

Arta Balode

**Meticilīnrezistentā  
*Staphylococcus aureus*  
molekulāri bioloģiskās īpatnības  
daudzprofilu stacionārā ārstētiem  
pacientiēm Latvijā**

Promocijas darbs  
medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai  
Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

Rīga, 2011



Arta Balode

Meticilīnrezistentā *Staphylococcus aureus*  
molekulāri bioloģiskās īpatnības  
daudzprofilu stacionārā ārstētiem  
pacientiem Latvijā

Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

PROMOCIJAS DARBS

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med., LZA kor. loc. profesore *Dace Gardovska*

Dr. biol. asociētais profesors *Edvīns Miklaševičs*

Rīga, 2011

0221007686

## Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts



Eiropas sociālā fonda projekts:

„Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienošanās Nr. 2009 /0147 /1DP /1.1.2.1.2. /09/IPIA/VIAA/009.

## Anotācija

Meticilīn-rezistentais *Staphylococcus aureus* (MRSA) ir viens no galvenajiem nozokomiālo infekciju izraisītājiem daudzās attīstītās pasaules valstīs. Īpašam riskam ir pakļauti gados vecāki cilvēki, ķirurģisko un intensīvas terapijas nodaļu pacienti. *S. aureus* citu patogēnu vidū izceļas ar tam piemītošu virulenci, spēju izraisīt virkni dažādu dzīvībai bīstamu infekciju un ātri pielāgoties apkārtējās vides izmaiņām. Sevišķi jāuzsver HI - MRSA celmu rezistenci pret daudzām antibiotikām, kas apgrūtina un sadārdzina terapiju. Pēdējos gados tas ir parādījies arī Latvijā, tādēļ ir nepieciešama molekulāri epidemioloģiskās informācijas analīze, kas varētu palīdzēt izstrādāt zinātniski pamatotu infekciju kontroles politikas plānu plaša profila stacionārā.

Galvenā un būtiskā atšķirība starp meticilīnjutīgiem un meticilīnrezistentiem *S. aureus* ir tā, ka pēdējie satur hromosomā integrētu gēnu kaseti *SCCmec* (staphylococcal chromosomal cassette *mec*), kura centrālais elements ir *mecA* gēns, kas nodrošina saimnieka rezistenci pret visiem  $\beta$ -laktāmiem. Ir izdalīti pieci strukturāli atšķirīgi *SCCmec* tipi un daži apakšvarianti, kas atkarībā no tipa satur virkni ar patogenitāti un rezistenci saistītu gēnu. Šie rezistences gēni nodrošina *S. aureus* izdzīvošanu ne tikai antibiotiku klātbūtnē (piem. aminoglikozīdi un makrolīdi), bet arī pie citiem nelabvēlīgiem faktoriem vidē (piem. smagiem metāliem). Papildus *S. aureus* celmi ir spējīgi producēt vismaz daļu toksīnu no visai plaša stafilokoku toksīnu arsenāla. No toksīniem īpaši jāizceļ PVL un TSST, kuri, it īpaši pirmais, kopā ar IV tipa *SCCmec* ir sadzīvē iegūtā MRSA (SI-MRSA) molekulārie marķieri. Mūsu sākotnējie rezultāti norāda, ka SIA-MRSA celmi ir nonākuši arī Latvijā un tiem būtu jāpievērš īpaša uzmanība.

Lai apzinātu situāciju Latvijā un veiktu efektīvus un zinātniski pamatotus pasākumus MRSA izplatības ierobežošanai, ir nepieciešams noteikt mūsu valstī esošo MRSA klonālo piederību, noteikt to klīniski svarīgos patogenitātes faktoros un veikt molekulāri epidemioloģiskos pētījumus.

## Annotation

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most important cause of nosocomial infections in many developed countries of the world. In particular it is risk of infection for elderly people and patients of surgical and intensive care facilities. Among other pathogens *S. aureus* is distinguished for its virulence factors, capability to stimulate infections dangerous for the life of human and capability to adjust to the changes of the environment. Especially has to be highlighted the resistance of hospital acquired strains of *S. aureus* to many antibiotics, that raise the costs of the hospital and burden the treatment of MRSA patients. Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* have become increasingly common in the hospitals of Latvia, therefore the analysis of molecular epidemiological information is necessary for help for the development the scientifically valid plan of the strategy of infection control for prevention of MRSA infections in multiprofile hospitals.

The main and essential difference between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *S. aureus* is that MRSA possess intrinsic resistance to methicillin due to chromosomally integrated staphylococcal chromosomal cassette *SCCmec*, where chromosomal *mecA* gene is the central component, that insure the resistance of the host strain resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. Five different *SCCmec* types and several subtypes are discovered to date, that dependently of the type carry different resistance and virulence genes. These resistance genes ensure the survival of the *S. aureus* not only in the presence of the certain antibiotic (for example aminoglycosides and macrolides) but also in other inimic conditions of environment (for example, salts of the heavy metals).

In addition *S. aureus* strains are able to produce at least part of toxins from wide array of the toxins. From the toxins produced by MRSA especially has to be highlighted PVL and TSST toxins, especially the first one, that in conjunction with IV type *SCCmec*, is community acquired *S. aureus* molecular marker. Our primary results indicate that community acquired *S. aureus* strains are found in Latvia and to them has to be paid particular attention.

To study the situation in Latvia and manage effective and scientific based arrangements for prevention of spread of MRSA, it is necessary to establish the clonal possession of MRSA strains spread in Latvia, to establish their main factors of pathogenicity and carry out molecular epidemiological investigations.

## Saturs

Anotācija .....	3
Darbā lietotie saīsinājumi .....	8
Definīcijas .....	10
Ievads .....	11
1. Problēmas aktualitāte .....	13
2. Darba mērķis .....	14
3. Darba uzdevumi .....	14
4. Pētījuma jautājumi .....	14
5. Darba zinātniskā novitāte .....	15
6. Literatūras apskats .....	16
6.1. Stafilokoku taksonomija un vispārējs raksturojums .....	16
6.2. Stafilokoku šūnas apvalks un meticilīna rezistences evolūcija .....	17
6.3. <i>Staphylococcus aureus</i> genoms .....	19
6.4. <i>Staphylococcus aureus</i> virulences faktori .....	20
6.5. <i>Staphylococcus aureus</i> rezistences gēni .....	22
6.6. Meticilīnrezistentais <i>S. Aureus</i> .....	28
6.6.1. MRSA meticilīnrezistence .....	28
6.6.2. <i>SCCmec</i> molekulārā uzbūve, celmu izplatība un MRSA molekulārās izmeklēšanas metodes .....	29
6.7. MRSA tipēšanas metodes .....	31
6.7.1. Antibiogramma .....	32
6.7.2. Pulsējošā lauka elektroforēze – PFGE .....	32
6.7.3. Proteīna A gēna tipēšana .....	34
6.7.4. Multilokusu sekvenču tipēšanas metode .....	35
6.8. <i>S. aureus</i> un MRSA nēsāšana, izplatība un skrīnings, nosakot MRSA nēsāšanu .....	36
6.9. <i>S. aureus</i> un MRSA ierosinātās slimības .....	40
6.9.1. Ādas un zemādas strutainas infekcijas – furunkuloze, celulīts, abscess u.c. ....	40
6.9.2. <i>S. aureus</i> ierosinātās brūču infekcijas .....	41
6.9.3. Stafilokoku toksiskā šoka sindroms .....	44
6.9.4. Infekciozais endokardīts (IE) .....	44

6.9.5. <i>S. aureus</i> bakterēmija .....	44
6.9.6. Stafilokoku pneimonija .....	46
6.10. Sadzīvē iegūtā MRSA raksturojums .....	46
6.11. MRSA izplatība pasaulē .....	49
6.12. MRSA ierosināto infekciju ārstēšana .....	52
7. Materiāli un metodes .....	54
7.1. Darba metodoloģija .....	54
7.1.1. MRSA gadījumu izpēte PSKUS 2004. – 2010. gadā .....	54
7.1.2. MRSA asins paraugu analīze PSKUS .....	54
7.1.3. No asinīm izdalīto MRSA izplatība Latvijā 2004. –2009. gadā, salīdzinot ar Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla dalībvalstīs izdalīto MRSA izplatību .....	54
7.1.4. MRSA izolātu fenotipiskā un genotipiskā analīze .....	55
7.2. Pētījuma uzbūve .....	57
7.3. MRSA izolātu kolekcijas un datu bāzes veidošana .....	58
7.4. MRSA izolātu laboratoriskās izmeklēšanas metodes .....	58
7.4.1. <i>S. aureus</i> izolātu izdalīšana no patoloģiskā materiāla .....	58
7.4.2. Plazmas koagulācijas tests stobriņā .....	60
7.5. MRSA izolātu fenotipiskā analīze pēc antimikrobiālās jutības rezultātiem .....	60
7.5.1. <i>S. aureus</i> antimikrobiālās jutības noteikšana ar disku difūzijas metodi Agarā .....	60
7.5.2. Oksacilīna rezistences un izdalīto <i>Staphylococcus aureus</i> izolātu jutības noteikšana pret antimikrobiālajiem preparātiem .....	61
7.5.3. Minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC) noteikšana ar E testu® .....	61
7.5.4. <i>S. aureus</i> antimikrobiālās jutības noteikšana un rezultātu izvērtēšana SIR sistēmā ar automatizēto VITEK 2, lietojot AST292 komplektu .....	61
7.5.5. PBP <sub>2</sub> noteikšana ar Slidex MRSA <i>S. aureus</i> oksacilīna rezistences apstiprināšanai .....	63
7.6. MRSA izolātu molekulāri ģenētiskā analīze .....	63
7.6.1. MRSA molekulārā verifikācija .....	63
7.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i> PVL gēnu noteikšana .....	65
7.6.3. SCCmec kasešu tipa noteikšana (Oliveira et al, 2002) .....	67
7.6.4. <i>mecA</i> gēna klases noteikšana (Okuma et al, 2002) .....	68

7.6.5. ccr gēna tipa noteikšana (Okuma et al, 2002) .....	69
<b>7.6.6. Staphylococcus aureus spa tipa noteikšana</b> .....	<b>70</b>
7.6.7. MRSA ST noteikšana .....	72
7.7. Zinātniskās medicīnas literatūras meklēšana datu bāzēs .....	73
7.8. Datu statistiskās apstrādes metodes .....	74
8. Rezultāti .....	75
8.1. MRSA gadījumu izpēte PSKUS 2004.–2010. gadā .....	75
8.2. No asinīm izdalīto MRSA izplatība Latvijā 2004.–2009. gadā salīdzinājumā ar Eiropas antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla dalībvalstīm .....	78
8.3. MRSA izolātu fenotipiskais un ģenētiskais raksturojums .....	82
8.3.1. HI-MRSA izolātu fenotipēšana .....	82
8.3.2. HI –MRSA izolātu genotipēšana .....	84
8.3.3. SI-MRSA izolātu fenotipēšana .....	87
8.3.4. SI-MRSA izolātu genotipēšana .....	87
8.4. No asinīm izdalīto <i>S. aureus</i> raksturojums pēc <i>spa</i> tipa Latvijā salīdzinājumā ar Eiropā izplatītajiem celmiem .....	90
9. Diskusija .....	96
10. Secinājumi .....	108
11. Publikāciju saraksts par darbā izvēlēto tēmu .....	109
12. Publicētās tēzes un ziņojumi konferencēs .....	110
13. Literatūras saraksts .....	112
13. Pateicības .....	125
14. Pielikumi .....	126
15. Publikācijas .....	142



## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

<i>aArc C</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
<i>aroE</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
AST	– antimikrobiālās jutības tests
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BD	– <i>Becton Dickinson</i>
CDC	– Centers for Disease and control and Prevention
CC	– <i>Clindamycin</i>
<i>ccr</i>	– kasetes hromosomas rekombināzes gēni
CDC	– Centers for Disease Control and Prevention
CIP	– <i>Ciprofloxacin</i>
<i>clfA</i>	– <i>S. aureus</i> marķieris
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standarts Institute</i>
DNS	– dezoksiribonukleīnskābe
EARSS	– Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkls
em	– praimeru pāris
ERY	– <i>Erythromycin</i>
GEN	– <i>Gentamicin</i>
<i>glpF</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
<i>gmk</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
<i>hgl-v- hlg</i>	– <i>v toksīna gēns</i>
HI - MRSA	– ar ārstniecības iestādi asociētais meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Hlg</i>	– <i>hlg toksīna gēns</i>
hVISA	– heterogēni vankomicīna mēreni jutīgie <i>S. aureus</i>
<i>luk-PV PVL</i>	– toksīna gēns
Mc Farland standarts	– <i>Mac Farland</i> standarts
<i>mecA</i>	– meticilīnrezistences gēns
<i>mecI</i>	– par <i>mecA</i> – par gēna transkripciju atbildīgais gēns
MgCl <sub>2</sub>	– magnija hlorīds
MIC	– Minimālā inhibitorā koncentrācija
MLST	– multilokusa sekvenču tipēšana

MRSA	– meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus aureus</i>
OX	– <i>Oxacillin</i>
<i>pat</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
PBP <sub>2</sub>	– penicilīnu saistošais proteīns
PFGE	– pulsējošā lauka elektroforēze gelā
PĶR	– polimerāzes ķēdes reakcija
PSKUS	– Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīc
PVL toksīns	– <i>Panton-Valentine leukocidin</i> toksīns
QC	– kvalitātes kontrole
<i>rif</i>	– rifampicīna rezistences gēns
RIF	– <i>Rifampin</i>
RNS	– ribonukleīnskābe
rRNA	– ribosomālā ribonukleīnskābe
<i>S. aureus</i>	– <i>Staphylococcus aureus</i>
SCC <i>mec</i>	– stafilokoku hromosomāla kasete
SI-MRSA	– sadzīvē iegūtais meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>spa</i>	– stafilokoku A proteīna gēns
ST	– sekvenču tips
STX	– <i>Trimethoprim-sulfamethoxazole</i>
TET	– <i>Tetracyclin</i>
<i>tpi</i>	– <i>housekeeping</i> gēns
<i>tsst</i>	– toksiskā šoka sindroma toksīna I gēns
UV <i>transiluminators</i>	– ultra violetais transiluminators
VAN	– <i>Vancomycin</i>
VISA	– vankomicīna mēreni jutīgie <i>S. aureus</i>
VRSA	– vankomicīna rezistentie <i>S. aureus</i>
<i>yqiL</i>	– <i>housekeeping</i> gēns

## DEFINĪCIJAS

**MRSA gadījums:** pacients ar MRSA izraisītas infekcijas klīnisko izpausmi, laboratoriski apstiprinātu MRSA un MRSA nēsātāji.

**Kolonizācija/MRSA nēsāšana:** laboratoriski apstiprināts MRSA pacientam, kuram nav infekcijas simptomu, ko izraisa MRSA.

**MRSA bakterēmija:** MRSA infekcijas simptomu kopums pacientam ar asinīs laboratoriski apstiprinātu MRSA.

**Invazīvs MRSA izolāts:** MRSA, izdalīts pacientam ar MRSA simptomu kopumu.

**MRSA izolāts:** no patoloģiskā materiāla izdalīts mikroorganisms.

**MRSA celms:** no patoloģiskā materiāla izdalītu mikroorganismu kopums ar vienādām to raksturojošām īpašībām (antibiogramma, molekulāri bioloģiskais raksturojums).

### **MRSA infekcijas riska grupas**

1. No citām ārstniecības iestādēm pārvesti pacienti vai pacienti, kas pēdējo 30 dienu laikā atradušies citas veselības aprūpes iestādes intensīvās terapijas nodaļā.
2. Pacienti, kuriem pēdējo sešu mēnešu laikā veiktas ķirurģiskas manipulācijas.
3. Pacienti, kuriem bijusi saskare ar MRSA inficētu pacientu.
4. Ja uzņemšanas laikā pacientam ir strutojošas brūces, atrofiskas čūlas, ilgstoši katetri.

### **Inficēšanās riska faktori ar MRSA**

1. Vispārēji riska faktori (imūnsupresija, cukura diabēts, hroniski ādas bojājumi).
2. Ar hospitalizāciju saistīti riska faktori (ilgstoša hospitalizācija, katetri, ķirurģiskas manipulācijas un plaušu mākslīgā ventilācija, pacienta veselības stāvokļa smagums).
3. Sadzīviski riska faktori (ciešs kontakts ar lielu cilvēku skaitu, atrašanās ilglaicīgas aprūpes iestādēs, nodarbošanās ar kontakta sporta veidiem u. c.).

**Nozokomiāla/intrahospitāla infekcija** – infekcija, kas pacientam radusies hospitalizācijas laikā un uzņemšanas brīdī nav bijusi inkubācijas periodā.

**MRSA skrīnings** – no deguna, padusēm un/vai starpenes ņemta parauga mikrobioloģiskā pārbaude pēc epidemioloģiskām indikācijām, lai savlaicīgi identificētu MRSA nēsātājus.

Adaptēts pēc *Dumpis u.c.*, 2007.g.

## IEVADS

*S. aureus* var ierosināt plaša spektra sadzīvē un ārstniecības iestādēs iegūtas infekcijas, palielinot pacientu ārstēšanas izmaksas un palielinot mirstības risku. Globāla multirezistentu baktēriju izplatība ir nopietna sabiedrības veselības problēma. Aprēķināts, ka 8-12% Eiropas slimnīcās hospitalizētiem pacientiem novēro ar ārstniecības iestādi saistītas komplikācijas, no kurām visbiežāk sastopamās ir tieši nozokomiālās infekcijas (*Council of the European Union*, 2009). Tomēr MRSA ievērojami atšķiras no citiem multirezistentajiem mikroorganismiem ar to, ka MRSA ne tikai aizvieto MSSA kā infekcijas ierosinātāju, bet infekcija nereti pievienojas pacientiem ar nopietnu pamatslimību vai riska faktoriem, tādējādi paaugstinot *S. aureus* ierosināto infekciju incidenci (*Muder et al*, 1991 and *Stamm et al*, 1993 and, *Wyllie et al*, 2006 and, *Davis et al*, 2004 un *Dumpis u.c*, 2007). Starp multirezistentajiem grampozitīvajiem mikroorganismiem 44 % (371 200) gadījumu 2008. gadā tieši MRSA ir bijis intrahospitālo infekciju ierosinātājs Eiropas dalībvalstīs, Īslandē un Norvēģijā (ECDC, 2009). Latvijā informācija par nozokomiālo infekciju ierosinātāju izplatības biežumu dažādos stacionāros un augsta riska nodaļās, to molekulāro uzbūvi, virulences gēniem ir nepietiekama un nepilnīga. Tāpat minimāli tiek pētīti šo infekciju izraisītāju mikroorganismu antibakteriālās rezistences molekulārie mehānismi, kā arī endēmisko baktēriju savstarpējā klonālā radniecība.

