

Michał Karyński¹, Jolanta Krzysztoń-Russjan², Paweł Grzesiowski³

Zmiany w epidemiologii inwazyjnych klonów MRSA w wybranych szpitalach w Polsce

Changes in epidemiology of invasive MRSA clones in selected Polish hospitals

¹ Z Samodzielnej Pracowni Profilaktyki Zakażeń i Zakażeń Szpitalnych Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

² Z Zakładu Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

³ Z Instytutu Profilaktyki Zakażeń w Warszawie

STRESZCZENIE

Wstęp: *Staphylococcus aureus* jest patogenem, który może wywoływać szerokie spektrum chorób od względnie łagodnych zakażeń skóry do zagrażających życiu chorób układowych. Badanie przeprowadzono w celu oceny klonalności metycyloopornych izolatów *S. aureus* (MRSA) w wybranych polskich szpitalach.

Materiał i metoda: Kolekcja szczepów składała się ze 183 metycyloopornych izolatów *S. aureus* (MRSA) i 4 metycylinowrażliwych izolatów *S. aureus* (MSSA) z lat 2002-2005. Izolaty pochodziły z 29 szpitali. Oczyszczony całkowity DNA z izolatów był użyty w amplifikacji regionu X genu *spa*. Następnie, sekwencjonowano amplikony i określano typy *spa*.

Wyniki: W wyniku przeprowadzonej analizy izolatów wykazano istnienie 30 typów *spa*. Dwoma najczęściej występującymi typami izolowanymi w ciągu okresu badania były t037 i t052. Typy te należały, odpowiednio, do tzw. klonów brazylijsko-węgierskiego i iberyjskiego. W okresie 4 lat obserwacji stwierdzono zanik typu *spa* t052 (z 43% w 2002 do 0% w 2005). Równolegle z zanikiem typu *spa* t052, odsetek typu *spa* t037 zwiększył się z 26% w 2002 do 47% w 2005.

Wnioski: Zmiany w częstości występowania izolatów t052 i t037 wskazują, że klon iberyjski, wykazujący w większości wrażliwość na ko-trimoksazol, został wyparty przez klon brazylijsko-węgierski wykazujący w większości oporność na ko-trimoksazol. Zmiany w strukturze populacji MRSA w szpitalach wytypowanych do badania obrazują dynamiczne zmiany w epidemiologii klonów, najprawdopodobniej

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a pathogen that can cause a wide spectrum of diseases from relatively mild skin infections to life-threatening systemic disease. The study was conducted to assess the clonality of methicillin-resistant isolates of *S. aureus* (MRSA) in selected Polish hospitals.

Material and Methods: A collection of strains consisted of 183 methicillin-resistant isolates of *S. aureus* (MRSA) and 4 methicillin susceptible isolates of *S. aureus* (MSSA) from 2002-2005. Isolates came from 29 hospitals. Purified total DNA of isolates was used to amplify the region X of the gene *spa*. Subsequently, the amplicons were sequenced and *spa* types determined.

Results: The analysis of isolates demonstrated the existence of 30 types of *spa*. The two most common types isolated during the study period were t037 and t052. These types belonged, respectively, to the so-called Brazilian-Hungarian and Iberian clones. During 4 years of observation period, the loss of *spa* type t052 was observed (from 43% in 2002 to 0% in 2005). In parallel with the disappearance of a *spa* type t052, a *spa* t037 percentage increased from 26% in 2002 to 47% in 2005.

Conclusions: The changes in the frequency of occurrence of t052 and t037 isolates show that the Iberian clone, mostly showing susceptibility to cotrimoxazole, was supplanted by the Brazilian/Hungarian clone, mostly showing resistance to cotrimoxazole. The alterations in the structure of the MRSA population in the hospitals selected for the study represent dynamic changes in the epidemiology of clones, most

związane z presją selekcyjną antybiotyków stosowanych w terapii zakażeń szpitalnych.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, MRSA, typ *spa*, klon

