

STRESZCZENIE

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* stanowią jedną z ważniejszych grup drobnoustrojów odgrywających istotną rolę w patologii zakażeń u ludzi. Niektóre z gatunków są często odpowiedzialne za infekcje o różnym przebiegu klinicznym, od łagodnych do ciężkich ogólnoustrojowych zakażeń zagrażających życiu, zarówno u pacjentów leczonych w warunkach szpitalnych, jak i pacjentów pozaszpitalnych.

Celem pracy była ocena występowania wybranych genów warunkujących oporność na antybiotyki z grupy makrolidów, linkozamidów, streptogramin grupy B oraz pleuromutylin.

Materiał do badań i dalszych analiz stanowiły szczepy bakteryjne należące do rodzaju *Staphylococcus*. Wykorzystano przedstawicieli trzech gatunków *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. hominis* z uwzględnieniem podziału na grupy na podstawie obecności lub braku mechanizmu metycylinooporności (metycylinooporne: *S. aureus* – MRSA, *S. epidermidis* – MRSE, *S. hominis* – MRSH; metycylinowrażliwe: *S. aureus* – MSSA, *S. epidermidis* – MSSE, *S. hominis* – MSSH). Szczepy pierwotnie zidentyfikowano przy użyciu metod biochemicznych i cech hodowlanych, ich przynależność gatunkową potwierdzono przy użyciu techniki multiplexPCR oznaczając obecność odpowiednich genów (*Staphylococcus* – gen *16SrRNA*, *S. aureus* – gen *nuc*, *S. epidermidis* – gen *rdr*, *S. hominis* – gen *nuc*) stosując odpowiednie zestawy swoistych starterów. Produkty reakcji analizowano z zastosowaniem techniki elektroforezy poziomej na 1,5% żelu agarozowym, a następnie archiwizowano przy użyciu systemu dokumentacji żeli ChemiDoc XRS.

Mechanizm metycylinooporności oznaczano metodą fenotypową przy użyciu krążka z cefoksytyną na podłożu Mueller-Hintona, a wyniki interpretowano zgodnie z kryteriami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości Drobnoustrojów (EUCAST). Wykorzystano także metodę biologii molekularnej PCR z zastosowaniem swoistych starterów w celu wykrycia genu *mecA* oraz *mecC* stanowiących podstawę tego mechanizmu oporności. Fragmenty zamplifikowanych genów podobnie rozdzielano w technice elektroforezy poziomej.

Fenotypy oporności *Staphylococcus* na makrolidy, linkozamidy oraz streptograminy grupy B były oznaczane przy użyciu metody dyfuzyjno-krążkowej z zastosowaniem krążków z erytromycyną i klindamycyną zgodnie z rekomendacjami EUCAST. W interpretacji wyników wykorzystywano aktualnie obowiązujące kryteria i cechy poszczególnych wariantów, które pozwoliły określić fenotypy konstytutywne K_R i

K_{HD}, fenotypy indukcyjne I_D i I_{D+} oraz fenotyp MS_B i L. Do określenia genotypów szczepów *Staphylococcus*, związanych z opornością na antybiotyki należące do grupy makrolidów, linkozamidów oraz streptogramin grupy B wytypowano następujące geny: *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *mef*(A), *msr*(A), *msr*(D) oraz *cfr*. Przeprowadzono klasyczną reakcję PCR lub multiplexPCR wykorzystując odpowiednie sekwencje starterów. Produkty reakcji analizowano z zastosowaniem techniki elektroforezy poziomej na 1,5% żelu agarozowym, a następnie archiwizowano przy użyciu systemu dokumentacji żeli ChemiDoc XRS.

Kliniczną ocenę lekowrażliwości szczepów *Staphylococcus* dokonano w oparciu o badanie wykonane przy użyciu kart GP oraz automatycznego systemu Vitek 2 (bioMerieux), które przeprowadzono zgodnie z instrukcją i zaleceniami producenta. W analizie uwzględniono następujące antybiotyki: cefoksytyna, penicylina, tetracyklina, gentamycyna, erytromycyna, klindamycyna, ciprofloksacyna, moksyflokscyna, wankomycyna, teikoplanina, liznezzolid, tygecyklina, trimetoprim/sulfametoksazol, fosfomycyna oraz kwas fusydowy.

Oceniono aktywność wybranych antybiotyków z grupy makrolidów i pochodnych (erytromycyna, klarytromycyna, azytromycyna), linkozamidów (klindamycyna), streptogramin grupy B (chinupristyna/dalfopristyna), pleuromutylin (tiamulina) oraz glikopeptydów (wankomycyna) wobec szczepów *Staphylococcus* w oparciu o wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC, ang. *minimal inhibitory concentration*) przy użyciu metody dyfuzyjnej z zastosowaniem pasków z gradientem stężeń antybiotyków. Uzyskane wyniki interpretowano w oparciu o aktualnie obowiązujące kryteria zalecane przez EUCAST.