Sākotnēji izplatījies kā bīstams nozokomiālo infekciju izraisītājs slimnīcās visā pasaulē, MRSA pašlaik ir kļuvis par nozīmīgu sadzīvē iegūtu patogēnu. Atšķirībā no HI-MRSA, SI-MRSA izplatās tiešā kontakta ceļā starp cilvēkiem. Pēdējā laikā sadzīvē iegūtais MRSA ir izraisījis lielu interesi, ņemot vērā tā saistību ar bērnu un jaunu cilvēku saslimšanas gadījumiem bez saskarsmes ar ārstniecības iestādēm. Satraucošs ir fakts, ka pieaug gadījumu skaits, kad SI-MRSA celmi ir saistīti ar sadzīvē iegūtu nekrotisku pneimoniju, kas nereti beidzas ar pacienta nāvi.

Savlaicīga un pareiza MRSA identificēšana ir svarīgs faktors tā ierosināto slimību apturēšanai un uzliesmojumu novēršanai. Galvenās pazīmes, kas atšķir hospitālos MRSA celmus no sadzīvē iegūtajiem, ir hospitālo riska faktoru neesamība, jutība pret lielāko daļu antimikrobiālo vielu, izņemot beta laktāmu antibiotikas, atšķirīgs hromosomālais fons, kas nesakrīt ar biežāk sastopamo intrahospitālo celmu genotipiem, IV vai V tipa SCC<sub>mec</sub>

kasete, kas ir reti sastopama intrahospitālajiem RSA celmiem un gēni, kas kodē Pantona – Valentina leukocidīnu – PVL toksīnu. Visas šīs pazīmes ir nosakāmas ar molekulārās bioloģijas metodēm.

Pēc pirmajiem HI-MRSA un SI-MRSA laboratoriski apstiprinātajiem gadījumiem 2003. gadā, bija skaidrs, ka šie patogēni ir sastopami arī Latvijā. Tomēr Latvijā cirkulējošo MRSA celmu genotipi, to izplatība, slimības un citi faktori nebija zināmi.

## 1. PROBLĒMAS AKTUALITĀTE

Pēc CDC nacionālās nozokomiālo infekciju uzraudzības sistēmas 1986.–2003. gada rezultātu analīzes secināts, ka biežāk sastopamie intrahospitālo infekciju ierosinātāji ar tendenci to skaitam pieaugt ir grampozitīvie mikroorganismi, to skaitā MRSA (*Gaynes et al*, 2005).

Vēl lielāks MRSA gadījumu skaita pieaugums radījis sabiedrībā neuzticību pret veselības aizsardzības sistēmu vispār. Tādēļ daudziem veselības aizsardzības sistēmas pakalpojumu pircējiem MRSA ierosināto invazīvo infekciju skaits ārstniecības iestādē ir viens no tās tās kvalitātes un prognozējamo gala rezultātu indikatoriem (*Kock et al*, 2010).

Galvenā un būtiskā atšķirība starp meticilīnjutīgiem un meticilīnrezistentiem *S. aureus* ir tā, ka pēdējie satur hromosomā integrētu gēnu kaseti (*Katayama et al*, 2000) jeb tā saukto *SCCmec* (*staphylococcal chromosomal cassette mec*). *SCCmec* galvenais elements ir *mecA* gēns, kas nodrošina saimnieka rezistenci pret visiem zināmiem beta laktāmiem. Lielākā daļa Eiropas valstīs izdalīto MRSA celmu *SCCmec mec A* gēna hromosomālā kasetes tipi sastopami piecos *S. aureus* klonālajos kompleksos: CC5, CC8, CC22, CC30 un CC4 (*Deurenberg et al*, 2007). Līdz šim laikam ir atklātas astoņu tipu *SCCmec* kasetes ar apakštipiem un atkarībā no tipa tās satur virkni ar patogenitāti un rezistenci saistītu gēnu. Pie kam šie rezistences gēni nodrošina *S. aureus* izdzīvošanu ne tikai antibiotiku klātbūtnē (piem., gentamicīns, eritromicīns), bet arī citos nelabvēlīgos ārējās vides apstākļos (piem., smago metālu klātbūtnē).

Papildus *S. aureus* celmi ir spējīgi producēt vismaz daļu toksīnu no visai plaša stafilokoku toksīnu arsenāla, piemēram, PVL un TSST, no kuriem pirmais kopā ar IV tipa *SCCmec* hromosomālās kasetes tipu ir sadzīvē iegūtā MRSA (SI-MRSA) molekulārie marķieri.

Latvijā vankomicīns ir izvēles preparāts MRSA ierosināto infekciju ārstēšanā. Arī citās valstīs glikopeptīdi ir standarta antibiotikas MRSA ierosināto infekciju ārstēšanā (*Gemmel et al*, 2006). Diemžēl šo antibiotiku plašā lietošana, arī Eiropā, ir VISA un VRSA celmu izplatības cēlonis, tāpēc, ordinējot šīs grupas antibiotikas infekciju ārstēšanā, jābūt stingri noteiktām indikācijām (*Finch et al*, 2006, and *Appelbaum*, 2006). Turklāt pieaug šaubas par vankomicīna efektivitāti saistībā ar stafilokoku MIC paaugstināšanos un

novērojumiem, kas apstiprina sliktu šīs antibiotikas penetrāciju audos (*Finch, 2006*). Tāpēc savukārt mazinās arī teikoplanīna efektivitāte, radot problēmas MRSA izraisītu infekciju ārstēšanā (*Tenover et al, 1998*).

Tikai vienā ziņojumā ir pieejama informācija par MRSA izplatību Latvijā 2007. gadā, bet sistemātiska MRSA izplatība un MRSA celmu molekulārā epidemioloģija līdz 2007. gadam un vēlāk nav pētīta (*Pujāte E. u. c., 2008*).

## 2. DARBA MĒRĶIS

Šī darba mērķis ir noteikt MRSA izplatības tendences daudzprofilu ārstniecības iestādē ārstētiem slimniekiem un raksturot 2004.–2010. gadā Latvijā sastopamos MRSA celmus pēc to molekulārbioloģiskās struktūras salīdzinājumā ar citām Eiropas valstīm.

## 3. DARBA UZDEVUMI

1. Noteikt MRSA izplatību un MRSA infekcijas riska grupas pacientu skrīninga efektivitāti PSKUS.
2. Pēc pirmreizējo MRSA pozitīvo asins paraugu rezultātiem salīdzināt situāciju Latvijā un citās Eiropas valstīs.
3. Veikt no 2004. līdz 2010. gadam izdalīto izvēlētu HI-MRSA un SI-MRSA celmu fenotipisko un genotipisko izpēti.
4. Analizēt iespējamo MRSA celmu epidemioloģiju Latvijā, salīdzinot to molekulārbioloģisko raksturojumu ar MRSA celmu raksturojumu citās Eiropas valstīs.

## 4. PĒTĪJUMA JAUTĀJUMI

1. Cik bieži MRSA sastop PSKUS un kādas ir šī patogēna izplatības tendences daudzprofilu slimnīcā?
2. Vai pastāv sakarība starp MRSA nēsāšanu un MRSA ierosinātu bakterēmiju PSKUS 2004.–2010. gadā?
3. Vai 2004.–2010. gadā no patoloģiskiem materiāliem izdalītie MRSA ir fenotipiski un genotipiski vienādi vai atšķirīgi un kādas ir šīs atšķirības?

4. Kāda ir MRSA ierosināto bakterēmiju izplatības tendences 2004.–2010. gadā Latvijā salīdzinājumā ar citām Eiropas valstīm?
5. Kādi MRSA celmi ir sastopami Latvijas ārstniecības iestādēs? To fenotipiskais un molekulārģenētiskais raksturojums.

### Darba hipotēze

2003. gadā pirmie MRSA laboratoristiski apstiprinātie gadījumi nav epizodiska parādība un tie ir sastopami arī Latvijā. MRSA Latvijā ir radniecīgi kaimiņvalstīs izplatītiem celmiem.

## 5. DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE

1. Izveidota Latvijas MRSA izolātu kolekcija un datu bāze Latvijas MRSA celmu molekulārbioloģiskai analīzei.
2. 2004.–2010. gadā noteikta MRSA gadījumu incidence daudzprofilu stacionārā.
3. Pirmoreiz Latvijā, izmantojot uz PCR un sekvenču noteikšanu balstītas tehnoloģijas, noteikti *S. aureus* klīniski svarīgie patogenitātes faktori: *SCCmec* tipi, toksīni, antibiotiku rezistences gēni un izstādātas metodes to noteikšanai.
4. Raksturoti Latvijā dominējošie HI-MRSA un SI-MRSA celmi.
5. Saistībā ar citās Eiropas Savienības valstīs veiktajiem pētījumiem pētīta Latvijā izdalīto MRSA celmu molekulārā epidemioloģija.
6. Veiktais pētījums ir devis pierādījumus, norādījis virzienus un metodes turpmākai zinātniski pamatotai MRSA infekciju uzraudzības kontrolei Latvijā.



## 6. LITERATŪRAS APSKATS

### 6.1. Stafilokoku taksonomija un vispārējs raksturojums

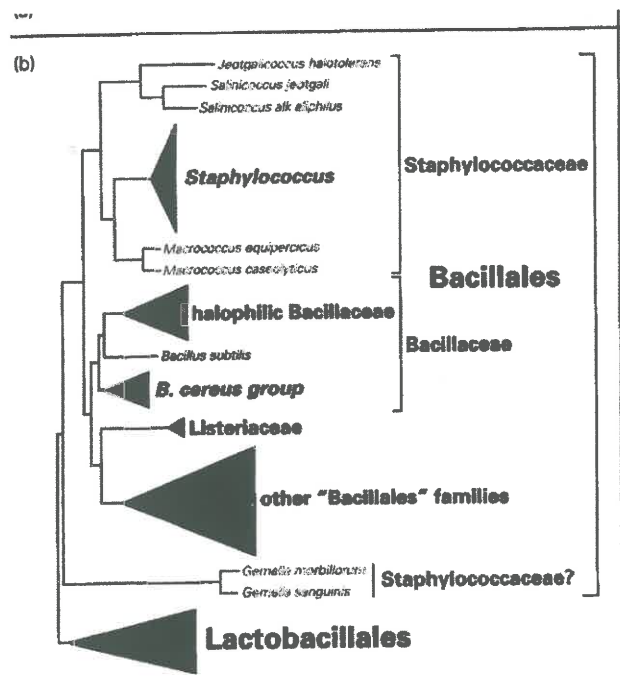
*Staphylococcus* ģints mikroorganismi ir grampozitīvas baktērijas, to šūnas ir sfēriskas, 0,5–1,5 μm diametrā, dalās vairākās plaknēs un iztriepē novietojas pa vienai, pāros vai grupās, kas atgādina vīnogu ķekaru. Tie ir nekustīgi, katalāzes pozitīvi un oksidāzes negatīvi, neveido sporas. Toleranti pret palielinātu sāls koncentrāciju, aug, ja NaCl koncentrācija ir 10% un lielāka. Augšanas temperatūras intervāls svārstās no 10 līdz 45 °C. Fakultatīvi anaerobi un spēj reģenerēt enerģiju respiratoriskā un fermentatīvā ceļā. Uz mākslīgām barotnēm aug, veidojot S tipa kolonijas (Kloos et al, 1986). Stafilokoki ikdienā saistīti ar siltasiņu dzīvnieku ādu, limfmezgliem un gļotādām, bet dažas sugas var izolēt arī no pārtikas produktiem un apkārtējās vides objektiem.

Stafilokoki pieder *Micrococcaceae* dzimtai, bet atšķirībā no citiem tās pārstāvjiem G + C daudzums *Staphylococcus* ģints mikroorganismu DNS svārstās no 30 līdz 39%, tādēļ tie pieder zemās G+C DNS grampozitīvo baktēriju filoģenētiskajai grupai (Kloos, 1997).

Morfoloģiski stafilokoki ir radušies no *Bacillus* ģints mikroorganismiem (Stackenbrant, 1981).

Stafilokoku sugas klasificē, pamatojoties uz DNS – DNS hibridizāciju (DNS līdzībām), kas noteiktas pēc to relatīvās piesaistes reasociācijas reakcijās optimālos un/vai nelabvēlīgos apstākļos (Kloos et al, 1991). Pie vienas sugas baktērijām pieskaita tos mikroorganismus, kas 70% gadījumu un vairāk saistās optimālos reakcijas apstākļos un apmēram 50% gadījumu nelabvēlīgos apstākļos. Dažādu sugu stafilokokiem DNS saistīšanās vērtība var būt zemāka par 70% optimālos apstākļos un ievērojami zemāka par 50% nelabvēlīgos apstākļos. Papildus DNS hibridizācijai, klasificējot sugas, izmanto specifiskās DNS sekvences un dažādas fenotipiskās stafilokoku īpašības, kas savstarpēji korelē un raksturo vienu klasteri. Sugu specifiskās DNS sekvences un to vietu stafilokoku hromosomā nosaka ar rRNS operonu sekvenci EcoRI fragmentos (De Buyser et al, 1992) ribotipēšanu pulsējošā lauka elektroforēzē vai arī izmanto citas molekulārās metodes.

Pēc molekulārās taksonomijas pētījumiem *Staphylococcus* dzimta ietilpst *Bacillus* – *Lactobacillus* – *Streptococcus* grupā, un šai dzimtai visradniecīgākie ir *Enterococcus*, *Bacillus* un *Listeria* dzimtu pārstāvji (Ludwig et al, 1985).



6.1. 1. att. *Staphylococcus* dzimtas filogēnētiskais koks

20 no 44 zināmajām *Staphylococcus* ģints sugām ir sastopamas cilvēkam (Eyzely, 1997, Kloss, 1997). Pēc viena no nozīmīgākajiem stafilokoku virulences faktoriem – spējas producēt brīvo koagulāzi, kas, reaģējot ar protrombīnu, veido stafilotrombīnu, *Staphylococcus* ģints baktērijas daļa divās grupās: koagulāzes pozitīvajos un koagulāzes negatīvajos stafilokokos. *Staphylococcus aureus* pieder koagulāzes pozitīvo mikroorganismu grupai, un spēja sarecināt plazmu ir visizplatītākā *Staphylococcus aureus* identificēšanas metode. Mikrobioloģiskajā laboratorijā *Staphylococcus aureus* diagnostika sugas līmenī notiek, pamatojoties uz izdalīto mikroorganismu raksturīgo morfoloģiju, šai kultūrai piemītošām bioķīmiskām īpašībām, mannitola un citu ogļhidrātu fermentāciju ar skābes veidošanos un truša plazmas koagulāciju (Mathema et al, 2009). Kā smagu, strutainu infekciju ierosinātājs *Staphylococcus aureus* ir visvairāk pētītais šīs ģints pārstāvis.

## 6.2. Stafilokoku šūnas apvalks un meticilīna rezistences evolūcija

Patogēno mikroorganismu šūnas sienai ir būtiska nozīme infekcijas procesā (Kloss et al, 1988). *Staphylococcus aureus* celmiem ir tipiska grampozitīvo baktēriju šūnas siena (Giesbrecht et al, 1998), kas atšķiras no gramnegatīvo baktēriju šūnas sienas ar to, ka grampozitīvo baktēriju šūnas siena ir biezāka un ap to nav ārējās membrānas (van Wely et al, 2001).



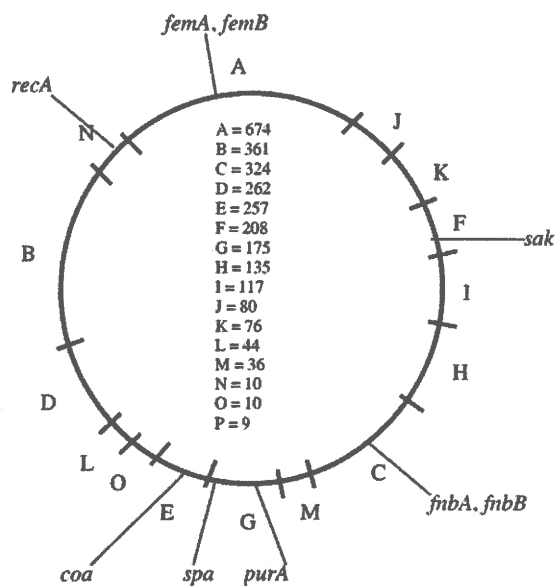
Lielāko daļu *Staphylococcus aureus* mikroorganismu celmu klāj 11 atšķirīgu seroloģisko tipu polisaharīdu kapsula. Stafilokoku šūnas siena ir veidota no peptidoglikāna slāņa, ko veido gari disaharīdu polimēri, kas ir divu cukuru N – acetil-glikozamīna un N – acetilmureīnskābes (GlcNAc-MurNAc) atkātojumi, perpendikulāri saistīti ar tetrapeptīdiem: L-alanīnu, D-glutamīnu, L-lizīnu un D-alanīnu. Atšķirībā no citiem mikroorganismiem stafilokoku šūnas sienai peptidoglikāna struktūrā ir multipli glicīna pārpalikumi starppeptīdu tiltā. *Staphylococcus aureus* producē četrus penicilīnu saistošos proteīnus (fermentus), kas nodrošina peptidoglikāna slāņa PBP1- 4 veidošanos (Labischinski, 2002). Šo dabisko penicilīnu saistošo proteīnu bioloģiskā aktivitāte ir līdzīga serinoproteāzēm un tās darbojas kā transpeptidāzes glicīna ķēžu krusteniskie savienotāji (Murakami et al, 1994; Waxman et al, 1983). PBP2 ir bifunkcionāls proteīns, kas papildus transpeptidāzes aktivitātei darbojas arī kā transglikozilāze. Beta laktāma antibiotikas saista šo PBP, kā rezultātā tiek pārtraukta normāla šūnas sienas sintēze. Vairāku antibiotiku grupu rezistences attīstībā ievērojami ir pieaugusi baktēriju šūnas sienas nozīme, tādēļ ir svarīgi zināt to iedarbības vietu. Piemērs ir rezistences attīstības evolūcijas pētījumi un šajā gadījumā *Staphylococcus aureus* metecilīna rezistence. Vairāki pētījumi liecina ka, iespējams, dzīvnieku komensālās floras pārstāvja *Staphylococcus sciuri* vietējais gēns evolūcināri ir relatīvi tuvs *Staphylococcus aureus* *mecA* rezistences gēna prekursoram (Couto et al, 1996, Wu et al, 1996).

Lai gan lielākā daļa *Staphylococcus sciuri* celmu ir jutīgi pret beta laktāmu antibiotikām, dažiem celmiem ir konstatēta oksacilīna un metecilīna rezistence, kas saistīta ar izmaiņām *mecA* gēna izpausmes reģionā kā punkta mutācija *mecA* gēnā vai kā spēcīgāka gēna izpausme (Couto et al, 2003).