Praca została wykonana w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie

Wprowadzenie

S. aureus może powodować szereg miejscowych zakażeń, najczęściej skóry, ran i tkanek miękkich oraz inwazyjnych zakażeń, takich jak sepsa, zapalenie wsierdza czy stawów. U ludzi *S. aureus* kolonizuje najczęściej błony śluzowe górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego, moczowo-płciowego oraz skórę dłoni, małżowin usznych, pachwin i głowy. Po krótkim okresie kolonizacji może dochodzić do utrzymywania się tego drobnoustroju w organizmie człowieka, bez wywoływania cech zakażenia, tj. nosicielstwa. Okres nosicielstwa *S. aureus* u każdego człowieka jest różny i stanowi wypadkową wielu czynników, m.in.: wieku, występowania choroby przewlekłej, defektów immunologicznych, hospitalizacji oraz od uwarunkowań genetycznych człowieka wpływających na podatność na zakażenia bakteryjne, a z drugiej strony od potencjału epidemicznego szczepu *S. aureus*. Wykazano istotną statystycznie korelację, występowania przewlekłego nosicielstwa *S. aureus*, np. z występowaniem polimorfizmu o charakterze SNP (*ang.* single nucleotide polymorphism) różnych genów gospodarza, np. genu kodującego białko C-reaktywne (typ SNP: C2042T i C1184T), czy genu kodującego interleukinę 4 (typ SNP: C524T) [1]. Z drugiej strony sugeruje się, że obecność określonych cech genetycznych gospodarza może także uniemożliwiać, bądź utrudniać kolonizację *S. aureus*. Zjawisko kolonizacji sprzyja utrzymywaniu się tego drobnoustroju w populacji, zaś nosiciel bezobjawowy, zwłaszcza przewlekły nosiciel, może być źródłem rozprzestrzeniania się danego szczepu w otoczeniu.

Znaczenie szczepów lekoopornych i metody ich badania

Od momentu pojawienia się pierwszego szczepu opornego na metycylinę, MRSA (*ang.* methicillin-resistant *S. aureus*) w 1961 r. notuje się wzrost zakażeń o tej etiologii, a w ostatnim dwudziestoleciu także wzrost zakażeń powodowanych przez szczepy VISA (*ang.* vancomycin-intermediate *S. aureus*). W latach 90. poprzedniego stulecia wykazano charakter klonalny rozprzestrzeniania się szczepów *S. aureus* odpowiedzialnych za epidemie szpitalne. Było to możliwe dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej, pozwalających na określenie stopnia pokrewieństwa badanych izolatów *S. aureus*, w toku typowania genetycznego. Aktualnie dostępnych jest wiele metod i strategii typowania, które różnią się pod względem możliwości określenia stopnia zróżnicowania genetycznego badanych izolatów i wielkością

probably related to the selection pressure of antibiotics used in the therapy of hospital infections.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *spa* type, clone

The work was done at the National Institute of Medicines in Warsaw

Introduction

S. aureus can cause a number of local infections, most commonly the skin, wound and soft tissue infections and invasive infections such as sepsis, endocarditis, and arthritis. In humans, *S. aureus* usually colonizes the mucous membranes of upper respiratory tract, gastrointestinal tract, urogenital tract and the skin of hands, ears, groin and head. After a brief period of colonization the micro-organism may remain in the human body, without causing characteristics of the infection, i.e., a carrier. *S. aureus* colonization period in every human being is different and is a result of many factors, including age, chronic disease, immune defects, hospitalization, and human genetic factors affecting susceptibility to bacterial infection, on the other hand it depends on the epidemic potential of *S. aureus* strain. A statistically significant correlation of the presence of chronic carrier-state of *S. aureus*, with, e.g., the occurrence of a polymorphism SNP (single nucleotide polymorphism) of different genes of a host, e.g., the gene encoding the C-reactive protein (SNP type: C2042T and C1184T) or the gene encoding interleukin-4 (type SNP: C524T) [1]. On the other hand, it is suggested that the presence of specific genetic characteristics of the host can also prevent or inhibit colonization of *S. aureus*. The phenomenon of colonization favors the persistence of this microorganism in the population, and an asymptomatic carrier, especially a chronic carrier, can be a source of spread of the given strain in the environment.