W analizie statystycznej wykorzystano nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób. Zastosowano także test Chi-kwadrat niezależności. Wyniki istotne statystycznie uznano na poziomie $p < 0,05$. Zastosowano pakiet Statistica 13 firmy StatSoft.

W grupie *S. aureus* u prawie połowy szczepów nie wykazywano żadnego fenotypu oporności MLS_B. Fenotyp konstytutywny K_R odnotowano u 21,31% szczepów, K_{HD} u 18,03% szczepów, fenotyp indukcyjny I_D u 3,28%, a I_{D+} u 6,56%, a fenotyp L u 1,64%. Żaden z nich nie wykazywał oporności typu MS_B. Szczepy MRSA posiadały oporność MLS_B tylko w wariacie konstytutywnym – 40,00% typ K_R i 36,67% typ K_{HD}. U MSSA najczęściej występował fenotyp I_{D+} (12,91% szczepów), ale u prawie 75% nie wykazywano oporności związanej z antybiotykami MLS_B. Spośród *S. epidermidis* dominującym wzorem oporności był fenotyp konstytutywny MLS_B typu K_R (27,45%) oraz

fenotyp MS_B (19,61%). Oba warianty fenotypów indukcyjnych I_D oraz I_{D+} stwierdzono odpowiednio z częstością 5,88% i 7,84%, a fenotyp L z częstością 3,92%. W grupie MRSE najczęstszym był wariant K_R 45,17%, a w grupie MSSE typ MS_B 40,00%. Najliczniej występującym wzorem oporności u *S. hominis* okazał się być I_{D+} (45,83%), a następnie K_R (12,50%). Fenotyp I_D oraz MS_B występował u takiej samej liczby szczepów, co odpowiadało po 4,17% wszystkich izolatów. W grupie MRSH dominowała oporność typu I_{D+} (66,66%), zaś w grupie MSSH odnotowano obecność tylko jednego wzoru oporności u 11,11% szczepów, tj. I_{D+}.

Częstość występowania genów u MLS_B-dodatnich szczepów *S. aureus* wynosiła: gen *erm*(A) u 32,26% szczepów, *erm*(B) u 61,29% szczepów i *erm*(C) u 3,23%. U MRSA stwierdzono obecność genu *erm*(A) u 26,09% szczepów i *erm*(B) u 73,91% szczepów. Determinanta *erm*(B) była powiązana zarówno z fenotypem K_R, jak i K_{HD}, a determinanta *erm*(A) tylko z fenotypem K_R. U 8 fenotypowo-dodatnich MSSA gen *erm*(A) był obecny u 1 z 2 szczepów I_D, u 3 z 4 I_{D+}, gen *erm*(B) był obecny u dwóch szczepów (pojedyncze I_{D+} i K_R) oraz gen *erm*(C) u jednego szczepu. Sumarycznie częstość występowania genów u *S. epidermidis* przedstawiała się następująco: *msr*(D) – 84,85%, *erm*(C) – 51,52%, *msr*(A) – 33,33%, *erm*(A) – 30,30% oraz *erm*(B) – 9,09% szczepów. U MRSE najczęstszym genem okazał się być gen *msr*(D) (81,82% szczepów) oraz *erm*(C) (59,09%) i w dalszej kolejności *erm*(A) (40,91%). Gen *msr*(D) występował u wszystkich szczepów z indukcyjnymi fenotypami MLS_B. U MSSE najczęściej występującym genem był *msr*(D), którego stwierdzano u 90,91% szczepów z fenotypem oporności na antybiotyki MLS_B. Przeważającym genem w grupie szczepów MRSH był *erm*(C), który wystąpił u wszystkich wytypowanych szczepów z obecnym fenotypem oporności MLS_B (1 I_D, 10 I_{D+}, 3 K_R i 1 MS_B). Pojedynczy szczep MSSH z fenotypem oporności I_{D+} posiadał tylko gen *erm*(C). Podsumowując, u badanych szczepów *Staphylococcus*, stwierdzono, że gen *erm*(C) występował u 42,50% szczepów, a w dalszej kolejności *msr*(D) (36,25%), *erm*(B) (27,50%), *erm*(A) (25,00%) oraz *msr*(A) (15,00%). Najczęstszym w grupie MRS był gen *erm*(C) (46,67% szczepów), a w grupie MSS gen *msr*(D) (50,00% szczepów). U żadnego ze szczepów *Staphylococcus* nie wykryto genów *mef*(A) i *cfr*.