2005. gadā ASV tika veikti pētījumi, kuros *mecA* homologs no oksacilīna rezistentā *Staphylococcus sciuri* celma tika ievadīts oksacilīna jutīgā *Staphylococcus aureus* šūnā un tika novērots, ka augstas šīs antibiotiku koncentrācijas klātbūtnē *Staphylococcus aureus* šūnas sienas sintēze turpinās, tomēr to struktūrā ir radušās izmaiņas. Tā kā *Staphylococcus aureus* šūnas sienas teihonskābēm ir būtiska nozīme makroorganisma kolonizācijā un infekcijā, iespējams, ka fermentus, kas iesaistīti teihonskābes biosintēzē, varētu izmantot par antibakteriālo preparātu iedarbības mērķi (Brown et al, 2008).

### 6.3. *Staphylococcus aureus* genoms

Dažādu ģenētisko *Staphylococcus aureus* marķieru genomiskās pozīcijas tika atzīmētas, veidojot genoma fizikālās kartes. *Staphylococcus aureus* hromosomālo karšu veidošana sākās, definējot trīs saistību grupas, kas sastāvēja no deviņiem auksotrofiskiem marķieriem un novobiocīna rezistences marķiera, nosakot *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (Pattee, Nevelin 1975). *Staphylococcus aureus* celma NCTC 8325 genoms ir apmēram 2800 kb un satur 16 *Sma*I restrikcijas saitus. Lietojot daudzus papildmarķierus un pētījumos izmantojot pulsējošā lauka elektroforēzi un tai sekojošu hibridizāciju, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 fizikālā karte kļuva precīzāka, taču ģenētisko marķieru savstarpējais attālums palika nezināms, kamēr netika sekvenēti vairāki *Staphylococcus aureus* celmi (Wada et al, 1993). 6.3.1. attēlā redzama *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 *Sma*I restrikcijas fragmentu fizikālā karte un identificēto marķieru atrašanās pozīcijas (Panlilio et al, 1992).



6.3.1. att. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 fizikālā karte ar *Sma*I restrikcijas fragmentiem A-P, to izmēriem kilobāžu pāros un identificēto ģenētisko marķieru piemēri (*femA*, *femB* – meticilīna rezistences faktori, *sak* – stafilokināzes gēns, *fnbA*, *fnbB* – fibronektīnu saistošo proteīnu A un B gēni, *purA* – adenīna biosintēzes faktors, *spa* – proteīna A gēns, *coa* – koagulāzes gēns, *recA* – rekombināzes gēns) (Panlilio et al, 1992).

Līdz ar genoma sekvenēšanas un citu genoma analizēšanas metožu izmantošanu ir paplašinājušās zināšanas par baktēriju struktūru un funkcijām. Sanger institūts Oksfordā (Lielbritānija) ir publicējis divu *Staphylococcus aureus* celmu: Lielbritānijā sastopamā,

intrahospitalā oksacilīna rezistentā celma EMRSA-16(MRSA252) un hipervirulentā, sadzīvīvē iegūtā *Staphylococcus aureus* (MSSA) celma (MSSA476) 2,8Mb sekvencēšanas rezultātus ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_aureus/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_aureus/)). Intensīvi turpinās piecu *Staphylococcus aureus* celmu genomu: COL, NCTC8325, N315, Mu50 un MW2 izpēti. (<http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR@/CMRHomePage.spl>, <http://www.genome.ou.edu/staph.html>) (*Baba et al*, 2002; *Karoda et al*, 2001).

Līdz ar genoma sekvenēšanas un citu jaunu genoma izpēti metožu ieviešanu praksē ir paplašinājušās zināšanas par baktēriju struktūru un funkcijām. Gandrīz puse no N315 *Staphylococcus aureus* celma proteīniem ir līdzīga analogiem *Bacillus subtilis* vai *Bacillus halodurans* proteīniem, kas kodē tādas organisma pamatfunkcijas kā DNS replikācija, proteīnu sintēze un regulē oglehidrātu metabolismu (*Karoda et al*, 2001).

#### 6.4. *Staphylococcus aureus* virulences faktori

Lai arī koagulāzes producēšana ir viens no būtiskiem faktoriem, kas atšķir *Staphylococcus aureus* no citām stafilokoku sugām, kā virulences faktoram tai ir maza nozīme, un *Staphylococcus aureus* patogenitāti nosaka citi faktori, ko pierāda pētījumi par *Staphylococcus aureus* virulenci mutācijās koagulāzes gēnā (*coa*). (*Baddour et al*, 1994, *Morreillon et al*, 1995, *Phonimdaeng et al*, 1990, *Stutzmann et al*, 2001). *Staphylococcus epidermidis* genomam, salīdzinot ar *Staphylococcus aureus*, ir sintētisks 1681 atvērtas nolasīšanas sistēmas serdeņa genoms (*open reading frame-ORFs*), bet *Staphylococcus aureus* ir 18 sugas atkarīgas „genoma saliņas”, kurās atrodas dažādi virulences faktorus kodējoši gēni, kas var variēt atkarībā no *Staphylococcus aureus* celma. Dažādu specifisku virulences faktoru un *Staphylococcus aureus* ierosināto slimību klīniskās izpausmes apkopotas 6.4.1.tabulā.

6.4.1. tabula

##### *Staphylococcus aureus* virulences faktori. Adaptēts pēc (*Smeltzer et al*, 2009)

Gēns	Produkts	Funkcija patoģenēzē
<b>Šūnas sienas komponentes</b>		
	Teihonskābe	Adhezīns
	Lipoteihonskābe	Adhezīns
	Peptidoglikāns	Adhezīns
<b>Virsmas adhezīni</b>		
<i>cna</i>	Kolagēna adhezīns	Adhezīns, kolagēnu saturošos audos
<i>Bbp</i>	Kaulu sialolbaltumvielu saistošais proteīns	Adhezīns, kaulu sialproteīna molekulās

Gēns	Produkts	Funkcija patoģenēzē
<i>sdrE</i>	Ar serīna-asparātu bagāts proteīns E	Adhezīns, nezināms
<i>Spa</i>	Proteīns A	Nomāc fagocitozi. Saista Ig fragmentu Fc. Antifagocitāra darbība
<i>fmbA, fnB</i>	Fibrinogēnu saistošais proteīns A un B	Adhezīns, fibronektīns
<i>clfA, clfB</i>	Salipšanas faktors A un B	Darbojās antifagocitāri
<i>sdrC, sdrD, sdrE</i>	Serīna-asparāta atkārtojumu proteīns	Adhezīns, nezināms
<i>Sas gēni</i>	<i>S. aureus</i> virsmas proteīni	Adhezīns, nezināms
<b>Sekretētie adhezīni</b>		
<i>Efb</i>	Ekstracelulārais fibrinogēnu saistošais proteīns	
<i>emp</i>	Ekstracelulārais matrici saistošais proteīns	
<i>Eap</i>	Ekstracelulārais adhezīvais saistošais proteīns (EAP)	
<b>Eksopolisaharīdi</b>		
<i>cap gēni</i>	Kapsulārais polisaharīds	Nomāc fagocitozi. Darbojas antifagocitāri
<i>icaADBC</i>	Polisaharīdu intracelulārais adhezīns	Veido biofilmas
<b>Eksotoksīni</b>		
<i>Hla</i>	$\alpha$ – toksīns	Lizē šūnu
<i>Hlb</i>	$\beta$ – toksīns	Lizē šūnu
<i>Hld</i>	$\gamma$ – toksīns	Lizē šūnu
<i>Luk-F-PV, lukS-PV</i>	<i>Panton-Valentine</i> leukocidīns	Inhibē leukocītu darbību
<i>etA, etB, etC, etD</i>	Eksfoloatīvais toksīns	Nekrotizē superficiālo ādas slāni, ir superantigēns, kā rezultātā izvairās no organisma imūnsistēmas.
<i>tstH</i>	Toksiskā šoka sindroma toksīns (TSST)-1	Superantigēns
<i>seA, seB, seC, seD, seF, seG, sel, selH, selJ-sel-V</i>	Stafilokoku enterotoksīni	Superantigēns
<b>Fermenti</b>		
<i>sspA</i>	Serīna proteāzes	Nav zināms
<i>sspB</i>	Cisteīna proteāze	Nav zināms
<i>clpX, clpP</i>	CipX, CipP	Regulē virulences faktorus
<b>Dzelzs piesaiste</b>		
<i>isd gēni</i>	Ar dzelzi reaģējošas virsmas determinantes	Saista hemoglobulīnu

Gēns	Produkts	Funkcija patoģenēzē
<i>sbnABCDEFGHI</i>	Stafilobaktīns	<i>Siderophre</i>
<i>stbA</i>	Transferīnu saistošais stafilkoku proteīns A	Saista transferīnu
<b>Regulatori</b>		
<i>Agr</i>	Acesoru gēnu regulators	<i>Quorum sensing</i>
<i>sar gēni</i>	Stafilokoku acesoru regulators	Agr regulators, regulē ekstracelulāro un virsmas asociēto virulences faktoros
<i>saeRS</i>	<i>S. aureus</i> eksproteīna ekspresija	Regulē eksotoksīnu
<i>srrAB</i>	Stafilokoku respiratoriskā atbilde	Atbild uz skābekļa līmeni
<i>vraSR</i>	Divkomponentu atbildes regulators	Agr regulators, atbild uz pret šūnas sienu aktīvām antibiotikām, paaugstina rezistenci pret vankomicīnu un beta laktāmiem
<i>graSR</i>	Divkomponentu atbildes regulators	Nodrošina rezistenci pret vankomicīnu un antimikrobiālajiem peptīdiem
<i>apsRS</i>	Divkomponentu atbildes regulators	Nodrošina rezistenci pret antimikrobiālajiem peptīdiem
<i>alsSD</i>	Divkomponentu atbildes regulators	Veido biofilmas un iedarbojas uz šūnas integritāti
<i>Spx</i>	Metabolisma ceļa regulators	Atbild uz stresu, veido biofilmas
<i>Msa</i>	<i>sarA</i> modulators	Paaugstina <i>sarA</i> un virulences faktoru ekspresiju <i>sarA</i> kontrolē
<i>mufF</i>	Peptidoglikāna sintēze	Ietekmē ar šūnu asociēto un ekstracelulāro virulences faktoru ekspresiju

\* Tabulā ir apkopoti *Staphylococcus aureus* virulences faktori, kas ir iesaistīti stafilokoku virulencē un modeļos, kuriem, iespējams, ir nozīme virulencē. Dažu virulences faktoru lomas noteikšana ir problemātiska un 6.4.1. tabulā ir minēti tikai apstiprinoši pētījumi.

### 8.5. *Staphylococcus aureus* rezistences gēni

*Staphylococcus aureus* raksturo nekontrolēta tieksme attīstīt rezistenci pret antibiotikām. 1940. gadā pēc penicilīna ieviešanas ārstēšanā ātri attīstījās penicilīna rezistence, un pēc 1946. gadā veikto pētījumu datiem jau 605 no slimnīcu celmiem bija rezistenti pret penicilīnu (Barber, Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Ap 20. gs. 70. gadiem jau bija zināmi *Staphylococcus aureus* celmi, kas bija rezistenti pret vairāk nekā 20 antimikrobiālajām vielām (Lyon et al, 1987). Stafilokokiem ir dažādas rezistences determinantes, kas ir kodētas galvenokārt plazmīdās vai mobilajos ģenētiskajos elementos. Šīs determinantes mediē rezistenci caur dažādiem bioķīmiskajiem procesiem (skat. 8.5. tabulu), kurus var klasificēt šādās grupās (Paulsen et al, 1997):

- 1) inaktivācijas mehānismi ,
- 2) bifāzes mehānismi ,
- 3) antibiotikas piesaistes vietas maiņa ,
- 4) Efluksa mehānisms ,
- 5) sekvestrācija.

Dažādu antibiotiku grupām šie mehānismi ir atšķirīgi.

### ***Aminoglikozīdi***

Aminoglikozīdi nomāc mikroorganisma šūnas proteīnu sintēzi, piesaistoties 30S ribosomālai subvienībai.

Galvenie stafilokoku aminoglikozīdu rezistences mehānismi ir saistīti ar aminoglikozīdu inaktivāciju ar tādiem šūnas enzīmiem kā aminoglikozīdu aminotransferāzes (AAC), adeniltransfrāzes (AAD) vai fosfotransferāzes (AACs). Šādi enzīmu modificēti aminoglikozīdi vairs nespēj pieaistīties ribosomām un līdz ar to nomākt mikroorganismu šūnas sintēzi (*Albelda et al*, 1994).

Stafilokoku rezistenci pret gentamicīnu un līdz ar to pret tobramicīnu un kanamicīnu mediē bifunkcionāls enzīms ar AAC(6') un APH(2'') aktivitāti. *aacA-aphD* gēns, kas kodē šo enzīmu, ir klonēts no pSK1 plazmīdas un sekvenčēts (*Rouch et al*, 1987), jo tas ir *Enterococcus faecalis* gēna ekvivalents (*Ferretti et al*, 1986). Aminorskābju sekvenčēšanas rezultāti parāda, ka, iespējams, enzīmam ir divi dažādi N termināla un C termināla domēni. *aacA-aphD* gēns atrodas Tn4001 transpozonā un Tn4001 un Tn4001 – līdzīgi ģenētiskie elementi ir atrasti un plaši izplatīti gan *S. aureus*, gan arī CoNS celmos pSK1 dzimtas plazmīdās un hromosomās. Rezistenci pret neomicīnu, kanamicīnu, tobramicīnu un amikacīnu stafilokokos mediē AAD(4') un AAD(4''), kuru kodē *aadD* gēns, kuru nereti nes mazas plazmīdas, piemēram, pUB110. Ir noteikti arī stafilokoku streptomicīna rezistences gēni: augsta līmeņa rezistence pret streptomicīnu ir saistīta ar hromosomālām mutācijām (*strA*), kas ietekmē ribosomas (*Lacey et al*, 1972). Zema līmeņa krusteniskā rezistence pret lielāko daļu aminoglikozīdu ir saistīta ar hromosomu mutācijām, kas maina šūnas membrānas aminoglikozīdu caurlaidību (*Phillips et al*, 1984).



### *Makrolīdi, linkozamīdi, streptogramīni*

Makrolīdiem (piem., eritromicīnam un oleandomicīnam), linkozamīdiem (piem., linkomicīnam un klindamicīnam) un streptogramīnu antibiotikām ir bakteriostatiska iedarbība uz mikroorganisma šūnu, piesaistoties 50S ribosomālai subvienībai un tājēdādi bloķējot mikroorganisma šūnas proteīnu sintēzi. Eritromicīnu, klindamicīnu un linkozamīdu plaši lieto stafilokoku izraisītu infekciju ārstēšanai, tāpēc ir ievērojami pieaugusi stafilokoku rezistence pret šīm antibiotikām. Streptogramīnu antibiotikas sastāv no divām komponentēm: A un B komponentes (piem., pristinamicīns I un II). Pristinamicīnu Eiropā lieto kā antistafilokoku preparātu, bet rezistence pret to saglabājas zema (Horinouchi et al, 1982). Ir identificētas trīs homologas determinantes: *ermA*, *ermB* un *ermC*, kas nodrošina rezistenci pret MLS antibiotikām, modificējot antibiotiku piesaistes vietu ribosomā. Vislabāk tās raksturo tieši *ermC* determinante, kas kodē enzīmu metilāzi, kas savukārt katalizē adenīna pārpalikuma N<sup>6</sup> dimetilāciju RNS 23S ribosomālā subvienībā, tādejādi reducējot līdzību starp antibiotiku un ribosomu (Weisblum, 1985), *ermC* gēnu tipiskā atrašanās vieta ir tādās mazajās stafilokoku plazmīdās kā pE194 (Horinouchi et al, 1982), *ermC* ekspresija ir inducējama un tiek regulēta mRNS sekundārā struktūrā, jo ir paredzēta *cat* regulācijai. Arī *ermA* gēns nodrošina inducēto rezistenci pret MLS antibiotikām, bet tas ir kodēts Tn554 transpozonā. Tn554 transpozonā ir iekodēts arī spektinomicīna rezistenci nodrošinošais *spe* gēns. Ir izpētīts, ka Tn554 parasti ieslēdzas *S. aureus* hromosomā noteiktā vietā, bet ir sastopami stafilokoku mutanti, kuros Tn554 transpozons atrodas citā vietā, piemēram, *mec* gēna rajonā. *ermB* gēns nodrošina konstitucionālo rezistenci pret MLS antibiotikām un ir konstatēts dažās beta laktamāzes/smago metālu rezistentajās plazmīdās, piemēram, p1258, kas savukārt iekodējas Tn551 transpozonā. Tn551 transpozons ir daļēji sekvenēts un transpozīcija demonstrēta *in vivo* (Khan et al, 1980). Atšķirībā no *erm* gēniem *msrA* gēns nodrošina rezistenci tikai pret tādiem 14 un 15 gredzenu makrolīdiem kā eritromicīns, iespējams ar *effluks* mehānismu. *msrA* gēns parasti ir iekodēts plazmīdās un ir plaši sastopams klīniskajos *S. epidermidis* celmos, bet ir sastopams arī *S. aureus* celmos. Eritromicīna rezistences epidemioloģiskajos pētījumos konstatēts, ka *ermC* un *msrA* ir biežākais eritromicīna rezistences cēlonis, bet *ermA* un *ermB* sastop samērā reti (Eady et al, 1993, West et al, 1995).

Četras stafilokoku determinantes *vat*, *linA*, *vatB* un *vgb* mediē linkozamīdu rezistenci, fermentatīvā ceļā modificējot šīs grupas antibiotikas. Stipri līdzīgos linkomicīna rezistences gēnu *slinA* klonēja un sekvencēja, kad tie bija izdalīti no *S. aureus* un *S. haemolyticus*

(Brisson Noel et al, 1986, Brisson Noel et al, 1988). *lin A* gēnu nes tādas mazās stafilokoku plazmīdas kā pIP855. *Lin A* produkts datubāzē nav līdzīgs nevienam citam proteīnam, bet tam ir motīvi, kas saistīti ar ATP vai GTP piesaistīšanos. *linA* produkts daļēji iegūts ir attīrītā veidā un noteikts, ka tas darbojas kā o-nukleotidiltransferāze.