The importance of drug-resistant strains and methods of their study

Since the emergence of the first methicillin resistant strain, MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) in 1961 there has been an increase in the incidence of this etiology, and in the last two decades the increase in infections caused by strains of VISA (Vancomycin-intermediate *S. aureus*) took place as well. In the 90-ies of the last century the clonal character of spreading of *S. aureus* strains was shown, responsible for the outbreaks of hospital epidemics. This was made possible through the use of molecular biology methods to identify the degree of relatedness of the tested *S. aureus* isolates, in the course of the genetic typing. Currently, there are a lot of typing methods and strategies that differ in their ability to determine the degree of genetic diversity of isolates tested and in the size of analyzed DNA fragment. The most accurate method of

analizowanego fragmentu DNA. Najbardziej dokładną metodą pozwalającą na określenie stopnia zróżnicowania szczepów bakteryjnych jest sekwencjonowanie genomów. Z uwagi na możliwości, koszty i dostępność jest to strategia przyszłości.

Najstarsza i najprostsza z metod, RAPD (*ang.* randomly amplified polymorphic DNA), pozwala na określenie polimorfizmu losowo namnożonych fragmentów DNA, z zastosowaniem pojedynczych, specyficznych do wielu fragmentów genomu, starterów reakcji PCR. Metoda ta często stosowana była w latach 90. i na początku nowego stulecia do określania klonalności badanych izolatów. Z uwagi na trudności z jej standaryzacją uzyskane wyniki pozwalały na analizę danych z pojedynczego badania.

Bardziej precyzyjne wyniki można uzyskać z zastosowaniem metody RLFP (*ang.* restriction fragments length polymorphism), opartej na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA genomowego, np. PFGE (*ang.* pulsed field gel electrophoresis) lub określonego fragmentu DNA, np. genu, czy transpozonu. Wyniki uzyskane z zastosowaniem wariantów metod RLFP pozwalały na utworzenie strategii typowania, złożonej z typowania PFGE (uznawanego do tej pory jako „gold standard”) uzupełnionego, w przypadku MRSA, o typowanie locus *mecA* i transpozonu Tn554, i popularnej jeszcze na początku nowego stulecia. W wyniku zastosowania takiej strategii możliwe było określenie stopnia pokrewieństwa badanych izolatów podczas pojedynczego badania, a także na określenie z dużym prawdopodobieństwem ich pokrewieństwa ze szczepami epidemicznymi rozprzestrzenionymi na całym świecie, przy zastosowaniu wystandaryzowanych warunków badania i szczepów wzorcowych.

W latach 90. w typowaniu *S. aureus* metodą RLFP badano polimorfizm genów zawierających fragmenty polimorficzne, np. *spa*, *coa* i kodujących odpowiednio białko A i białko koagulazy wolnej. Te przeglądowe szybkie metody pozwalały jedynie na uzyskanie wstępnej informacji o klonalności badanych izolatów, bez możliwości określenia stopnia pokrewieństwa.

Przykładem nowszej metody pozwalającej na określenie polimorfizmu *loci* gronkowcowych: *sdr*, *clfA*, *clfB*, *sspA* i *spa* z zastosowaniem złożonej reakcji PCR (*ang.* multiplex PCR) jest MLVF (*ang.* multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting). Oparta jest ona na badaniu zmienności liczby tandemowych powtórzeń (*ang.* variable numbers of tandems repeat, VNTR) wymienionych genów. Uzyskany wynik pozwala na określenie stopnia pokrewieństwa i klonalności badanych izolatów, po wystandaryzowaniu metody [2, 3].

W celu określenia pokrewieństwa izolatów zebranych w długim okresie czasu i pochodzących z odległych ośrodków, potrzebne jest zastosowanie innej metody, np. MLST (*ang.* multilocus sequence typing), z jednej strony o mniejszej sile różnicowania, z drugiej zaś pozwalającej

determining the degree of differentiation of bacterial strains is sequencing the genomes. Due to the possibilities, cost and availability this is a strategy for the future.

The oldest and simplest method, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), allows to determine the polymorphism of randomly proliferated DNA fragments, using a single, specific to a number of fragments of the genome, primers of PCR reactions. This method was often used in the 90's and at the beginning of the new century to determine the clonality of isolates tested. Due to the difficulty of its standardizing, the results obtained allowed to analyze data from a single test.

