska K, Piechota M, Gruzewska A. Antimicrobial resistance patterns in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients hospitalized during 2015–2017 in hospitals in Poland. *Med Princ Pract* 2020; 29: 61–8.
- Karki T, Truusalu K, Vainumae I, Mikelsaar M. Antibiotic susceptibility patterns of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Estonia. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(5): 333–8.
- Romaniszyn D, Różańska A, Wójkowska-Mach J, Chmielarczyk A, Pobiega M, Adamski P, et al. Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* infections – data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009–2012. *BMC Infect Dis* 2015; 15(1): 169.

23. Miciulevičienė J. Antimikrobinio atsparumo situacija Lietuvoje, 2017. Internetinė prieiga: http://www.hi.lt/uploads/news/id1253/AMR_LIETUVA_2016_Miciuleviciene.pdf [žiūrėta 2021-03-05].
24. Holland TL, Arnold C, Fowler VG Jr. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA* 2014; 312: 1330–41.
25. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 362–86.
26. Jokinen E, Laine J, Huttunen R, Rahikka P, Huhtala H, Vuento R, et al. Comparison of outcome and clinical characteristics of bacteremia caused by methicillin-resistant, penicillin-resistant and penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Dis Lond Engl* 2017; 49(7): 493–500.
27. Yan Q, Karau MJ, Raval YS, Patel R. Evaluation of oritavancin combinations with rifampin, gentamicin, or linezolid against prosthetic joint infection-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms by time-kill assays. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(10): e00943-18.
28. Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Re* 2010; 23(1): 14–34.
29. Campanile F, Bongiorno D, Perez M, Mongelli G, Sessa L, Benvenuto S, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Italy: first nationwide survey, 2012. *J Glob Antimicrob Resist* 2015; 3(4): 247–54.
30. Souli M, Karaikos I, Galani L, Maraki S, Perivolioti E, Argyropoulou A, et al. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals, 2012–2013. *Infect Dis* 2016; 48(4): 287–92.
31. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 2017; 90(2): 269–81.
32. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350(9092): 1670–3.
33. Walters MS, Eggers P, Albrecht V, Travis T, Lonsway D, Hovan G, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-Delaware, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64(37): 1056.
34. Pomorska-Wesolowska M, Rozanska A, Natkaniec J, Gryglewska B, Szczypa A, Dzikowska M, et al. Longevity and gender as the risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in southern Poland. *BMC Geriatr* 2017; 17(1): 1–7.
35. Schmitz FJ, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 239–40.
36. Jones CH, Tuckman M, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, et al. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 505–10.
37. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 2011; 4: 453.
38. Benito D, Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Vazquez MA, Ceballos S, et al. Characterization of tetracycline and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital: is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398? *Int J Med Microbiol IJMM* 2014; 304(8): 1226–32.
39. Aleksandra AD, Misic MS, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol* 2014; 32(1): 49–52.
40. Kadlec K, Fessler AT, Hauschild T, Schwarz S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(8): 745–55.
41. Rasmussen G, Monecke S, Ehrlich R, Soderquist B. Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden. *PLoS One* 2013; 8(10): e77477.