### ***Tetraciklīni***

Tetraciklīni ir bakteriostatiskas iedarbības antibiotikas, kas piesaistās 30S ribosomālai subvienībai, aizkavējot stabilu saistību ar aminoacil-tRNS un līdz ar to nomācot proteīnu sintēzi. Tetraciklīnu antibiotikas plaši lieto medicīnas praksē, bet ne stafilokoku izraisītu infekciju gadījumā. Dažās valstīs tetraciklīnu un minociklīnu lieto multirezistentu stafilokoku ārstēšanā. Ir aprakstīti divi stafilokoku rezistences mehānismi pret tetraciklīnu. Viens no tiem ir hromosomās kodētais *tetA(M)*, kas nodrošina rezistenci pret tetraciklīnu un tā pussintētiskajiem analogiem, piemēram, minociklīnu. *tetA(M)* gēns ir klonēts un sekvenčēts, konstatējot, ka tam ir liela sekvenču līdzība nukleotīdā un aminoskābju secībā ar M klases *tet* determinantēm citos grampozitīvajos un gramnegatīvajos mikroorganismos, piemēram *tetA(M)* gēns konjugatīvajā transpozonā Tn916 un Tn1545 (Ferretti et al, 1986). Southern hibridizācijas analīze liek domāt, ka *S. aureus tetA(M)* gēns nav saistīts ar Tn916 transpozonu un nav norādījumu, ka šis gēns vispār atrodams stafilokoku transpotelementos. *S. aureus tetA(M)* gēnu ekspresiju inducē tetraciklīns (Nesin et al, 1990). Otrs stafilokokos identificētais tetraciklīnu rezistences mehānisms ir ir aktīvs antibiotiku *effluks* no šūnas, ko nodrošina divos gēnos *tet(K)* un *tetA(L)* kodētā informācija. Abi gēni nodrošina inducējamu rezistenci tikai pret tetraciklīnu un atrasti stafilokoku mazajās plazmīdās pT181, kā arī hromosomā, pateicoties IS257-mediētai pT181 tipa plazmīdas integrācijai tajā (Gillespie et al, 1986, Stevadt et al, 1994).

### ***Hinoloni***

Hinolonu antibiotikas iejaucas par šūnas DSN replikāciju un labošanu atbildīgās DNS girāzes funkcijās. Plaši lietojot hinolonus grampozitīvo un gramnegatīvo mikroorganismu izraisītu infekciju ārstēšanā, ātri ir izveidojusies rezistence pret šīm antibiotikām. *S. aureus* celmos ir atrasti trīs lokusi, kas ir iesaistīti rezistences nodrošināšanā pret hinoloniem. Pirmais ir DNS girāzes pārveide, kas ir tetrametrisks enzīms ar divām subvienībām (A un B) un kura darbība ir kodēta *gyrA* un *gyrB* gēnos. Salīdzinot *E. coli* un *S. aureus gyrA* un *gyrB* gēnu mutantus, izrādījās ka to novietojums šūnas ģenētiskajā informācijā ir ekvivalents (Ito et al, 1994). *gyrA* un *gyrB* hinolonu rezistentu mutantu transformācija ar dabiskajām *gyrA*

un *gyrB* plazmīdām apstiprināja šo celmu hinolonu jutību, apliecinot, ka mutācijas *gyrA* un *gyrB* gēnos izraisa šo rezistenci (Ito et al, 1994). Otra zema līmeņa rezistence pret hinoloniem, domājams, ir saistīta ar mutācijām *S. aureus* hromosomu *grlA* gēnā (Ferrero et al, 1994). Trešais rezistences mehānisms ir hromosomāli kodēta *effluks* mehānisma sistēma, ko nodrošina *norA* gēnā kodētā informācija (Yoshida et al, 1990).

### **Glikopeptīdi**

Tādas glikopeptīdu antibiotikas kā vankomicīns un teikoplanīns veido kompleksus ar peptidil-d-Ala-d-Ala terminālo glikopeptīda slāni, kas nodrošina šūnas ārējās sienas veselumu, kā rezultātā tiek nomākti transglikolizācijas un transpeptizācijas posmi šūnas sienas sintēzē. VRSA un VISA/hVISA rezistences mehānismi ir atšķirīgi. VRSA ir iegūtā rezistence, kodēta *van A* gēna klasterī (Woodford et al, 1995, Weigel et al, 2003, Tenover et al, 2004). Domājams, ka VISA/hVISA celmiem ir mutāciju radīta rezistence. Lai arī rezistences ģenētiskie mehānismi vēl līdz galam nav skaidri, ir ziņojumi par šūnas sienas struktūras un biosintēzes procesu izmaiņām, kas rada „līdzības slazdus” vankomicīnam un novērš tā molekulu nonākšanu darbības vietā citoplazmatiskajā membrānā (Hanaki et al, 1998 and Cui et al, 2000 and Avison et al, 2002). Pirmie ziņojumi par VISA parādījās 1996. gadā (Hiramatsu, 1998). Arī klīniski VRSA iedala divās grupās pēc MIC; izolātus ar MIC 4-8mg/l pieskaita VISA, bet izolātus ar MIC 16mg/l un augstāk VRSA (Hiramatsu, 1998).

Par VISA un VRSA ir ziņojumi no dažādās vietās esošām pasaules valstīm. 2002. gadā parādījās pirmais ziņojums par VRSA ASV (Goldrick 2002, Centers for Disease Control and Prevention, 2002). Pētījumā, kas laikā no 2002. līdz 2005. gadam tika izdarīts Indijas ziemeļu daļā, no izdalītajiem 783 *S. aureus* celmiem divi multipli rezistenti izolāti bija VRSA ar MIC 32 mg/l un 64 mg/l, sešus *S. aureus* izolātus pieskaitīja VISA ar MIC 16mg/l 9 4 izolāti) un četrus – MIC 8mg/l (divi izolāti). VRSA celmus izolēja no dažādās nodaļās guļošu pacientu strutām, kuri 20 dienas bija saņēmuši glikopeptīdu terapiju. Vankomicīna terapija šajā gadījumā bija neefektīva, pacienti nomira no MRSA komplikācijām, kas radās pamatsaslimības dēļ (Ghoshal et al, 2006). Eiropas Antimikrobiālā uzraudzības tīkla datu bāzes dati liecina, ka 2008. gadā ir ziņojumi par 11 VISA gadījumiem (Austrijā, Ungārijā, Lielbritānijā) un diviem VREA Austrijā (EARSS Annual Report, 2008).

**S. aureus** antibiotiku rezistences gēni. Adaptēts pēc (Berger-Bachi et al, 2009)

Rezistences gēns	Antibiotika	Rezistences mehānisms	Rezistences gēna lokalizācija
<i>aacA-aphD</i>	Gen,Tm,Km	Modificēšana ar 6'acetiltransferāzi/2''fosfotransferāzi	p,c,t
<i>aadD</i>	Sm,Km	Modificēšana ar 3'',9' adeniltransferāzi	p
<i>aadE</i>	Sm	Modificēšana ar 4',4'' adeniltransferāzi	p
<i>aphA</i>	Nm,Km	Modificēšana ar 6'adeniltransferāzi	p, c, t
<i>aphC</i>	Sm	Modificēšana ar 3'fosfotransferāzi	p
<i>Arsb</i>	Arsenīts/antimons	Aktīvs eksports	p, c
<i>arsC</i>	Arsenāti	Arsenātu reducēšana par arsenītiem	p, c
<i>blaZ</i>	<i>Penicillin</i>	Inaktivēšana ar beta laktamāzi	p, c, t
<i>Ble</i>	<i>Bleomycin</i>	Sekvestrēšana	c
<i>cadA</i>	Kadmijs/cinks	Aktīvs eksports	p
<i>cadB</i>	Kadmijs/cinks	Sekvestrēšana (?)	p, c
<i>Cad</i>	Kadmijs	Aktīvs eksports	c
<i>Cat</i>	<i>Chloramphenicol</i>	Inaktivēšana ar hloramfenikolacetiltransferāzi (CAT)	p
<i>Ddh</i>	Glikopeptīdi	d-laktāta dehidrogenāzes pārprodukcija	c
<i>dfrA</i>	<i>Trimethoprim</i>	alternatīvas dihidrofolātreduktāzes producēšana	p, t?
<i>ermA</i>	MLS	rRNS metilācija	c, t
<i>emB</i>	MLS	rRNS metilācija	p, t
<i>ermC</i>	MLS	rRNS metilācija	p
<i>fosB</i>	<i>Fosfomycin</i>	Inaktivēšana ar <i>glutathion-s-transferāzi</i>	p
<i>fusA</i>	Hinoloni	Piesaistes vietas maiņa	c
<i>fusB</i>	Fuzidinskābe	Šūnas sienas caurlaidības samazināšanās	p
<i>gyrA/B</i>	Hinoloni	Piesaistes vietas maiņa DNS girāzē	c
<i>grlA</i>	Hinoloni	Piesaistes vietas maiņa DNS topoizomerāzē IV	c
<i>Lina</i>	<i>Lincomycin</i>	O - nukleotidiltransferāzes modifikācija	p
<i>mecA<sup>c</sup></i>	<i>Methicillin</i>	Alternatīva PBP2 producēšana	c, t?
<i>merA<sup>d</sup></i>	Merkurijs	Detoksifikācija ar merkurija reduktāzi	p, c, t?
<i>merB<sup>d</sup></i>	Organo merkurāli	Detoksikācija ar organomerkurijliāzi	p, c, t?
<i>mrsA</i>	MS	Aktīvs eksports	p
<i>mupA</i>	<i>Mupirocin</i>	Modifivētas tRNS sintēzes producēšana	p, c
<i>norA</i>	Fluorkvinoloni	Aktīvs eksports	c
<i>Nov(gyrB)</i>	<i>Novobiocin</i>	Piesaistes vietas maiņa DNS subvienībā B	c
<i>qacA</i>	Organiskie katjoni	Aktīvs eksports	p
<i>qacB</i>	Organiskie katjoni	Aktīvs eksports	p
<i>qacC(smar)</i>	Organiskie katjoni	Aktīvs eksports	P

<i>Rif</i>	<i>Rifampin</i>	Piesaistes vietas maiņa RNS polimerāzē	c
<i>Spc</i>	<i>Spectinomycin</i>	Modificēšana ar 9'adeniltransferāzi	c, t
<i>Str</i>	<i>Streptomycin</i>	Modificēšana ar 6'adeniltransferāzi(?)	p
<i>strA</i>	<i>Streptomycin</i>	Ribosomu izmaiņa	c
<i>Sula</i>	<i>Sulfonamidi</i>	p-aminobezoiskābes pārprodukcija	c
<i>sulB</i>	<i>Sulfonamidi</i>	Nezināms	p
<i>tetA(K)</i>	<i>Tetracycline</i>	Aktīvs eksports	p
<i>tetA(L)</i>	<i>Tetracycline</i>	Aktīvs eksports	p
<i>tetA(M)</i>	<i>Tetracycline</i>	Ribosomu aizsargāšana	c
<i>triA</i>	<i>Triclosan</i>	Nezināms	p
<i>Trib</i>	<i>Triclosan</i>	Nezināms	c(?)*
<i>Vat</i>	<i>SgA</i>	Modificēšana ar acetiltransferāzi	p,c
<i>vatB</i>	<i>SgA</i>	Modificēšana ar acetiltransferāzi	p
<i>Vga</i>	<i>SgA</i>	Aktīvs eksports(?)	p
<i>vgb</i>	<i>SgB</i>		p

\*? – domājama lokalizācija/rezistences veids, p – gēnu lokalizācijas vieta plazmīdās. c – gēnu lokalizācijas vieta hromosomā, t – gēnu lokalizācijas vieta transpozionos.

Multipla *S. aureus* rezistence, arī pret biežāk lietotām glikopeptīdu grupas antibiotikām nākotnē var būt nopietna problēma MRSA ierosinātu infekciju gadījumā ārstēšanā.

## 6.6. Meticilīnrezistentais *S. aureus*

### 6.6.1. MRSA meticilīnrezistence

Termins meticilīnrezistentais *Staphylococcus aureus* (MRSA) tiek lietots, lai aprakstītu celmus, kas ir rezistenti pret beta laktāmu antibiotikām, producējot izmainītu penicilīnu saistošo proteīnu (PBP2'). MRSA izolātiem ir lieli DNS iestarpinājumi, kuros lokalizēts *mecA* gēns, kas kodē PBP2'. MRSA ir rezistenti pret visiem beta laktāmiem, iekļaujot trešās paaudzes cefalosporīnus un karbapenēmus.

Klīniski visbūtiskākā un arī prevalējošā meticilīna rezistences forma ir saistīta ar papildus penicilīna saistošā proteīna PBP2a vai PBP2' producēšanu (Reynolds, 1986). Iespējams, ka PBP2' ir izveidojies, rekombinējoties penicilināzes gēnam un PBP gēnam tāpat kā PBP2 un PBP3 *Escherichia coli* baktērijās. PBP2' ir neparasti zema beta laktāmu antibiotiku saistīšanas afinitāte, aizstājot dabiskos penicilīnu saistošos proteīnus (PBP). Beta laktāmi nevar piesaistīties PBP2', tādēļ netiek kavēta baktēriju šūnu sienu būvēšana (Reynolds, 1986). Taču tikai PBP2' producēšana neizveido optimālo ekspresiju meticilīna rezistencei. Dabiskais PBP2 beta laktāmu klātbūtnē veic glikānu ķēdes elongācijas

transglikozilāzes funkciju, PBP2' ir nepieciešams transpeptidāzes funkcijai (Pinho et al, 1997).

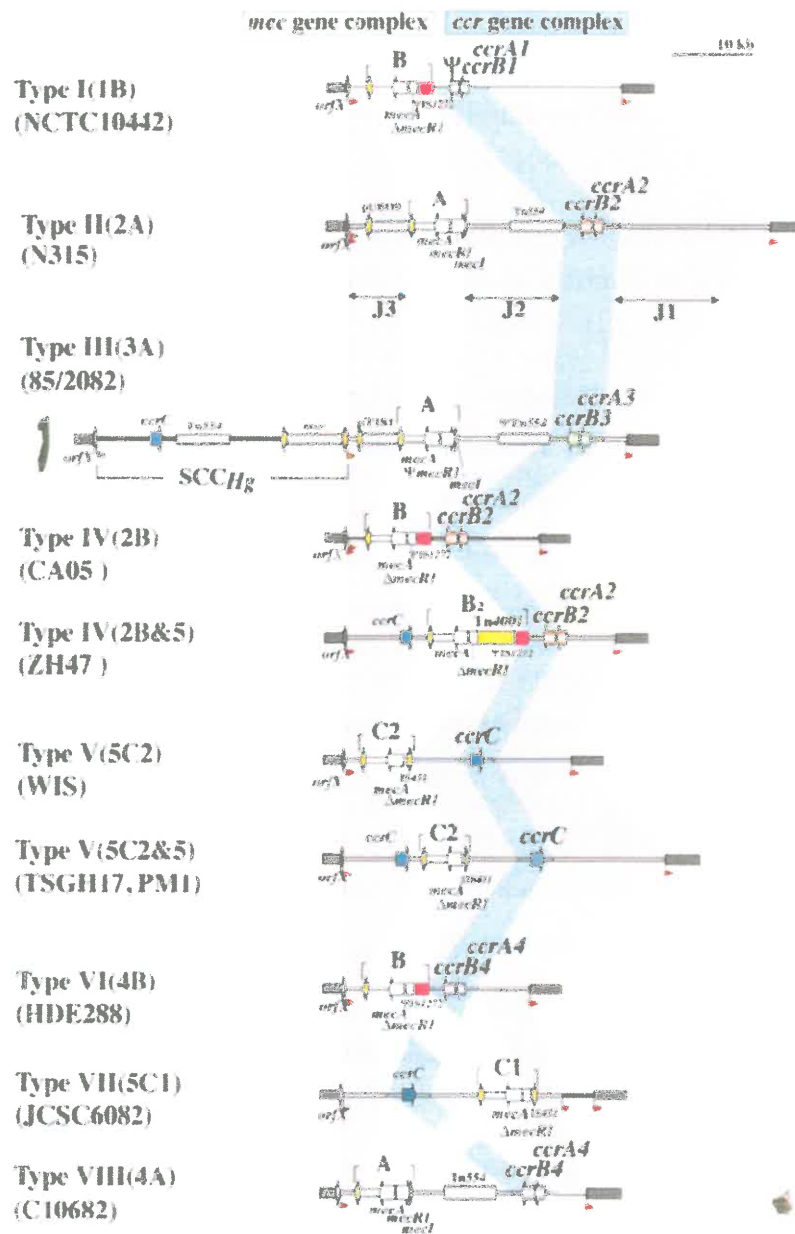
#### 6.6.2. SCCmec molekulārā uzbūve, celmu izplatība un MRSA molekulārās izmeklēšanas metodes

MRSA rodas, meticilīnjutīgajam *S. aureus* iegūstot SCCmec kaseti (staphylococcal cassette chromosome *mec*) (Feil et al, 2003). SCCmec kasete ir mobils ģenētiskais elements, kas satur *mecA* gēnu un tā regulatoros gēnus. Šo ģenētisko kasešu izmēri variē, un tās var saturēt citus mazākus integrētos elementus (plazmīdas, IS) un citus gēnus (Katayama et al, 2000).

PBP2' kodē *mecA* gēns, kas ir DNS reģiona daļa no stafilokoku kasetes hromosomas *mec* (SCCmec), kas atrodama meticilīnrezistentajos *S. aureus* izolātos, bet kuru nav meticilīnjutīgajos izolātos (Berger-Bachi, 1999). SCCmec vienmēr atrodas vienā un tajā pašā *S. aureus* hromosomas reģionā starp *spa* gēnu, kas kodē proteīnu A, un *purA* gēnu, kas nepieciešams adenīna biosintēzei. Šai hromosomālajai reģiona sekvencei, kurā integrēta SCCmec, ir liela homologija starp dažādiem celmiem. Ir izdalīti pieci strukturāli atšķirīgi SCCmec tipi (SCCmec I-V) un daži apakšvarianti (Okuma et al, 2002). Visiem SCCmec tiptiem ir kopīgas iezīmes, iekļaujot *mecA* gēnu un tā regulatorā reģiona daļas un *ccrA* un *ccrB* gēnus. Gēni *mecR1* un *mecI* kodē *mecA* regulatoros proteīnus, MecR1 ir signālproteīns ar penicilīnsaistošu domēnu un transmembrānu domēnu, MecI ir gēna *mecA* represoriskais proteīns (Kuwahara – Arai et al, 1996). Gēni *ccrA* un *ccrB* kodē rekombināzes CcrA un CcrB. Šie fermenti ir atbildīgi par saita un orientācijas specifisku SCCmec integrāciju un izgriešanu (Katayama et al, 2000). 8. 8.6.2.1. attēlā parādīti dažādi SCCmec kasešu tipi, kas tiek definēti pēc *ccr* gēnu kompleksa tipa un *mecA* gēna klases (Oliveira et al, 2002).

I tipa SCCmec kasetē ir 1. tipa *ccr* komplekss un B klases *mecA* gēns (IS1272-*mecR1-mecA*), II tipa SCCmec kasetē ir 2. tipa *ccr* komplekss un A klases *mecA* gēns (*mecI-mecR1-mecA*), III tipa SCCmec kasetē ir 3. tipa *ccr* komplekss un A klases *mecA* gēns, IV tipa SCCmec kasetē ir 2. tipa *ccr* komplekss un B klases *mecA* gēns, V tipa kasetē ir *ccr* komplekss un C klases *mecA* gēns, VI tipa kasetē ir 4. tipa *ccr* komplekss un B klases *mecA* gēns, VII tipa kasetē ir *ccr* komplekss un B klases *mecA* gēns un visjaunākajā VIII kasetē ir 4. tipa *ccr* komplekss un A klases *mecA* gēns (Zhang et al, 2009). IV tipa SCCmec kasete pēc sekvences atšķirībām J1 reģionā var tikt diferencēta divos apakštipos – IVa un IVb.