More accurate results can be obtained using the method of RLFP (Restriction fragments length polymorphism) based on the analysis of polymorphism of the length of restriction fragments of genomic DNA, such as PFGE (pulsed field gel electrophoresis) or a specific piece of DNA, such as a gene, or a transposon. The results obtained using variants of RLFP methods allowed for the creation of typing strategy, consisting of PFGE typing (so far recognized as the “gold standard”), supplemented, in the case of MRSA, by the typing of *mecA* locus and transposon Tn554, being still popular at the beginning of the new century. As a result of this strategy it was possible to determine the degree of relatedness of isolates tested in a single test, and the determination, with a high degree of likelihood, of their relationship with the epidemic strains widely distributed around the world, using a standardized test conditions and reference strains.

In the 90's, in the typing of *S. aureus* by the method of RLFP researchers studied polymorphisms of genes containing polymorphic fragments, such as a *spa*, *coa* and appropriately encoding protein A and free coagulase protein. These rapid review methods allowed only to obtain preliminary information on the clonality of isolates tested, without the possibility to determine the degree of relatedness.

An example of a newer method for the determination of the polymorphism of staphylococcal *loci*: *sdr*, *clfA*, *clfB*, *sspA* and *spa* with the use of complex PCR reaction (called multiplex PCR) is MLVF (multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting). It is based on the study of variability of the number of tandem repeats (called variable numbers of tandems repeat, VNTR) of these genes. The result allows to determine the degree of kinship and clonality of isolates tested, after standardising the method [2, 3].

In order to determine the relatedness of isolates collected over a long period of time and from remote centers, another method such as MLST is needed (multilocus sequence typing), on the one hand with a weaker differentiation, on the other allowing to determine the relationship. MLST typing allows to determine the epidemiological relatedness of *S. aureus* dispersed globally, and is used to study the evolutionary variability of MRSA

określić pokrewieństwo. Typowanie MLST pozwala na określenie pokrewieństwa epidemiologicznego *S. aureus* rozprzestrzenionych globalnie, a także służy do badań nad ewolucyjną zmiennością MRSA i MSSA (ang. methicillin-susceptible *S. aureus*). Metoda ta oparta jest na analizie sekwencji nukleotydowych konserwatywnych fragmentów DNA siedmiu genów typu „housekeeping genes”, tj. genów, w których zmienność zachodzi najwolniej [4]. Określone warianty sekwencji nukleotydowych amplifikowanego fragmentu genu są oznaczane numerem allelu i składają się na typ ST. Szczepy spokrewnione ewolucyjnie o nieznacznie zróżnicowanych typach ST (z różnicą najwyżej do 2 nukleotydów w obrębie allelu, ang. double locus variant, DLV) tworzą kompleksy klonalne CC (ang. clonal complexes). Przedstawiona metoda jest najbardziej uniwersalną i powszechną spośród opracowanych dotąd metod i pozwala na wprowadzanie do ogólnie dostępnej bazy danych nowych typów ST. Aktualnie do badania pokrewieństwa MRSA powszechnie stosowana jest strategia oparta na typowaniu MLST oraz typowaniu SCC-*mecA* (ang. staphylococcal chromosomal cassette *mecA*), dodatkowo określającym polimorfizm kasety niosącej gen *mecA* [4]. Do najnowszych, wystandaryzowanych i rozpowszechnionych metod badania polimorfizmu genów gatunkowo specyficznych, uzupełniających inne wyniki typowania, należy metoda oznaczania typu *spa*, poprzez sekwencjonowanie regionu polimorficznego (X) tego genu. Metoda ta pozwala na wykrycie zmienności w obrębie klonu, a także może być elementem strategii złożonej z innych metod typowania do monitorowania zmienności występowania klonów *S. aureus* na danym obszarze.

Analiza szczepów *S.aureus* w wybranych szpitalach w Polsce

Cel pracy

Ocena klonalności metycylinoopornych izolatów *S. aureus* (MRSA) w wybranych polskich szpitalach.

Materiał i metody

W latach 2002–2005 w Narodowym Instytucie Leków zgromadzono inwazyjne izolaty MRSA pochodzące z zakażeń w wybranych polskich szpitalach. Wyniki badań dotyczące oceny pokrewieństwa genetycznego izolatów *S. aureus* pochodzących z wybranych polskich szpitali z zastosowaniem kilku metod typowania zostały opublikowane we wcześniejszej pracy z naszego ośrodka [2].