*MecA* gēna klase tiek definēta ar PĶR, nosakot IS1272, *mecI* un *mecR1* klātbūtni vai neesamību divos domēnos un *mecA*, kā arī IS431*mec*.



6.6.2.1. att. SCC *mec* kasešu tipi (Teruyo et IWG-SCC, 2009)

Pirmā tipa SCC*mec* kasetē *mecA* gēns ir vienīgais rezistences noteicējs, turpretī otrā un trešā tipa SCC*mec* satur vairākus rezistences noteicējus pret ne beta laktāmu antibiotikām, kas ir atbildīgi arī par multirezistenci, kāda bieži tiek konstatēta MRSA celmu nozokomiālās infekcijas gadījumā. Lielo izmēru dēļ horizontāla gēnu pārnese no SCC*mec*

otrā un trešā tipa kasetēm, salīdzinot ar ceturto tipa kaseti, ir daudz grūtāka, un šos elementus saturošu MRSA celmu veidošanās parasti notiek vertikāli – selektīva spiediena rezultātā, kas radies no neadekvātas un pārmērīgas antibiotiku lietošanas terapijā. Piektā tipa SCCmec ir maza izmēra kasete (28 kb), kurā, tāpat kā pirmā tipa kasetē, nav citu rezistences gēnu kā tikai *mecA*, taču atšķirībā no citiem SCCmec tipiem šajā kasetē atrodas virkne citu gēnu, kas kodē restrikcijas – modifikācijas sistēmu, kam varētu būt nozīmīga loma elementa stabilizācijai hromosomā (Oliveira, Lancastre, 2002).

Arī citi no SCCmec neatkarīgi ģenētiskie un vides faktori ietekmē meticilīna rezistenci (Chambers, 1997). Inserciju inaktivācijas pētījumos ir atrasti daži normāli stafilokoku gēni, kas nepieciešami meticilīna rezistencei. Meticilīnrezistentie *S. aureus* celmi bieži vien ir rezistenti ne tikai pret beta laktāmiem, bet arī pret citām antibiotiku grupām. SCCmec var saturēt vairākus rezistences gēnus, kas galvenokārt novietoti integrētajās plazmīdās un transpozonos. Makrolīda – linkozamīna – streptogramīna (MLS) rezistences gēns atrodas Tn554 un ir saistīts ar II, III un IIIA tipa SCCmec. Tetraciklīna rezistences gēns atrodas uz pT181 III tipa SCCmec. Aminoglikozidāzes rezistences gēni atrodas pUB110 IA un II tipa SCCmec kasetēs (Chikramane et al, 1991). 1960. gados dažādās Eiropas un Āzijas valstīs starp HI-MRSA prevalēja I un III SCCmec tips (Katayama et al, 2003, Ito et al, 2003), bet II SCCmec tips bija universāls Japānā, Korejā un ASV. SI-MRSA celmiem ir raksturīga IV, V, vai VI tipa SCCmecA kasete (Ito et al, 2003, Kondo et al, 2007). Tomēr ir arī izņēmumi: dažiem HI-MRSA celmiem ir SCCmec IV tipa kasete (EMRSA-15 un USA500), un SI-MRSA ST8-IVtips (ASV 300) ir arvien biežāk sastopams slimnīcās ASV. SCCmec tipi IV un V ir atrasti SI-MRSA izolātos un parasti tiem nav citu papildus rezistences gēnu (Rex et al, 2010). Jau daudzus gadus *mecA* gēna noteikšana *S. aureus* izolātos ar PQR ir meticilīna noteikšanas „zelta standartmetode” (Murakami et al, 1991).

Tā kā klasiskā mikrobioloģiskās izmeklēšanas metode aizņem 2–8 dienas (Pujāte, 2008) un tāpēc paiet ilgāks laiks, līdz iespējams pacientam izvēlēties atbilstošu terapiju, mūsdienās, lai varētu identificēt MRSA tieši no pozitīva asins uzsējuma, ir izveidotas jaunas komerciālas izmeklēšanas metodes, piemēram, reālā laika (*real time*) PQR komerciālās testsistēmas un citas. Diemžēl parasti šo metožu lietošanai nepieciešamas dārgas tehnoloģijas (Kempf et al, 2010, and Shrestha et al, 2002). Endotraheālos aspirātos un citos klīniskajos paraugos ar multipleksu PQR metodi MRSA ir iespējams noteikt sešās stundās. Šī metoda balstās uz *mecA* gēna un *femA* gēna noteikšanu klīniskajā paraugā (Vannuffel et al, 2003). Salīdzinoši nelielas ir iespējas molekulāro izmeklējumu noteikt MRSA tieši no iztriepes, kas ir nozīmīgs izmeklējums MRSA uzraudzības jomā. Viens no



šādiem izmeklējumiem ir izotermālā signāla amplifikācijas metode (CytAMP®-British BioCell International, Cardiff, UK), kurā apvienotas *S. aureus* identifikācija un metecilīna rezistences noteikšana (Levi et al, 2003).

## 6.7. MRSA tipēšanas metodes

Visefektīvāko kontroles metožu izstrādāšanai un pilnveidošanai ir svarīgi pilnībā saprast MRSA epidemioloģiju. MRSA tipēšanas metodēm ir jābūt ar augstu izšķirtspēju, atkārtojamām, standartizējamām, ar stabilām iezīmēm, plaši pieejamām, lētām un iepriekš veiksmīgi lietotām epidemioloģiskos izmeklējumos. Ļoti svarīga ir arī iegūto rezultātu starplaboratoriska salīdzināšanas un analīzes iespējamība.

MRSA tipēšanas metodes var iedalīt fenotipiskajās un genotipiskajās. Pie fenotipiskajām metodēm pieskaitāmas: antibiogramma, fagotipēšana, serotipēšana, proteīnu elektroforēze, savukārt genotipēšanas metodes ir: plazmīdu analīze, hromosomālā DNS analīze – restrikcijas enzīmu analīze (REA), „southern” hibridizācija, ribotipēšana, insercijas sekvenču analīze, *mecA: Tn554* tipēšana, pulsējošā lauka elektroforēze (PFGE), SCC*mec* PQR tipēšana, uz noteiktu gēnu sekvenēšanu balstītās metodes – MLST, *spa* tipēšana (Weeler, 2000). Daudzas no šīm metodēm ir novecojušas un praksē tiek lietotas ļoti reti. Pašlaik populārākā fenotipēšanas metode ir antibiogramma, bet populārākās genotipēšanas metodes ir PFGE, SCC*mec* PQR tipēšana, MLST un *spa* tipēšana.

### 6.7.1. Antibiogramma

Fenotipiski MRSA izolātus var salīdzināt pēc to jutības pret dažādām antibiotikām, izmantojot disku difūzijas metodi agarā un komerciālās sistēmas. Šīs tehnikas ikdienā veic rutīnas mikrobioloģiskajās laboratorijās. Šo metožu trūkumi ir MRSA tipu mazā izšķirtspēja un iespēja, ka selektīvā spiediena rezultātā vienāda antibiogramma var būt neradniecīgiem celmiem. Tai pat laikā ir iespējams, ka divu viena klona izolātu antibiogrammas var atšķirties, kas skaidrojams ar rezistenci nesošās plazmīdas iegūšanu vai arī tās zaudēšanu. Vienkārša raksturošana ar rezistenci vai jutību pret antibiotikām bieži nevar kalpot par neradniecīgu celmu izšķiršanas metodi. Iztalējot visas šīs metodes iespējas, secinām, ka antibiogrammu nevar izmantot kā vienīgo MRSA tipēšanas metodi, lai gan dažreiz kāda endēmiska vai epidēmiska klona jutības rezultāts var būt tik zīmīgs, ka antibiogramma kļūst par veiksmīgu skrīninga metodi, piemēram, kāda uzliesmojuma laikā rezistence pret rifampicīnu tika izmantota kā iezīme, lai atšķirtu jauno celmu no slimnīcā jau eksistējošiem,

tādējādi izslēdzot tos stafilokokus, kam tālāka tipēšana nav nepieciešama (*Weller, 2000*). Antibiogramma ir ļoti svarīga metode adekvātas terapijas izvēlei, bet antibiogrammas rezultāti atsevišķi neļauj spriest par nozokomiālo infekciju uzliesmojumiem slimnīcās.

### 6.7.2. Pulsējošā lauka elektroforēze – PFGE

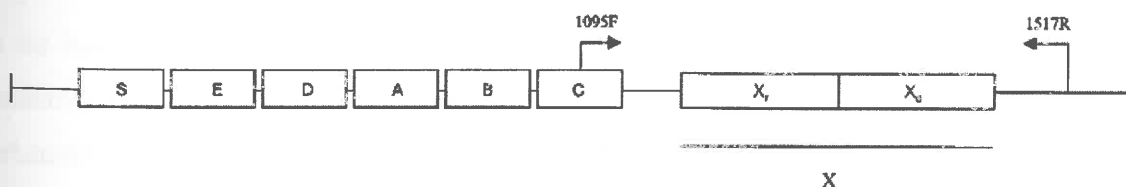
PFGE, kuru izstrādājuši zinātnieki Szwarc C. un Cantor J., ir balstīta uz bakteriālās DNS sagriešanu ar endonukleāzēm, kā rezultātā tiek iegūti lieli DNS fragmenti (10–800 kb), kas nav sadalāmi parastajā elektroforēzē. PFGE elektriskā lauka virziens tiek periodiski pulsveidīgi mainīts, ļaujot DNS fragmentiem sadalīties atbilstoši izmēram. PFGE sniedz iespēju daudz vienkāršākai hromosomālās DNS salīdzināšanai, balstoties uz vienkāršākiem profiliem, nevis tādiem, kas iegūti ar augstas frekvences restrikcijas endonukleāzēm. Teorētiski, PFGE var izmantot jebkuru baktēriju tipēšanai (*Weller, 2000*). PFGE izpildei nepieciešama nebojāta DNS, tādēļ DNS izolācija jāveic īpaši uzmanīgi. Lai izvairītos no riska izdalīšanas procesā mehāniski bojāt DNS molekulas, katrs paraugs tiek imobilizēts agarozē, tādā veidā aizsargājot DNS un vienlaicīgi ļaujot brīvi plūst šķīdumiem, kas nepieciešami šūnu sienas lizēšanai un proteīnu šķīdināšanai. Izolētā DNS tālāk tiek griezta ar endonukleāzēm, kas atpazīst dažas specifiskas hromosomu vietas. DNS fragmenti gelā migrē uz anodu, taču pirms pārvietošanās fragmentiem jāiecentrējas elektriskā lauka virzienā. Centrēšanās laiks ir atkarīgs no molekulārā svara, tādēļ labāka fragmentu sadalīšanās tiek panākta ar elektriskā lauka virziena maiņu elektroforēzes laikā. Šī procesa rezultātā lielākajiem fragmentiem ir nepieciešams ilgāks laiks, lai pārorientētos uz jauno elektriskā lauka virzienu, savukārt mazākie fragmenti pārorientējas straujāk un turpina migrāciju ātrāk (*Olive et al, 1999*).

PFGE ir lietota MRSA analizēšanai un vairākos pētījumos salīdzināta ar citām metodēm. Ir pārbaudītas vairākas restrikcijas endonukleāzes, taču par labāko ir atzīta *SmaI* (*Ichiyama et al, 1992*). Visi izolāti ir tipējami pat pēc vairākām starpkultūrām. PFGE piemīt vairākas no ideālas tipēšanas metodes īpašībām, un tā varētu būt „zelta standarts” MRSA tipēšanai (*Weller, 2000*). Tomēr pastāv vairāki ierobežojumi PFGE lietošanai, piemēram, ilgais laiks līdz rezultātu iegūšanai un reaģentu un speciālā aprīkojuma augstās izmaksas. Lai gan iegūto zonu skaits ir salīdzinoši neliels, rezultātu interpretēšana ir problemātiska, īpaši starplaboratoriskos pētījumos, jo pat nelielas elektroforēzes apstākļu atšķirības var ietekmēt katras zonas attālumu, sarežģījot tādu izolātu salīdzināšanu, kuru DNS sadalīts dažādos gelos.

Neskatoties uz šiem ierobežojumiem, PFGE tiek uzskatīta par labu metodi dažādu lokālu infekciju uzliesmojumu izpētes gadījumos (Weller, 2000, Murchan et al, 2003). PFGE tiek lietota endēmisko un epidēmisko MRSA celmu epidemioloģijas pētījumos. Šādos gadījumos ar PFGE iegūtie profili tiek interpretēti pēc publicētajām direktīvām. Tenover ar zinātnieku grupu (Tenover et al, 1995) ierosināja izmantot standartizētu interpretēšanas shēmu ģenētiskās radniecības noteikšanai starp dažādiem izolātiem, taču kritēriji ir piemērojami, tikai analizējot nelielu skaitu izolātu, kas iegūti uzliesmojumu epidemioloģiskajos pētījumos slimnīcās vai sabiedrībās relatīvi īsā laika periodā (1 līdz 3 mēneši), kad ģenētiskā daudzveidība, domājams, ir ierobežota. Šie kritēriji nav piemērojami plašu un ilgā laika periodā ievāktu mikroorganismu kolekciju pētījumos. Daudz vieglāk izpildāmas, interpretējamas un starplaboratoriski salīdzināmas ir uz sekvenēšanu balstītās MRSA tipēšanas metodes – *spa* tipēšana un MLST, kas arī tika lietotas veiktajā pētnieciskajā darbā.

### 6.7.3. Proteīna A gēna tipēšana

Proteīns A ir šūnas sienai piesaistīts proteīns ar membrānas enkuru un LPXTG transpeptidāzes atpazīšanas saiti (Schneewind et al, 1995), kas var saistīt IgG Fc reģionu. MRSA izolātu tipēšana pēc proteīna A gēna *spa* tiek veikta, sekvenējot polimorfā X vai īsu sekvenču atkārtojumu (short sequence repeat – SSR) reģiona DNS (<http://www.rivm.nl>). Polimorfais X reģions sastāv no dažāda skaita 24 bp atkārtojumiem un ir novietots tieši aiz reģiona, kas kodē C-terminālo šūnas sienas piesaistīšanās sekvenci.



**6.7.3.1. att. Proteīna A gēna *spa* karte. Ar taisnstūriem apzīmēti gēna segmenti, kas kodē signāla sekvenci (S), imūnglobulīnu G saistošos reģionus (A – D), A – D homologo reģionu (E) un COOH galu (X), kas iekļauj SSRs (Xr) un šūnas sienas piesaistes sekvenci (Xc) (43).**

SSR veidojas no atkārtojumu vienību delēcijām un duplikācijām vai arī punktveida mutāciju rezultātā. Lai gan bioloģiskā funkcija īsti nav skaidra, proteīna A domēns, ko kodē X reģions, varētu paplašināt proteīna N-terminālo IgG saistīšanas vietu uz šūnas sienas. Variablā X reģiona galos atrodas konservatīvi apgabali, kas shematiski attēloti 8. 4. attēlā un

pēc kuriem tiek izvēlēti praimeru PĶR amplifikācijai un tiešai sekvenču analīzei (Weller, 2000). Sekvenču polimorfisma noteikšana variablajā *spa* gēna X rajonā, kas kodē virsmas proteīnu A, jeb *spa* tipēšana ir kļuvusi par vispopulārāko tipēšanas sistēmu, jo šai metodei ir daudzas praktiskas priekšrocības, ieskaitot lielu caurlaidības spēju, iegūto datu pārnesamību, kā arī absolūtu reproducēšanu, kas ļauj izmantot internetā bāzētu tipa piešķiršanu un iegūto rezultātu salīdzināšanu ar vispasaules datu bāzi (Hallin et al, 2009).

Praktiski tā ir kļuvusi par biežāk lietoto primāro tipēšanas metodi reģionālās un nacionālās meticilīna rezistentajās *S. aureus* uzraudzības shēmās. Neskatoties uz to, arī šīs tehnoloģijas iespējas ir limitētas un atsevišķos gadījumos ir nepieciešama papildus testu veikšana, *spa* tipēšana neuzrāda dažu ST interferenci, piemēram, ST1, ST8 un ST80. Šādos gadījumos jāizmanto papildus marķieru analīze ar polimerāzes ķēdes reakciju (Struelens et al, 2009).

#### 6.7.4. Multilokusu sekvenču tipēšanas metode

Multilokusu sekvenču tipēšanas (*multilocus sequence typing* – MLST) metode tika izstrādāta, pamatojoties uz multilokusu enzīmu elektroforēzes (*multilocus enzyme electrophoresis* – MLEE) principu. MLST metodi 1998. gadā izstrādāja Maiden et al. MLST atšķirībā no MLEE vairs netiek analizēta gēnu ekspresija, bet ar sekvenču analīzi tiek veikta pašu gēnu analīze. Dažādas sekvenču tipēšanas tiek uzskatītas par atbilstošām atšķirīgām gēnu allēlēm, kas tālākai identificēšanai tiek apzīmētas ar skaitļiem. Izolāts tiek tipēts pēc allēļu profila (Weller, 2000). Analīzēm tiek izvēlēts noteikts gēnu skaits, parasti tie ir aptuveni 500 bp gari t.s. „housekeeping” gēnu iekšējie fragmenti. „Housekeeping” gēni tiek izvēlēti tādēļ, ka tie baktēriju genomā atrodas vienmēr (Weller, 2000). Septiņi gēnu lokusi, kas tiek izmantoti *Staphylococcus aureus* MLST, ir sekojošu gēnu iekšējie fragmenti: karbamātkināze (*arcC*), šikimātdehidrogenāze (*aroE*), glicerīna kināze (*glpF*), guanilāta kināze (*gmk*), fosfācetiltransferāze (*pta*), triozes fosfātu izomerāze (*tpi*) un acetilkoenzīma A acetiltransferāze (*yqiL*). Katrs lokuss tiek amplificēts ar PĶR, izmantojot praimerus, kas piesaistās konservatīvam gēnu reģionam, kas atrodas blakus variablajam reģionam. Iegūtais PĶR produkts tiek sekvenēts, un, balstoties uz iegūto sekvenču, tam tiek piešķirts iepriekš aprakstītais allēles numurs. Ja iegūtā sekvenču iepriekš datu bāzēs nav aprakstīta, tā tiek definēta kā jauna. *Staphylococcus aureus* datu bāzēs ir aprakstītas apmēram 804 visu lokusu allēles. Ņemot vērā, ka ar MLST tiek analizēti septiņi lokusi, teorētiski iespējami 190577339656704 dažādi allēļu profili (<http://www.seqnet.org>). MLST lietojums *Staphylococcus aureus* analīzēm ir validēts, izmantojot PFGE. Otrā MLST priekšrocība ir

iespēja rezultātus atainot elektroniski datu bāzēs internetā, unificējot un standartizējot globālos epidemioloģiskos datus. MLST galvenie trūkumi ir augstās izmaksas un specifiskais aprīkojums, tādēļ šī metode galvenokārt tiek izmantota lielos zinātniski epidemioloģisko pētījumu centros nevis slimnīcās. Lai gan MLST ir samērā jauna metode, pateicoties labai atkārtojamībai, standartizācijai un izšķirtspējai, tā kļūst arvien populārāka.