Badana grupa składała się ze 183 metycylinoopornych *S. aureus* (MRSA) i 4 metycylinowrażliwych szczepów *S. aureus* (MSSA) izolowanych w większości od pacjentów z inwazyjnymi zakażeniami (82%). Najczęściej szczepy te były izolowane z krwi, sporadycznie z innych jałowych materiałów (płyn otrzewnowy, płyn stawowy, płyn opłucnowy). Pacjenci byli hospitalizowani w 29 szpitalach

and MSSA (Methicillin susceptible *S. aureus*). This method is based on the analysis of nucleotide sequences of conservative DNA fragments of seven genes related to „housekeeping genes”, i.e., genes whose variation occurs slowest [4]. Specific variants of the nucleotide sequences of the amplified fragment of the gene are marked with the allele number and constitute ST type. Strains related evolutionarily with slightly different ST (with a difference of a maximum of two nucleotides within the allele, double locus variant DLV) form clonal complexes CC. Presented method is the most universal and common among the methods developed so far and allows us to add new types of ST to a public database. Currently, for the study of relatedness of MRSA the strategy based on MLST typing and SCC*mecA* typing is commonly used (called staphylococcal chromosomal cassette *mecA*), additionally defining polymorphism of the cassette carrying the *mecA* gene [4]. To the latest, standardized and widely used methods for testing gene polymorphism of species-specific genes, complementing other typing results belongs the method of determining the type of *spa*, by sequencing the polymorphic region (X) of the gene. This method allows the detection of variation within the clone, and can be an element of the strategy composed of other typing methods for monitoring the variation of occurrence of *S. aureus* clones in the area.

Analysis of *S. aureus* strains in selected hospitals in Poland

Aim of the study

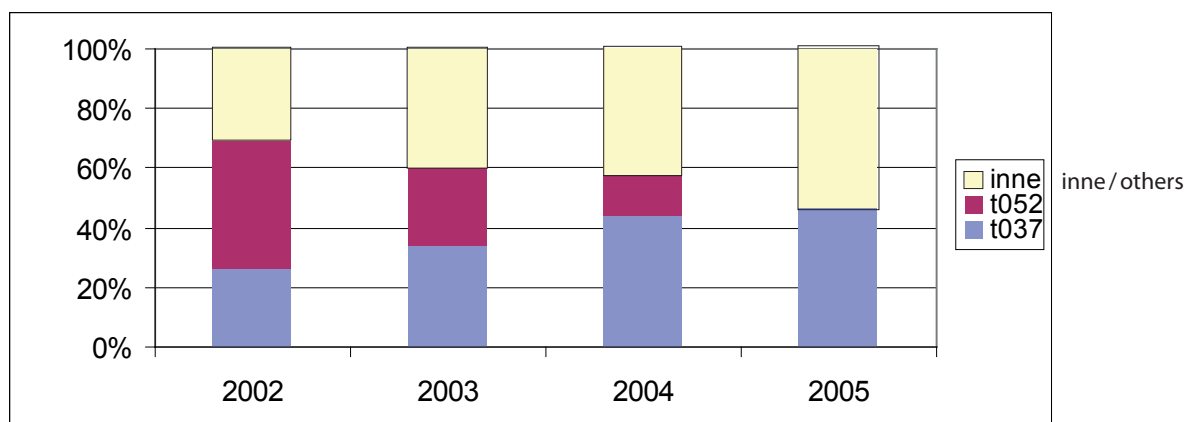
Clonality assessment of methicillin-resistant isolates of *S. aureus* (MRSA) in selected Polish hospitals.

Materials and methods

In the years 2002–2005, National Medicines Institute collected invasive MRSA isolates from infections in selected Polish hospitals. The results of the assessment of genetic relatedness of *S. aureus* isolates from selected Polish hospitals, using several typing methods, have been published in previous work from our center [2].

The study group consisted of 183 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and 4 methicillin susceptible strains of *S. aureus* (MSSA) isolated in the majority from patients with invasive infections (82%). Most strains were isolated from the blood, occasionally from other sterile materials (peritoneal fluid, synovial fluid, pleuritic fluid).

The patients were hospitalized in 29 hospitals (Kuyavian-Pomeranian Voivodeship – Bydgoszcz, Toruń; Lublin Voivodeship – Lublin, Zamość; Lubus Voivodeship – Zielona Góra; Lesser Poland Voivodeship – Kraków; Masovian Voivodeship – Maków Mazowiecki, Ostrów Mazowiecka, Płock, Warszawa, Wołomin; Opole Voivodeship – Opole; Subcarpathian Voivodeship – Rzeszów; Podlaskie Voivodeship – Łomża, Suwałki;



Ryc. 1. Zmiany częstości występowania typów *spa* t037 i t052 w okresie 2002–2005

Fig. 1. The changes of the distribution of *spa* types t037 and t052 in the period of 2002–2005

(województwo kujawsko-pomorskie – Bydgoszcz, Toruń; lubelskie – Lublin, Zamość; lubuskie – Zielona Góra; małopolskie – Kraków; mazowieckie – Maków Mazowiecki, Ostrów Mazowiecka, Płock, Warszawa, Wołomin; opolskie – Opole; podkarpackie – Rzeszów; podlaskie – Łomża, Suwałki; pomorskie – Gdynia, Wejherowo; śląskie – Bytom, Częstochowa, Sosnowiec, Zawiercie; warmińsko-mazurskie – Olsztyn; wielkopolskie – Kalisz, Poznań; zachodniopomorskie – Kołobrzeg, Koszalin) biorących udział w Ogólnopolskiej Sieci Monitorowania Oporności Drobnoustrojów oraz Optymalizacji Profilaktyki i Terapii Zakażeń (OPTY) koordynowanej przez Narodowy Instytut Leków w Warszawie. Całkowity DNA był oczyszczany za pomocą zestawu Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) w sposób wcześniej opisany [3]. Amplifikację regionu X genu *spa* przeprowadzono, jak poprzednio opisano [5, 6], a amplikony sekwencjonowano za pomocą sekwenatora ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Typy *spa* identyfikowano z wykorzystaniem Ridom SpaServer [7].

Wyniki

Na podstawie analizy sekwencji regionu X genu *spa* wyróżniono 30 typów *spa*. Najczęściej występującymi typami były t037 ($n=74$) i t052 ($n=33$), należące odpowiednio do klonu brazylijsko/węgierskiego i iberyjskiego HA-MRSA (*ang.* hospital acquired MRSA) [4]. W okresie 4 lat zaobserwowano spadek odsetka izolatów t052 (z 43% w 2002 do 0% w 2005). Wśród badanych izolatów *S. aureus* typ *spa* t052, najczęściej występował w grupie z 2002 r. i nie pojawił się już w grupie z roku 2005. W omawianym wyżej okresie, odsetek typu *spa* t037 zwiększył się znacząco z 26% w 2002 do 47% w 2005 r. (Ryc. 1).

Dyskusja

W Polsce opisano dotąd występowanie kilku klonów o zasięgu międzynarodowym, w tym klonów przedstawionych w tej pracy, tj.: klonu brazylijsko/węgierskiego (typ ST-SCCmec: 239-III) i iberyjskiego (typ ST-SCCmec:

Pomeranian Voivodeship – Gdynia, Wejherowo; Silesian Voivodeship – Bytom, Częstochowa, Sosnowiec, Zawiercie; Warmian-Masurian Voivodeship – Olsztyn; Greater Poland Voivodeship – Kalisz, Poznań; West Pomeranian Voivodeship – Kołobrzeg, Koszalin) participating in the National Antimicrobial Resistance Monitoring Network and Optimization for Prevention and Infection Therapy (OPTY) coordinated by the National Medicines Institute in Warsaw. Total DNA was purified using the set of Genomic DNA Prep Plus (A & A Biotechnology, Gdynia, Poland) as described previously [3]. Amplification of the X region of the *spa* gene was performed as previously described [5,6], and amplicons were sequenced using ABI 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). *Spa* types were identified using Ridom SpaServer [7].

Results

Based on the analysis of the sequence of the region X of *spa* gene 30 types of *spa* were distinguished. The most common types were t037 ($n=74$) and t052 ($n=33$), which belong to the clones Brazilian / Hungarian and Iberian HA-MRSA (hospital acquired MRSA) respectively [4]. The four-year study period showed a decrease in the percentage of isolates t052 (from 43% in 2002 to 0% in 2005). Among the isolates tested *S. aureus spa* type t052 usually occurred in a group of 2002 and did not appear in the group of 2005. In the period discussed above the percentage of *spa* type t037 increased significantly from 26% in 2002 to 47% in 2005 (Fig. 1).