MRSA kloniem ir zema ģenētiskā variabilitāte, tādēļ būtu svarīgi atrast metodes ar visaugstāko izšķirtspēju, lai varētu diferencēt celmus epidemioloģiski saistītās un nesaistītās grupās. Tas ir iespējams, pētījumos lietojot vairāk par vienu metodi, lai nodrošinātu augstāku izšķirtspēju un novērstu būtiskus trūkumus. Tomēr šāda pieeja ievērojami palielinātu pētījuma izmaksas. Ņemot vērā MRSA izplatību, arī Latvijas apstākļos ir nepieciešama šī patogēna molekulāri epidemioloģiskās informācijas analīze, kas varētu palīdzēt izstrādāt zinātniski pamatotu infekciju kontroles politikas un rekomendāciju plānu.

#### **6.8. *S. aureus* un MRSA nēsāšana, izplatība un skrīnings, nosakot MRSA nēsāšanu**

*Staphylococcus* ģints mikroorganismi visā pasaulē ir cilvēku un dzīvnieku ādas komensālās mikrofloras daļa. Tos var atrast uz vesela cilvēka gļotādas, augšējos elpceļos un uroģenitālā trakta lejas daļā, transitīvi tie ir atrodami arī gremošanas traktā. Kolonizācija ar *S. aureus* notiek uz elpceļu gļotādas un/vai zarnu traktā, pie kam parasti tā norit asimptomātiski (Eveillard et al, 2004, Scanvic et al, 2001). 2001.–2002. gadā veiktā populācijas pētījumā ASV konstatēts, ka *S. aureus* nēsāšana no 32,4% samazinājusies līdz 28,6% , bet kolonizācija ar MRSA pieaugusi no 0,8% līdz 1,5% (Gorwitz et al, 2008, Werthei et al, 2004). Daži indivīdi ir transistenti nēsātāji, bet sastop arī persistējošas nēsāšanas gadījumus (Hamdan-Partida et al, 2010). Veseliem cilvēkiem *S. aureus* nēsāšana nav saistīta ar lielu infekcijas iespējamības risku, bet, ja tiek bojāta ādas integritāte, infekcijas risks ievērojami pieaug. Pirmoreiz šādu situāciju aprakstīja 1952. gadā saistībā ar ogļračiem, kam bija dažādi sasitumi un ādas bojājumi uz ceļiem un elkoņiem (Archer et al, 1952). Līdzīga situācija ir slimnīcu pacientiem, kuriem ādas integritātes izjaukšana var būt *S. aureus* ieejas vārti organismā, ieskaitot MRSA. Galvenokārt tas attiecas uz ķirurģiskiem pacientiem (Pofahl et al, 2011), pacientiem ar apdegumiem (Kaiser et al, 2011), pacientiem, kam veiktas invazīvas procedūras (Geffers et al, 2011), intensīvās terapijas pacientiem

(Wang et al, 2010) un citiem. Pacienti var tikt kolonizēti, nonākot slimnīcā, bet var nonākt slimnīcā jau kā MRSA nēsātāji un tikt kolonizēti, atkārtoti iestājoties slimnīcā, vai pārvešanas laikā uz citām nodaļām (Boyce, 1992).

MRSA nēsātāju sastopamības biežums, iestājoties ārstniecības iestādēs dažādos ģeogrāfiskos rajonos ir dažāds, bet valstīs, kur MRSA līmenis ir augsts, MRSA nēsātāji starp pacientiem un personālu, pēc literatūras datiem, ir apmēram 6,5% (Jeyaratnam et al, 2008). Pēc nonākšanas slimnīcā šādiem slimniekiem var veidoties endogēna infekcija, paši var inficēties endogēnā ceļā, kā arī tie var kļūt par krusteniskās MRSA kolonizācijas rašanās cēloni citiem pacientiem (French 2009). Piemēram, pētījums Lielbritānijā parādīja, ka laikā no 1997. līdz 2003. gadam, apsekojot 216 644 hospitalizētu slimnieku, par infekciju skaita pieaugums slimnīcā saistīts tieši ar MRSA. (Wyllie et al, 2005). Tādēļ MRSA ierobežošanas stratēģiju mērķis ir krusteniskās rezistences ierobežošana un citi pretpidēmiskie pasākumi, to skaitā slimnieku izolēšana, lai panāktu MRSA izplatības samazināšanu (Tacconelli, 2008). Tomēr šis jautājums ir saistīts ar materiāliem resursiem, tādēļ infekcijas kontroles programmas ir jāpilnveido un jāpaaugstina to efektivitāte, lietojot atbilstošās statistikas metodoloģijas un ekonomisko modelēšanu, kas dažādās valstīs var būt atšķirīga. Dažādu valstu slimnīcās veiktais MRSA uzraudzības procedūru pārskats parādījis, ka pat slimnīcās ar augstu MRSA infekciju risku intensīvu un koordinētu pasākumu veikšana ieskaitot pacientu izolēšanas procedūras, var būtiski samazināt inficēšanās iespējamību ar MRSA (Cooper et al, 2004). Bieži notiek diskusija par to, vai valstīs ar zemu MRSA izplatības līmeni ir nepieciešams ieviest agresīvus infekcijas kontroles uzraudzības pasākumus un uzraudzību, kas ir saistītas ar ārstniecības iestāžu izmaksu palielināšanos.

Kā pierādījis Holandes Veselības departamenta MRSA infekciju kontroles programmas efektivitātes rezultātu pētījums 2006. gadā, šajā valstī noteiktā kontrole, kas ir agresīva un ievēro „meklēt un iznīcināt” principu, ir rezultatīva, jo MRSA inficēto skaits ievērojami samazinājies un līdz ar to smazinājušās arī izmaksas šajā jomā (<http://www.gr.nl/pdf.php?ID=1462&p=1>).

Latvijas vadlīnijās „Labas sabiedrības veselības prakses vadlīnijas rīcībai meticilīnrezistentā *S. aureus* apstiprināšanas gadījumā stacionārās ārstniecības iestādēs” ir sniegts vispārējs priekšstats par MRSA kontroles iespējām stacionārās ārstniecības iestādēs un aprakstītas minimālās prasības, kuras īstenojot var ierobezot MRSA izplatību. MRSA riska grupas pacienti Latvijas ārstniecības iestādēs, kuriem, iestājoties slimnīcā, jāveic skrīninga izmeklēšana, nosakot MRSA, ir: pacienti, kas pārvesti no citām ārstniecības iestādēm vai pēdējo 30 dienu laikā atradušies citas veselības aprūpes iestādes intensīvās

terapijas nodaļā, pacienti, kuriem veiktas ķirurģiskas manipulācijas pēdējo 6 mēnešu laikā, kontaktpacienti ar MRSA inficētu pacientu, ja uzņemšanas laikā pacientam ir strutojošas brūces, atrofiskas čūlas, ilgstoši katetri. Pēc Sabiedrības veselības aģentūras datiem no 2007. gada septembrim līdz 2008. gada janvārim Latvijā reģistrēts 71 MRSA gadījums un 45,1% gadījumos tie ir bijuši ar MRSA kolonizēti pacienti. MRSA nēsātāju īpatsvars dažādos mēnešos variē no 36,8 līdz 50% no visu ziņoto MRSA gadījumu skaita (Pujāte E., 2008).

Lai arī MRSA ir mikroorganisms, kas izraisa infekciju galvenokārt slimnīcas pacientiem un saistīts ar HI-MRSA, dažās valstīs SI-MRSA kļūst par problēmu arī vecu ļaužu pansionātos dzīvojošiem vecākiem cilvēkiem. MRSA izplatības galvenie riska faktori, kas var paātrināt cilvēku nāvi šajos pansionātos, ir tas, ka cilvēki dzīvo šaurībā, daudziem tiek veiktas medicīniskas procedūras, pacienti saņem medikamentus, to skaitā antibiotikas, nereti ir veci ļaudis, kam nepieciešami katetri. Lai arī ir daudz vadlīniju un ieteikumu, MRSA izplatības novēršanai slimnīcās, bet nav iespējams mehāniski šos pasākumus pārnest uz veco ļaužu pansionātiem, jo šajā gadījumā pansionāti ir gan slimnīca, gan cilvēku pastāvīgā dzīvesvieta (Hughes et al., 2008). Ir aprakstīti ādas un mīksto audu infekciju uzliesmojumi kolektīvos, kur to dalībnieki nodarbojas ar kontaktsporta veidiem (cietumos, militārās vienībās u. c.), bērnudārzos, intravenozo narkotiku lietotājiem, cilvēkiem, kam veikti tetovējumi, kā arī novērota mikroorganisma pārvešana no pacienta uz medicīnisko personālu. Riska faktori SI-MRSA iegūšanai ir ādas traumas, palielināta ķermeņa masa, kosmētiskā ķermeņa skūšana, kā arī trenāžieri un citas koplietošanas ierīces (Dumpis u.c., 2007).

Tā kā antibiotikas tiek plaši lietotas arī veterinārmedicīnā, iespējama rezistentu mikroorganismu pārvešana no dzīvniekiem cilvēkam kontakta ceļā vai ar pārtikas produktiem (Eveillard et al, 2004, De Jong et al, 2009). 1972. gadā literatūrā parādījās pirmais ziņojums par MRSA izdalīšanu no, ar mastītu slimojošu govju, piena (Devriese et al, 1972). Ir ievērojama atšķirība starp MRSA dzīvniekiem, ko ražo pārtikai, un mājdzīvniekiem. Mājdzīvniekiem MRSA dabiskais rezervuārs ir cilvēks, turpretim pārtikai paredzētos dzīvniekos un to produktos atrastais MRSA ir jauns MRSA ST398 celms, kas ātri izplatās starp dzīvniekiem un arī lauksaimniekiem. ST398 celmu bez klīniskām pazīmēm sastop galvenokārt cūku fermās strādājošiem, kā arī cūkām. Tā atradne ir aprakstīta Francijā, Nīderlandē, Dānijā, Beļģijā, ASV. Ontario štatā Kanādā veiktajā pētījumā konstatēja, ka kolonizācija ar MRSA cūku fermā strādājošiem bija 20% un cūkām 24,9%, pie kam šie rezultāti nekorelēja. Spa tipēšanas rezultāti parādīja, ka dominējošais ir

*spa* tips 539 (t 034, ST 398 klonālais komplekss), tas pats, kas Eiropā bija konstatēts 59,2% MRSA izolātu no cūkām Eiropā (*Khanna et al*, 2008).

Vairākas ST398 MRSA celmu izraisītās infekcijas cilvēkiem apstiprina potenciālo ST398 MRSA celma izplatību saistībā ar saslimšanu. Tomēr izplatības ātrums un ST398 MRSA celma virulence pēc dažādu autoru datiem ir zemāka nekā citiem MRSA.

MRSA galvenokārt izplatās ar medicīniskā personāla rokām, pārnēsājot to no viena pacienta uz citu. Nereti pacienti ir kolonizēti ar MRSA bez slimības klīniskās izpausmes un var būt infekcijas avots. MRSA ir izturīgs arējā vidē un var saglabāt savu dzīvotspēju līdz 6 mēnešiem (*Dumpis u.c.*, 2007).

Endēmiska MRSA situācija izveidojas, kad tiek hospitalizēti jauni MRSA pozitīvi pacienti, kas rada infekcijas tālāku izplatīšanos ārstniecības iestādē, inficējot gulošos pacientus, kā arī veicina MRSA izplatīšanos ārpus ārstniecības iestādes, šādiem pacientiem izrakstoties. Tādēļ visu MRSA ierobežošanas stratēģiju mērķis ir vērsts uz infekcijas izplatības ierobežošanu un citiem pasākumiem, lai tādējādi samazinātu MRSA izplatību starp hospitalizētiem slimniekiem (*Taconelli*, 2008). Šo stratēģiju būtība slimnīcās pamatojas uz to, ka vairāk nekā puse MRSA kolonizētu pacientu, kuri tiek hospitalizēti, MRSA netiks diagnosticēta, izmeklējot klīniskos paraugus ar ikdienas izmeklēšanas metodēm, bet iztriepes no deguna, ādas, brūcēm un, iespējams, starpenes un kakla, lai noteiktu MRSA, netiks izmeklētas, lietojot selektīvo kultivēšanu un/vai DNS amplifikācijas metodes (*Brown et al*, 2005, *Coia et al*, 2006, *Gemmell et al*, 2006, *Humphreys* 2007). MRSA nēsātāju skrīnings un infekciju kontrole, lietojot izdalīto MRSA celmu molekulāro tipēšanu, ir galvenie pasākumi integrētai MRSA kontrolei un individuālā riska novērtēšanai. Lielbritānijas vadlīnijās ir ieteikts slimniekus pārbaudīt ikdienas praksē pirms iestāšanās intensīvās aprūpes nodaļā slimnīcās, kur MRSA ir endēmiska infekcija (*Mangram et al*, 1999). Endēmiskās vietās Francijā, kur bija augsta MRSA nēsāšanas izplatības iespēja, iestājoties intensīvās terapijas nodaļā un radot iespējamu MRSA infekciju, 7% no riska faktoriem bija: vecums vairāk par 60 gadiem, no citām nodaļām vai slimnīcām pārvesti slimnieki, slimnieku, paildzināta hospitalizācija citās nodaļās, iepriekšēja hospitalizācija nodaļā saistībā ar ķirurģiskām manipulācijām un vaļēji ādas bojājumi.

Lietojot rentablas testēšanas metodes, tika pierādīts, ka vispārējs skrīnings un pacientu izolēšana šajos gadījumos bija lietderīga (*Lucet et al*, 2003). Lielāka riska pacientu mērķtiecīga uzraudzība medicīnas vai ķirurģiskajās nodaļās varētu būt efektīva esošo ārstniecības iestāžu resursu izmantošanā. 12 mēnešu Itālijas multicentra 864 slimnieku pētījumā par iespējamo no jauna iegūto MRSA nazālo kolonizāciju uz 1000 gultdienām



saistībā ar dažādu grupu antibakteriālās terapijas uzsākšanu terapiju, novēroja, ka MRSA nazālās kolonizācijas risks/1000 gultdienām lietoto antibiotiku grupās sadalījās šādi: 8,2 makrolīdiem, 7,9 karbapenēmiem, 3,2 glikopeptīdiem, 3,1 hinoloniem un 3,4 trešās paaudzes cefalosporīniem. Augstākie rādītāji karbapenēmu lietošanas gadījumā bija cukura diabēta slimniekiem un dialīzes pacientiem (*Taconelli, 2008*). Uzraudzības vadlīnijās medicīniskajam un infekcijas uzraudzības kontroles personālam sniegtā informācija kalpo par kvalitātes nodrošinājumu MRSA riska novēršanā. Sabiedrības veselības aģentūras, masu mediji un valstu valdības vairākkārt ir vērsušas uzmanību uz draudiem cilvēku veselībai, ko rada antibiotiku rezistentās baktērijas vispār un MRSA īpaši (*MacKenzie et al, 2005, Grundmann et al, 2006*). Tomēr pastāv diskusijas par to efektivitāti un vispārējas lietošanas noderīgumu, jo ziņojumi par infekciju nēsātāju skaita palielināšanos, ko izraisa sadzīvē iegūtais MRSA un veselības aprūpes iestādē iegūtais MRSA, daudzās pasaules vietās ir radījušas bažas par esošo kontroles stratēģiju izgāšanos. Daudzu nacionālo profesionālo organizāciju un veselības aģentūru vadlīnijas ir propagandējušas stratēģiju virkni, lai ietvertu MRSA izplatību veselības aprūpes iestādēs un sabiedrībā. Šīs stratēģijas kombinē vispārējās higiēnas pamata procedūras, mērķtiecīgu indivīdu skrīningu, nosakot MRSA nēsāšanu, un ierosināto infekciju kontroli (*Humphreys, 2007*). Latvijā MRSA infekcijas ierobežošanas vadlīnijās minētas trīs galvenās pasākumu grupas: pirmreizējo MRSA infekciju gadījumu reģistrācija, ziņošana un epidemioloģiskās uzraudzības pasākumu organizēšana ārstniecības iestādē, MRSA infekcijas un kolonizācijas gadījumu identifikācija un MRSA pozitīvo pacientu izolācija, riska grupas pacientu skrīnings, iestājoties slimnīcā.

Kā būtiskākie riska faktori epidemioloģiskās izmeklēšanas laikā atbilstoši infecēšanās vietai minēti trīs: vispārēji riska faktori (imūnsupresija, cukura diabēts, hroniski ādas bojājumi), ar hospitalizāciju saistīti riska faktori (ilgstoša hospitalizācija, katetri, ķirurģiskas manipulācijas un plaušu mākslīgā ventilācija, pacienta veselības stāvokļa smagums), ar sadzīvi saistīti riska faktori (ciešs kontakts ar lielu cilvēku skaitu, atrašanās ilglaicīgas aprūpes iestādēs, nodarbošanās ar kontakta sporta veidiem u.c.) (VA "Sabiedrības veselības aģentūra", 2007).

### **6.9. *S. aureus* un MRSA ierosinātās slimības**

Ārstniecības iestādē iegūtais MRSA izrsaisa plaša spektra slimības – ādas un zemādas audu infekciju (*Rogolsky, 1979, Curran, Al-Salihi, 1980, Doern et al, 1999*), pneimoniju (*Carrillo-Marquez et al, 2011*), bakterēmiju (*Wenzel, 2007*), infekciozo endokardītu (*Gulati et al, 2011*), stafilokoku toksiskā šoka sindromu (*Wang et al, 2011*), ķirurģisko brūču infekciju, urīnceļu infekciju, meningītu, kā arī citas lokalizācijas strutainas komplikācijas (*Dumpis u.c., 2007*).