Discussion

In Poland, a few international clones have been described so far, including the clones presented in this work, i.e.: Brazilian / Hungarian clone (ST-SCCmec type 239-III) and Iberian clone (ST-SCCmec type 247-I) [8, 9, 10], characterized by types of *spa* t037 and t052 respectively. The described pandemic HA-MRSA clones are characterized by a varied number of types of *spa*, which

247-I) [8, 9, 10], charakteryzujących się odpowiednio typami *spa*, t037 i t052. Opisane pandemiczne kłony HA-MRSA charakteryzują się zróżnicowaną liczbą typów *spa*, co odzwierciedla zmienność w obrębie klonu, przy czym typy *spa* są specyficzne dla określonego kompleksu klonalnego (CC – ang. clonal complex) [4].

W niektórych krajach obserwuje się duże zmiany w strukturze populacji HA-MRSA [4]. Ciekawe, że znikanie klonu iberyjskiego HA-MRSA stwierdzono w kilku europejskich państwach [11–15]. Jednakże, zamiana klonu iberyjskiego na klon brazylijsko/węgierski została udowodniona tylko w Portugalii [14]. Wyparcie klonu iberyjskiego przez inne kłony stwierdzono w pozostałych, wyżej wymienionych, pracach. Łuczak i wsp. [9] scharakteryzowali 208 izolatów HA-MRSA za pomocą kilku metod molekularnych i stwierdzili, że kłony węgierski (PFGE B, ST239-III) i iberyjski (PFGE D, ST247-I) dominowały w pierwszej połowie 2005 r. Obejmowały one odpowiednio 52.9% i 11.5% izolatów MRSA. Z uwagi na brak wyników typowania *spa* niemożliwe jest szczegółowe porównanie wyników obydwu badań. W innym badaniu [10] zastosowano typowanie *spa* do analizy 22 izolatów HA-MRSA i HA-MSSA wyizolowanych w trzech polskich szpitalach na przełomie 2006 i 2007 r. Żaden z izolatów nie należał do typu t052, natomiast obecny był typ *spa* t037. Przyczyny zmian w strukturze populacji HA-MRSA w Europie w przeważającej części pozostają nieznane [15]. Jedną z możliwych hipotez wskazuje na istotne znaczenie presji selekcyjnej wywieranej przez leki przeciwbakteryjne stosowane u pacjentów hospitalizowanych. Należy podkreślić, że szczepy należące do typu *spa* t052 w większości wykazywały wrażliwość na ko-trimoksazol, a szczepy należące do typu t037 wykazywały przeważnie oporność wobec tego chemioterapeutyku.

Wnioski

W wybranych szpitalach objętych monitorowaniem, stwierdzono stopniowe zmniejszanie się częstości izolacji, aż do całkowitej eliminacji izolatów MRSA o typie *spa* t052, z równoczesnym wzrostem częstości izolacji MRSA o typie t037 z 26 do 47%, co sugeruje konkurencyjne wypieranie klonu iberyjskiego przez brazylijsko/węgierski, najprawdopodobniej w wyniku selekcyjnej presji stosowanych antybiotyków w badanych szpitalach.

Podziękowania

Autorzy pracy składają podziękowania dr Arturowi Sabatowi za merytoryczny i techniczny nadzór nad realizacją badań molekularnych w Narodowym Instytucie Leków oraz przedstawicielom Laboratoriów Mikrobiologicznych szpitali należących do Ogólnopolskiej Sieci Monitorowania Lekooporności.

Badanie zostało częściowo sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach specjalnego urządzenia badawczego pn. Mikrobank 2

reflects variations in the clone, where *spa* types are specific for a definite clonal complex (CC) [4].

In some countries a large change in the structure of HA-MRSA population can be observed [4]. Interestingly, the disappearance of the Iberian clone HA-MRSA was noted in several European countries [11–15]. However, the conversion of the Iberian clone to Brazilian / Hungarian has been proven only in Portugal. [14] Displacing the Iberian clone by the other clones was stated in the remaining, the above-mentioned work. Łuczak et al [9] characterized 208 isolates of HA-MRSA by several molecular methods, and found that the Hungarian clone (PFGE B, ST239-III) and Iberian (PFGE D, ST247-I) dominated in the first half of 2005. They included respectively 52.9% and 11.5% of MRSA isolates. Due to the lack of *spa* typing a detailed comparison of the results of both studies is not possible. In another study [10] *spa* typing was used for the analysis of 22 isolates of HA-MRSA and HA-MSSA isolated in three Polish hospitals between 2006 and 2007. None of the isolates belonged to type t052, however a *spa* type t037 was present. Reasons for changes in the population structure of HA-MRSA in Europe for the most part remain unknown [15]. One possible hypothesis points to the importance of selective pressure exerted by antibacterial agents used in hospitalized patients. It should be noted that strains belonging to *spa* type t052 mostly exhibited susceptibility to cotrimoxazole, and strains belonging to the type t037 mostly showed resistance to this chemotherapeutic agent.

Conclusions

In some monitored hospitals, there was a gradual decrease in the frequency of isolation, until the complete elimination of MRSA isolates of *spa* type t052, with a simultaneous increase in the frequency of MRSA isolation of type t037 from 26 to 47%, suggesting competitive displacement of the Iberian clone by the Brazilian / Hungarian, most likely due to the selection pressure of antibiotics used in the tested hospitals.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Artur Sabat for substantive and technical supervision of the implementation of molecular testing at the National Institute of Medicines and Microbiological Laboratories representatives of hospitals belonging to the Polish National Monitoring Network of Drug Resistance.

The research was partly funded by the Ministry of Science and Higher Education under the special testing device called Mikrobank 2.

Piśmiennictwo / References

1. Ruimy R, Angebault C, Djossou F, Dupont C, Epelboin L, Jarraud S i wsp. *Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal Staphylococcus aureus carriage in humans?* J Infect Dis. 2010; 202: 924-34.
2. Karyński M, Sabat AJ, Empel J, Hryniewicz W. *Molecular surveillance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (formerly multiple-locus variable number tandem repeat analysis) and spa typing in a hierarchic approach.* Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 62:255-62.
3. Sabat A, Krzysztoń-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W i wsp. *New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates.* J Clin Microbiol. 2003; 41:1801-4.
4. Deurenberg RH, Stobberingh EE. *The evolution of Staphylococcus aureus.* Infect Genet Evol. 2008; 8:747-63.
5. Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J i wsp. *High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study.* J Clin Microbiol. 2006; 44:619-21.
6. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE i wsp. *Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains.* J Clin Microbiol. 1999; 37:3556-63.
7. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D i wsp. *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management.* J Clin Microbiol. 2003; 41:5442-8.
8. Krzysztoń-Russjan J, Łęski T, Gniadkowski M, Empel J, Hryniewicz W. *Clonal structure of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) population in Poland: revision and update.* Microbial Drug Resist. 2005; 11:127-36.
9. Łuczak-Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J, Piasecka A, Orczykowska M, Kozinska A i wsp. *Countrywide molecular survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Poland.* J Clin Microbiol. 2008; 46:2930-7.
10. Łuczak-Kadłubowska A, Sabat A, Tambic-Andrasevic A, Payerl-Pal M, Krzysztoń-Russjan J, Hryniewicz W. *Usefulness of Multiple-Locus VNTR Fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired Staphylococcus aureus isolates.* Antonie Van Leeuwenhoek. 2008; 94: 543-53.
11. Hallin M, Denis O, Deplano A, De Mendonça R, De Ryck R, Rottiers S i wsp. *Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus: results of a national survey.* J Antimicrob Chemother. 2007; 59:465-72.
12. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. *Tracking methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital.* J Clin Microbiol. 2004; 42:4649-56.
13. Vindel A, Trincado P, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Solá C i wsp. *Prevalence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Spanish hospitals between 1996 and 2002.* J Clin Microbiol. 2006; 44:266-70.
14. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H. *Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period.* J Clin Microbiol. 2008; 46:2912-7.
15. Witte W, Cuny C, Klare I, Nübel U, Strommenger B, Werner G. *Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens.* Int J Med Microbiol. 2008; 298:365-77.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Michał Karyński
Samodzielna Pracownia Profilaktyki Zakażeń
i Zakażeń Szpitalnych
Narodowego Instytutu Leków,
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
Telefon: 22-851-52-05
Faks: 22-331-15-64
E-mail: mkarynski@cls.edu.pl