### 6.9.1. Ādas un zemādas strutainās infekcijas – furunkuloze, celulīts, abscess u. c.

*S. aureus* ierosina plašu ādas un mīksto audu infekciju spektru no virspusējiem ādas bojājumiem līdz smagām invazīvām infekcijām, kuras ārstējot nepieciešama ķirurģiska iejaukšanās. Abscess, celulīts, folikulīts, impetigo ir ādas slimību formas, kuras parasti ārstē ambulatoriski. Karbunkulozi raksturo multipli furunkuli, kas biežāk lokalizējas ķermeņa augšdaļā. Jauniem indivīdiem, slimojot ar furunkulozi, iespējamās smagas komplikācijas: pneimonija, fascīts, artrīts vai pat sepse (Moreillon et al, 2005, Bahrain et al, 2006). *S. aureus* producē plašu spektru virulences faktoru, to skaitā PVL toksīnu, kas ir raksturīgs SI-MRSA celmiem. Tādēļ gadījumos, kad iekaisuma ārstēšana ir neefektīva, endēmiska riska rajonos un gadījumā, ja indivīdu kolonizējis *S. aureus* vai tā meticilīnrezistentā forma, iespējama izraisītājs var būt SI-MRSA. turklāt SI-MRSA, salīdzinot ar HI-MRSA, ir vairāki eksotoksīnu gēni, kas var būt nozīmīgi, ietekmējot slimības klīniskās izpausmes un smagumu (Tenover et al, 2006). 2001.–2004. gadā Losandželosas reģionālajā slimnīcā tika veikts pētījums par *S. aureus* ierosinātiem abscesiem un folikulītiem pacientiem, kuri meklējuši palīdzību slimnīcas neatliekamās palīdzības nodaļā. Pētnieki secināja, ka MRSA ierosināto infekciju skaits šīs grupas pacientiem ir pieaudzis no 29% 2001.–2002. gadā līdz 64% 2003.–2004. gadā, tendences ir konstantas, izdalītie MRSA producē PLV toksīnu, ir jutīgi pret lielāko daļu testēto antibiotiku, šiem celmiem nav klindamicīna inducētās rezistences un tie pieder ASV raksturīgajiem SI-MRSA USA 300 8. grupas celmiem, kas apstiprina SI-MRSA kā etioloģisko aģentu virspusēju strutainu ādas infekciju gadījumā (McCaig et al, 2006).

### 6.9.2. *S.aureus* ierosinātās brūču infekcijas

*S. aureus* ir biežākais komplicētu mīksto audu un nozokomiālo brūču infekciju cēlonis (Smith et al, 1996, Sader et al, 2002, Gessr et al, 2004). *Staphylococcus aureus* un *Staphylococcus epidermidis* var ierosināt virspusējās brūču infekcijas pēc aortālās koronārās bifāzes ķirurģiskas iejaukšanās, turklāt tās bieži veidojas, kad slimnieks ir jau izrakstīts no slimnīcas. Arī mīksto audu rajoni ap adatas ievades vietu bieži tiek inficēti ar šiem mikroorganismiem.

MRSA izraisīto mīksto audu infekcijas līmenis dažādās valstīs ir atšķirīgs. Pētījumu dati ir galvenokārt par hospitalizētiem slimniekiem ar komplicētiem mīksto audu bojājumiem, kas nepadodas ārstēšanai ar pirmās līnijas antimikrobiālajiem preparātiem.

Vienā no Eiropā un ASV veiktajiem pētījumiem (*Jones et al, 2003*) *Staphylococcus aureus* meticilīna rezistence svārstījās no 12,4% Vācijā līdz 44,4% ASV. Lielākajā daļā Eiropas valstu rādītāji tomēr bija ievērojami augstāki nekā Vācijā (32,4% Spānijā, 34,7% Francijā un 41,8% Itālijā), pie tam šie MRSA celmi bija rezistenti arī pret citām antibiotiku klasēm, izņemot vankomicīnu ar 100% jutību, dažādu trime-toprim/sulfametoksazola jutību no 98,3% Francijā līdz 84,1% Itālijā un gentamicīna jutību no 87,8% Francijā līdz 13% Itālijā. Ja ilgu laiku MRSA tika uzskatīts par nozokomiālu patogēnu, pēdējā desmitgadē pieaug arī MRSA atradne ārpus slimnīcas iegūto mīksto audu infekciju gadījumā, piemēram, ASV pat līdz 20% (*Eron et al, 2003*).

Daži ASV centri ziņoja par MRSA izplatību pat līdz 50% (*Eady et al., 2003*). Ne tikai MRSA, bet arī oksacilīna jutīgiem *S. aureus* celmiem sastop rezistenci sevišķi pret hinoloniem (ciprofloksacīnu, levoflokscīnu) un makrolīdiem (eritromicīnu). Turklāt šo celmu izplatība nav saistīta ar pacienta lokalizāciju. Piemēram, ASV 26% MRSA celmu intensīvās aprūpes nodaļās bija rezistenti pret eritromicīnu, tai pat laikā dažās valstīs Eiropā eritromicīna rezistenci biežāk sastop ārpus slimnīcas pacientiem: Francijā 20,7%, Itālijā 15,3% un Vācijā 14,7% gadījumu (*Kenneth et al, 2006*). HI-MRSA fenotipiski ir multirezistents pret antibiotimikrobiālajām vielām, ieskaitot visus beta laktāmus, makrolīdus, hinolonus un aminoglikozīdus.

Galvenie riska faktori HI-MRSA infekciju gadījumā ir atrašanās ārstniecības iestādē, kontakts ar ārstniecības personām, antimikrobiālo preparātu terapija. Pēdējo desmit gadu laikā ievērojami pieaudzis sadzīvē iegūto MRSA mīksto audu infekciju biežums (*Deresinski, 2005*). Ja agrīnās publikācijās aprakstīts, ka infekcija biežāk sastopama bērnu populācijā, tagad SI-MRSA sastopams visās vecumu grupās. Sākotnēji domāja, ka SI-MRSA riska faktori atšķiras no HI-MRSA, bet turpmākie pētījumi parādīja, ka riska faktori nemainās. Vēl vairāk, SI-MRSA un HI-MRSA tagad ir sastopams gan slimnīcā, gan ārpus slimnīcas, kas apgrūtina infekciju reģistrāciju (*Hidron et al, 2005*). Lielākā daļa sadzīvē iegūtās MRSA infekcijas ir ādas un mīksto audu bojājumi, tādēļ drenāža un antimikrobiālo preparātu terapija šo infekciju ārstēšanai ir pietiekama (*Kaplan, 2005*).

Pētījumos apstiprinājies, ka vairāku indivīdu tuvs kontakts, piemēram, armijas daļās, bērnu dienas stacionāros, sportistu grupās, pansionātos u.c., veicina SI-MRSA infekciju uzliesmojumus. Vēl vairāk, MRSA infekcija organismā var ātri izplatīties un izraisīt multiplu orgānu bojājumu, toksiskā šoka sindromu un nāvi. Šādus gadījumus laikā no 1997. līdz 1999. gadam, novēroja Ziemeļdakotas un Minesotas štatā ASV, kur konstatēja četru bērnu nāvi, kuras cēlonis bija SI-MRA, kas izraisīja sepsi un hematogēnā ceļā nokļuva arī

plaušās. Šie SI-MRSA celmi fenotipiski bija multijūtīgi pret antimikrobiālajiem preparātiem un producēja B vai C stafilokoku enterotoksīnu (*Centers, 1999*). Citas sastopamās SI-MRSA komplikācijas var būt nekrotizējoša pneimonija un nekrotizējošs fascīts (*Gillet et al, 2002, Klein et al, 2003, Miller et al, 2005, Kaplan et al, 2005*).

SI-MRSA prevalences intrahospitāliem un ambulatoriskiem slimniekiem ievērojami variē, un viens no šo variāciju cēloņiem ir dažādie veidi kā SI-MRSA tiek definēts un kāda slimnieku populācija tiek pētīta. Vairumā pētījumu SI-MRSA definīcija pamatojas uz laiku, cik ilgi pēc hospitalizācijas radās infekcija. Jaunākie meta analīzes pētījumi par SI-MRSA prevalenci 21 retrospektīvajā pētījumā parādīja, ka ir sešas dažādas SI-MRSA definīcijas, arī trijos no pieciem prospektīviem pētījumiem SI-MRSA tika definēts dažādi. Jebkurā gadījumā apkopotie dati parādīja, ka retrospektīvajos pētījumos no 5932 pacientiem SI-MRSA prevalences bija 30,2% gadījumu (svārstības 1,9–96%), bet prospektīvajos pētījumos (636 pacienti) prevalences bija 37,3% gadījumu (svārstības 18,2–52,2%). MRSA iegūšanas riska faktori bija pacientu nesena hospitalizācija, antibiotiku terapija, ambulatorisko pacientu vizītes, hroniskas pamatslimības, intravenozo narkotisko vielu lietošana un kontakts ar cilvēkiem, kam bija augsts iespējamais MRSA kolonizācijas risks. No pacientiem, kas atbilda SI-MRSA, 85% bija hospitalizēti pacienti un 48% no veselajiem cilvēkiem bija vismaz viens no iepriekš minētajiem riska faktoriem. Desmit ambulatoros pētījumos, salīdzinot no 3898 pacientiem, kuri tikko iestājušies slimnīcā, atradušies ambulatoriskās vai neatliekamās palīdzības nodaļās, savāktos izpētes materiālus, secināts, ka kopējā MRSA prevalences bija 1,8%. Novērošanas grupās slimniekiem ārpus ārstniecības iestādēm (skolās, dienas stacionāros, veco ļaužu pansionātos, armijas daļās) MRSA prevalences bija 0,76% (*Saldago et al, 2003*).

SI-MRSA Eiropā atšķirībā no ASV vēl nav kļuvis par prevalentno mikroorganismu (*Dryden, 2009*). Tomēr jāatzīmē, ka stāvoklis mainās un SI-MRSA gadījumu skaits Eiropā pieaug (*Stefani et al, 2003, Cercenado et al, 2008*). Pētījumā vienā no lielajām pilsētas slimnīcām 726 pacientiem 24 stundu laikā pēc iestāšanās veica skrīningu, nosakot MRSA iztriepēs no deguna. Rezultāti parādīja, ka 53 pacienti (7,3%) bija MRSA pozitīvi un 119 pacienti (15,3%) bija MRSA pozitīvi. No 172 *S. aureus* celmiem MRSA prevalences bija 17%. MRSA tipēšana ar pulsējošā lauka elektroforēzi parādīja, ka izdalītie MRSA celmi pieder trim lielām grupām USA300, USA100 un USA500. 30% no MRSA izolātiem bija USA300, *mecA* IV kasete un pozitīvs PVL gēns, un tie tika izolēti pacientiem saistībā ar mīksto audu infekcijām.

Šis pētījums pierādīja arī to, ka HIV seropozitīviem pacientiem MRSA kolonizācijas risks ir daudz lielāks nekā HIV seronegatīviem pacientiem (*Kenneth et al, 2006*).

### 6.9.3. Stafilokoku toksiskā šoka sindroms

Stafilokoku toksiskā šoka sindroms ir reti sastopama stafilokoku infekcijas forma, kas var veidoties veselām sievietēm menstruāciju periodā (*Omoie et al, 2002*), bet tagad stafilokoku toksiskā šoka sindromu novēro arī ādas infekcijas, intravaskulāru katetru infekcijas un vīrusu pneimonijas gadījumā, kas ir *S. aureus* infekcijas radīta komplikācija. Šie *S. aureus* celmi producē TSST-1 (*Lina et al, 1999, Lina et al, 2004*). Literatūrā ir aprakstīti gadījumi, kad stafilokoku toksiskā šoka sindroms ir novērots pacientiem ar SI-MRSA (*Matsuda et al, 2003*).

### 6.9.4. Infekciozais endokardīts (IE)

*S. aureus* ir viens no biežākajiem infekciozā endokardīta ierosinātājiem, un MRSA parasti ir saistīts ar pacienta atrašanos ārstniecības iestādē (*Cabell C. H. et al, 2002, Fowler et al, 2005, Benito et al, 2010*). Vairākos savstarpēji neatkarīgos pētījumos, aprakstīti MSSA un MRSA infekciozā endokardīta ierosinātāji hemodialīzes pacientiem. Vienā no pētījumiem, kur analizēti 22 *S. aureus* ierosinātā infekciozā endokardīta gadījumi, 16 no tiem ierosināja MRSA un mirstības procents šajā pacientu grupā sasniedza 90%. Lai arī lielākā daļa infekciju bija saistītas ar slimnieka hospitalizāciju, trīs gadījumos diagnosticēts SI-MRSA (*Kuo et al, 2007*). Līdzīgā pētījumā, kurā tika analizēti infekciozā endokardīta gadījumi hemodialīzes pacientiem 15 gadu laikā, MRSA slimnieku mirstība sasniedza 100% (*Chang et al, 2004*).

### 6.9.5. *S. aureus* bakterēmija

*S. aureus* ir viens no biežāk sastopamajiem bakterēmijas ierosinātājiem ar tendenci pieaugt MRSA izolātu īpatsvaram (*Naber, 2008*). *S. aureus* bakterēmija var būt smagu sekundāru slimību cēlonis, kuru dažreiz ir grūti identificēt. 1994.–1999. gada prospektīvā pētījumā, kā primāro izvēloties pozitīvu asins uzsējumu, un tālākā pētījuma gaitā 12 nedēļas novērojot 724 pacientus pēc četrus riskus prevalences, secināts, ka šiem pacientiem: infekcija iegūta sadzīvē, radušās ādas pārmaiņas, kas liecina par akūtu sistēmas slimību, konstatēta arī persistējoša temperatūra 72 stundas un pozitīvs asins uzsējums šai periodā. Autori nonāca pie secinājuma, ka 12% gadījumu osteomielīts, 7,5% gadījumu septisks artrīts, 5,7% gadījumu dziļo audu abscess un 3% gadījumus vertebrālais osteomielīts bija *S. aureus* bakterēmijas komplikācija (*Fowler et al, 2003*). Citas *S. aureus* radītas bakterēmijas

komplīkācijas iekļauj akūtu izpausmi 48 stundu laikā pēc hospitalizācijas un metastātiskus infekcijas perēkļus dažādos orgānos un audos, kuri var klīniski izpausties pat četras nedēļas pēc tam, kad diagnosticēta *S. aureus* bakterēmija.

Pie akūtām komplīkācijām pieskaitāms septisks šoks un diseminēta intravaskulāra koagulācija (Libman et al, 1984). 1–53% gadījumu *S. aureus* bakterēmijas gadījumā sastopami metastātiski infekcijas perēkļi dažādos orgānos un audos (Lautenschlager et al, 1993). Riska faktori šo komplīkāciju gadījumā ir nezināma lokalizācijas vieta, ārpus slimnīcas iegūta infekcija, kā arī ar iespējamo infekcijas vietu neasociēta bakterēmija (Hedström et al, 1983, Finkelstein et al, 1984, Gómez et al, 1990). Visbiežāk metastāzes lokalizējas kaulos un locītavās, plaušās, nierēs, centrālajā nervu sistēmā un uz ādas. 22–99% gadījumu veidojas metastātisks infekciozs endokardīts (Cooper et al, 1982, Julander 1985). Piemēram, Lielbritānijā, katru gadu ziņo par apmēram 12 500 *S. aureus* ierosinātiem bakterēmijas gadījumiem, kad mirstība sasniedz līdz 30% (Thwaites et al, 2011), turklāt MRSA bakterēmija, salīdzinot ar *S. aureus* bakterēmiju, ir saistīta ar lielāku nāves risku (Naber, 2008).

Eiropā MRSA izolātu skaitam bakterēmijas gadījumā arī ir tendence pieaugt (EARSS, 2005). Šis pieaugums ir saistīts ar daudziem faktoriem: iespējamu primārās infekcijas vietas lokalizāciju, vecumu vairāk par 50–60 gadiem, pneimoniju, kardiovaskulāru pamatslimību, neiroloģisku slimību, septisku šoku, intravaskulāro katetru. *S. aureus* bakterēmija ir galvenokārt intrahospitāla infekcija pat līdz 85% no visām intrahospitālajām infekcijām (Libman et al, 1984, Mylotte et al, 1987). Tai pat laikā kā pieaugošu problēmu novēro MRSA virulento celmu sadzīvē iegūto *S. aureus* izraisītu bakterēmiju skaita pieaugumu (Liassine et al, 2004, Boyle-Vavra et al, 2007). No 1969. līdz 1981. gadam tikai trijos ziņojumos parādās informācija, par to, ka līdz 4% *S. aureus* izraisītu bakterēmiju bija MRSA, bet jau 1980.–1991. gadā septiņos ziņojumos ir norāde, ka MRSA prevalence *S. aureus* izraisītas bakterēmijas gadījumā ir pieaugusi no 1 līdz 26%. Plašāka invazīvo procedūru, protēžu un intravaskulāro katetru lietošana ir viens no bakterēmiju gadījuma skaita pieauguma cēloņiem (Petti et al, 2003).

Viens no zināmiem *S. aureus* izraisītas bakterēmijas primārajiem avotiem ir intravaskulārie katetri. Perifēriski ievietotie centrālo vēnu kateri un tunnel katetri 32–67% gadījumu ir *S. aureus* izraisītas bakterēmijas cēlonis. Citos pētījumos ar katetriem saistītās *S. aureus* bakterēmijas minētas 16–20% gadījumu (Iannini et al, 1976, Raad et al, 1992, Malanoski et al, 1995). 7–36% gadījumu perifēriskie venozie katetri, 9% gadījumu femorālie arteriālie šunti un 9% gadījumu perkutānie hemodialīzes katetri var būt *S. aureus*

bakterēmijas cēlonis. Ar *Hickman* katetriem un venozajiem disku katetriem saistītās *S. aureus* bakterēmijas biežāk ir sadzīvē iegūtas un saistītas ar intravenozās terapijas dažādību ambulatoriskiem HIV pacientiem. Citas centrālo venozo katetru infekcijas galvenokārt ir intrahospitālas un reti saistītas ar HIV (*Malanoski et al*, 1995). Tomēr ar katetriem saistīto *S. aureus* bakterēmiju diagnostika var būt sarežģīta un katetru izraisītas sepses un citu septisku sindromu diferenciāldiagnostikā var palīdzēt viss klīnisko parametru kopums (*Malanoski et al*, 1995). *S. aureus* izraisītas bakterēmijas epidemioloģijas pārmaiņas un MRSA prevalence saistīta ar lielāku mirstību šajā grupā, kas liecina par nepieciešamību pilnveidot un uzraudzīt infekciju kontroli šai jomā (*Naber*, 2008).

#### 6.9.6. Stafilokoku pneimonija

Ilgu laiku *S. aureus* ierosināta pneimonija tika uzskatīta par sadzīvē iegūtu retu slimību, kas sastopama 2–5% gadījumu no sadzīvē iegūtām gripas pneimonijām (*Rebhan et al*, 1960). Pēdējos gados stafilokoku pneimonija ir kļuvusi par klīnisku problēmu un saistīta ar MRSA disemināciju ārstniecības iestādēs un sabiedrībā (*Rubinstein et al*, 2009). Pēdējos desmit gados 20–40% gadījumu visas *S. aureus* izraisītās pneimonijas ir saistītas ar mākslīgo plaušu ventilāciju un intrahospitālo pneimoniju, kuras visbiežākais izraisītājs mikroorganisms bija MRSA ar I-III *SCCmec* tipu (*Rubinstein et al*, 2009). 2002.–2004. gadā ASV veiktajā pētījumā 8,9% sadzīvē iegūto pneimoniju, 22,9% intrahospitālo pneimoniju un 14,6% ar mākslīgo plaušu ventilāciju saistīto pneimoniju ierosinātājs bija MRSA (*Rubinstein, Kollef* 2009). Eiropā izmaiņas bija vēl pāsteidzošākas. Piemēram, Spānijā, intrahospitālo pneimoniju apjoms no 2% 1974. gadā pieaudzis līdz 50% 1997. gadā (*Pujol et al*, 1998, *Germaud et al*, 1999). Jāatzīmē, ka gadījumos, kad MRSA izraisītās pneimonijas bija saistītas ar mākslīgo plaušu ventilāciju, mākslīgās plaušu ventilācijas ilgums, salīdzinot ar citas etioloģijas pneimonijām, ievērojami pieauga (*Hawkes et al*, 2007).

#### 6.10. Sadzīvē iegūtā MRSA raksturojums

Globāla rezistentu baktēriju izplatība ir nopietna sabiedrības veselības problēma. Sākotnēji izplatījies slimnīcās visā pasaulē, MRSA pašlaik jau kļuvis par nozīmīgu arī sadzīvē iegūstamu patogēnu. Šīs izmaiņas MRSA epidemioloģijā attīstās līdzīgi penicilināzes producējošo *S. aureus* celmu izplatībai no slimnīcām sadzīvē, sākot no 1940.–1950. gadiem, kad penicilīns bija efektīvs pretstafilokoku preparāts un tādēļ plaši

rekomendēts *S. aureus* izraisītu infekciju ārstēšanā. Sešu gadu laikā pēc penicilīna ieviešanas ārstēšanā apmēram 25% slimnīcu *S. aureus* celmi bija penicilīna rezistenti. Pēc divām desmitgadēm jau 25% no sadzīvē sastopamajiem *S. aureus* celmiem bija penicilīna rezistenti (Chambers, 1997).

SI-MRSA izplatības ceļi ir atšķirīgi no HI-MRSA izplatības ceļiem. Tas izplatās cieša kontakta ceļā starp cilvēkiem. Ir aprakstīti ādas un zemādas infekciju uzliesmojumi kontakta sporta veidu komandās un bērnudārzos, kā arī novērota mikroorganisma pārvešana no pacienta uz medicīnisko personālu. SI-MRSA riska faktori ir ādas trauma, palielināta ķermeņa masa, kosmētiskā ķermeņa skūšana, kā arī kopējas lietošanas treniņi un citas ierīces. Rezultātā, lietojot antistafilokoku preparātus metecilīnrezistentu *S. aureus* celmu izraisīto infekciju ārstēšanā, var palielināties neefektīvas terapijas un mirstības pieauguma risks (Chambers, 1997).

Pazīmes, kas atšķir HI-MRSA celmus no SI-MRSA, ir hospitālo riska faktoru neesamība, jutība pret lielāko daļu antimikrobiālo vielu, izņemot beta laktāmus, atšķirīgi genotipi, kas nesakrīt ar biežāk atrasto hospitālo celmu genotipiem, IV vai V tipa SCCmec kasete, kas reti sastopama nozokomiālajiem celmiem, un gēni, kas kodē Pantona – Valentīna leukocidīna toksīnu (Shukla et al, 2004). Lai gan jutība pret lielāko daļu antibiotiku ir viena no SI-MRSA raksturīgajām īpašībām, ir reģistrēti arī izņēmumi. Piemēram, celms 01083 bija rezistents (Okuma et al, 2002) pret četrām antibiotikām, kas neietilpa beta laktāmu grupā. SI-MRSA celmi auga daudz ātrāk par hospitālajiem celmiem. Salīdzinoši lielais augšanas ātrums varbūt ir priekšnosacījums tam, lai SI-MRSA varētu veiksmīgi kolonizēt cilvēka organismu, izkonkurējot citas baktērijas (Okuma et al, 2002). Nav vienota viedokļa par SI-MRSA izcelsmi. Pēc vienas teorijas tie ir intrahospitālo celmu savvaļas pēcteči. Tādā gadījumā šie celmi ir ievērojami mainījušies, zaudējot lielu daļu rezistences gēnu.

SI-MRSA celmi var rasties divos veidos – hospitālie celmi var nonākt ārpus medicīnas iestādes, kur tie izplatās no indivīda uz indivīdu, vai arī tie var rasties *de novo*, metecilīnjutīgam *S. aureus* celmam uzņemot metecilīna rezistences gēnu kompleksu. Otra teorija ir, ka šie celmi ir attīstījušies horizontālā metecilīna rezistences gēna pārvešanas ceļā pirms tam jutīgiem izolātiem. Tādējādi, domājams, ir attīstījusies penicilināzes mediētā *S. aureus* rezistence pret penicilīnu sadzīvē iegūtajiem celmiem. Atšķirībā no penicilināzes, metecilīna rezistences determinante ir hromosomāli kodēta, un tādēļ šāda pārvešanas iespēja ir relatīvi neliela. Iespējams, ka SI-MRSA ir radies kā šāda reta pārvešana no nozokomiālā donora jutīgam recipientam. Jebkurā gadījumā neatkarīgi no izcelsmes avota HI-MRSA un SI-MRSA tagad sastopami slimnīcā un ārpus tās. SI-MRSA, arī MRSA var kolonizēt



saimnieka organismu ļoti ilgu laika periodu pirms infekcijas izraisīšanas. HI-MRSA kolonizācija parasti norit nediagnosticēta un var izraisīt infekciju pat vairākus mēnešus pēc izrakstīšanās no slimnīcas, kad pacients jau atrodas sabiedrībā, tādēļ ir grūti noteikt SI-MRSA.

Dažādiem autoriem atšķiras, piemēram, sadzīvē iegūtu izolātu definējums parasti tiek balstīts uz MRSA izolācijas laika attiecību pret hospitalizācijas laiku. Rezultātā lielākā daļa uz SI-MRSA attiecināto gadījumu ir saistīti ar nesenu tiešu vai netiešu veselības aprūpi, piemēram, hospitalizāciju, mājas vizīti, klīnikas apmeklējumu, antibiotiku terapiju, hroniskām slimībām vai ciešu kontaktu ar šiem riska faktoriem pakļautu personu, kas liecina, ka SI-MRSA celmi parasti ir multirezistenti. Otra tipa SI-MRSA celmi, kas ir izolēti no pacientiem, kuriem nav zināma saskare ar veselības aprūpes iestādēm un to darbiniekiem, ir jutīgi. Pirmie SI-MRSA tika izolēti no minoritātēm un nelabvēlīgās sabiedrības daļas indivīdiem, taču vēlāk tie tika izolēti jau arī no labklājīgas sabiedrības pārstāvjiem, skolniekiem, sportistiem, jauniesauktajiem kareivjiem un citu noslēgtu kolektīvu locekļiem (Charlebois et al, 2004, Munckhof et al, 2009).

Viena no galvenajām SI-MRSA pazīmēm ir PVL toksīna producēšana. PVL ir divu komponentu citotoksīns, kas veidots no divām polipeptīdu ķēdēm LukS-PV un LukF-PV, kurām, saskaņoti darbojoties, tiek bojāta leikocītu membrāna (Sussman, 2002).  $\gamma$  toksīna lokuss ekspresē trīs polipeptīdus, no kuriem divi – HlgA un HlgC – ir atbilstoši LukS-PV, bet HlgB ir līdzīgs LukF-PV. Gandrīz 99% izolātu ir *hlg* lokuss, taču tikai 2% izolātu ir *luk* lokuss, un tie producē PVL toksīnu. Jaunākajiem izolātiem var būt vienlaicīgi gan *hlg* lokuss, gan *luk* lokuss, un tie var producēt trīs S-proteīnus (LukS-PV, HlgA un HlgC) un divus F-proteīnus (LukF-PV un HlgC). Katrs S-proteīns var kombinēties ar katru no F-proteīniem, radot sešas bioloģiski aktīvu toksīnu kombinācijas PVL toksīnu producējošiem celmiem un divas bioloģiski aktīvas kombinācijas celmiem, kuriem ir tikai *hlg* lokuss. Katra vienība atsevišķi nav toksiska.

Viens no galvenajiem PVL toksīna darbības efektiem ir endogēno kalcija jonu kanālu aktivēšana (Colin et al, 1996). Šis toksīns veicina arī smalku poru veidošanos, kas ļauj brīvi caurplūst mazām molekulām un ūdenim. Injicējot šo toksīnu intradermāli trušiem, radās iekaisuma process, kas savukārt radīja kapilāru paplašināšanos, hemotaksi un ādas nekrozi. Ir novērota PVL negatīvu *S. aureus* celmu lizogēniska konversija toksīnu producējošos celmos (Zetola et al, 2005). Pēdējā laikā PVL ir izraisījis lielu interesi, ņemot vērā tā saistību ar bērnu un jaunu cilvēku saslimšanu, nesaskaroties ar ārstniecības iestādēm. ASV ir konstatēti ādas infekciju uzliesmojumi homoseksuālu cilvēku, ieslodzīto un arī skolnieku

vidū. Līdzīgi ziņojumi ir saņemti par ar PVL saistītām ādas infekcijām homoseksuālistu sabiedrībā Nīderlandē (*Wannet W.* 2003), skolniekiem Šveicē (*Boubaker et al.*, 2004) un veselības aprūpes personālam Skotijā (*Scottich.*, 2002).

Vissatraucošākais ir fakts, ka pieaug tādu gadījumu skaits, kad PVL pozitīvie celmi ir saistīti ar sadzīvē iegūtu nekrotisko pneimoniju. PVL producējošo *S. aureus* saistību ar sadzīvē iegūto pneimoniju pirmoreiz aprakstīja zinātnieks Lina G. , kas izstrādāja arī PQR PVL gēnu noteikšanai (*Lina et al.*, 1999) un, apstiprinot iepriekšējos pētījumus, kas veikti ar dubulto imūndifūzijas metodi, pierādīja, ka PVL gēni ir ļoti cieši saistīti ar primārajām ādas infekcijām, īpaši, furunkulozi (*Holmes et al.*, 2005). PVL gēnus visā pasaulē izmanto kā marķieri SI-MRSA celmu identificēšanā. Rezultātā, empīriski ārstējot sadzīvē iegūtu MRSA infekciju un lietojot antistafilokoku preparātus meticilīnrezistento celmu izraisīto infekciju ārstēšanā, var palielināties neefektīvas terapijas un letalitātes pieauguma risks (*Chambers.*, 1997). Rezistences attīstība pret penicilīnu, meticilīnu un vankomicīnu antibiotiku selektīvās iedabības rezultātā ir nenovēršams fakts. Tādēļ jautājums ir nevis par to, kā rezistence radusies, bet gan par to, kā ierobežot rezistences attīstību, un viens no veidiem ir būtiski samazināt antibiotiku ietekmi, kas veicina rezistento celmu selekciju slimnīcās un sadzīvē (*Holmes et al.*, 2005).

### 6.11. MRSA izplatība pasaulē

Ar nelieliem izņēmumiem MRSA ir biežākais pret antimikrobiālajiem preparātiem rezistentais izdalītais mikroorganisms Eiropā, ASV, Āfrikas ziemeļu daļā, Vidējos Austrumos un Tuvajos Austrumos (*Diekema et al.*, 2000). 1997. gadā tika izveidots SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkls, kurā vispirms iesaistījās ārstniecības iestādes no ASV, Kanādas, Dienvidamerikas un Eiropas, lai pētītu biežākos intrahospitālos un sadzīvē iegūtos invazīvos patogēnus. Pirmo 12 mēnešu rezultāti parādīja, ka *S. aureus* ir viens no biežāk izdalītajiem patogēniem asinīs.

Augsti oksacilīna rezistences rādītāji šajā laika periodā bija ASV – 26,9%, Latīņamerikā – 29,2% un Kanādā – 4,0% no visiem izdalītajiem *S. aureus* izolātiem (*Pfaller et al.*, 1999). 1998. gada 12 mēnešu laikā *S. aureus* nemainīgi bija biežāk sastopamais patogēns asinīs, bet ASV un Kanādā procentuāli pieauga MRSA izolātu skaits (*Diekema et al.*, 2000). Neskatoties uz to, ka kopumā SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iekļauto dalībvalstu un slimnīcu skaits pieauga, laikā no 1997. līdz 1999. gadam pacientiem ASV, Kanādas, Latīņamerikas Eiropas slimnīcās *S. aureus* nemainīgi bija biežāk

izdalītais patogēns bakterēmijas (*Pfaller et al, 1998*), ādas un mīksto audu infekciju (*Doern et al, 1999*) un pneimonijas gadījumā (*Sader et al, 1998*) gandrīz visās minētajās valstīs (*Diekema et al, 2001*). Kopumā laikā no 1997. līdz 1999. gadam no SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iekļautajām veselības aprūpes iestādēm 15 439 pacientiem ar bakterēmiju ādas un mīksto audu infekciju, apakšējo elpceļu un urīnceļu infekciju tika izdalīts *S. aureus*.

MRSA izolātu prevalence SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iekļautajās valstīs ievērojami svārstījās atkarībā no atrašanās vietas: Rietumu Okeānijas reģionā – 46%, ASV – 34,2%, Latīņamerikā – 34,9%, Eiropā – 26,3%. Ievērojami zemāki rādītāji bija Kanādā – tikai 5,7%. Augstākais MRSA īpatsvars no *S. aureus* ierosinātajām infekcijām, salīdzinot ar sadzīvē iegūtajām infekcijām, bija pacientiem ar pneimoniju un intrahospitālajām infekcijām (*Diekema et al, 2001*).

Pētījuma rezultāti pierāda, ka izdalītie MRSA celmi bija rezistenti ne tikai pret visām beta laktāma antibiotikām, bet arī pret citiem antimikrobiālajiem preparātiem, kas ir raksturīgs MRSA intrahospitālajiem celmiem. 6.11.1. tabulā redzami 1997.–1999. gada SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iekļauto reģionu MRSA antimikrobiālās rezistences rezultāti, attiecinot pret citām grampozitīvo infekciju gadījumos lietotajiem antimikrobiālajiem preparātiem.

6.11. 1. tabula.

**SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iekļauto reģionu metilcīlīnrezistentu *S. aureus* antimikrobiālās jutības rezultāti 1997.–1999. gadā (n=4788). Adaptēts pēc (*Diekema et al, 2001*).**

Reģioni	GEN	RIF	CIP	TET	CC	ERY	STX	Vidējā koorezistence
Amerikas Savienotās Valstis	35,5	7,7	88,6	15,6	7,2	92,7	26,0	3,5(3)
Kanāda	25,9	4,9	60,5	14,8	63,0	75,3	16,0	2,7 (3)
Latīņamerika	91,2	23,4	89,6	63,8	88,0	93,0	65,4	5,7 (6)
Eiropa	71,7	44,4	89,5	57,2	73,5	82,6	23,0	4,5 (5)
Okeānija rietumu daļa	74	10,45	88,1	82,0	79,3	94,7	35,8	4,7 (5)

*S. aureus* metilcīlīna rezistence ievērojami variēja starp dažādām valstīm arī Eiropā. 1997.–1999. gadā *S. aureus* metilcīlīna rezistence svārstījās no 2% Šveicē un Nīderlandē līdz 54,4% Portugālē (*Diekema et al, 2001*). Par kopējo Eiropas *S. aureus* metilcīlīna rezistenci līdz 1999. gadam, kad sāka veidoties Eiropas Antimikrobiālās uzraudzības tīkls, literatūrā

nav daudz datu. Salīdzinot 1990. gadā publicētos datus par Eiropas valstīm pēc SENTRY antimikrobiālās rezistences uzraudzības pētījuma rezultātiem, var secināt, ka MRSA no 12,8% (Voss et al, 1994) 1994. gadā bija pieaudzis līdz 26,3% 1999. gadā (Diekema et al, 2001). 2001. gadā Eiropas Savienības dalībvalstu sanāksmē Visbijā (Zviedrija) tika pieņemts lēmums 1999. gadā Holandē izveidoto vienoto invazīvo infekciju izraisītāju antimikrobiālās rezistences uzraudzības sistēmas modeli un izmeklēšanas protokolu ieviest citās Eiropas Savienības valstīs nacionālā līmenī un izveidot Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklu (EARSS) (EARSS Annual Report, 2005).

Laikā no 1999. gada līdz 2003. gadam pēc EARSS datiem MRSA izolātu īpatsvars asinīs Eiropā bija 21% no visiem asinīs izdalītajiem *S. aureus*. Saglabājās liela atšķirība starp Eiropas ziemeļu daļas valstīm, kurās MRSA izolātu īpatsvars bija mazāks par 1%, Centrāleiropā tas bija 5–20% un visaugstākie rādītāji bija Eiropas dienvidu rajona valstīs 30–40%. 2004. gadā, kad Latvijas slimnīcas un laboratorijas iesaistījās Eiropas Antimikrobiālās uzraudzības tīklā, vidējais MRSA īpatsvars Eiropā no visiem asinīs izdalītajiem *S. aureus* pieauga līdz 24%, bet attiecība Eiropas reģionos nemainījās (EARSS Annual Report, 2004). Šajā laika periodā *S. aureus* rezistence salīdzinoši viszemākā bija pret rifampicīnu un visaugstākā pret ciprofloksacīnu. 2005. gadā EARSS ziņoja par MRSA svārstībām no 0% Īslandē līdz 61,4% Rumānijā (EARSS Annual Report, 2005). 2006.–2007. gadā Eiropā pusei EARSS tīkla dalībvalstu MRSA proporcijas no visiem ziņotajiem invazīvajiem *S. aureus* asinīs bija vairāk par 25% un nemainīgi šāds rezultāts no Centrāleiropas valstīm bija Lielbritānijā un Īrijā (EARSS Annual Report, 2008).

Ziemeļvalstu un Igaunijas MRSA proporcionālais līmenis bija salīdzinoši nemainīgs, un 2006. gadā arī Lietuvā MRSA proporcija no visiem ziņotajiem invazīvajiem *S. aureus* asinīs bija ievērojami zemāka un sastādīja 12%. No Baltijas valstīm tikai Latvijā tika veikta no asinīm izdalīto MRSA izolātu apstiprināšana ar molekulārām metodēm, tādēļ rezultāti nav salīdzināmi ar Lietuvā un Igaunijā iegūtajiem datiem. Tai pat laikā ASV Antibiotiku uzraudzības tīkls (TSN) 2005. gadā ziņoja par MRSA izplatības biežumu attiecīgi 59%, 55%, un 48% neintensīvo nodaļu, intensīvo aprūpes nodaļu un ambulatoriskajiem pacientiem (Styers, 2006). 2006. gadā pirmoreiz EARSS datu bāzē tika apstiprināti deviņi mēreni jutīgi glikopeptīdu *S. aureus* izolāti Beļģijā, Francijā, Lielbritānijā un Īrijā, bet 2007.–2008. gadā arī divi glikopeptīdu (vankomicīna) rezistenti *S. aureus* celmi Austrijā. MRSA biežāk bija sastopami intensīvās terapijas nodaļās arī citās valstīs, izņēmumi bija Francija, Izraēla, Īrija, Portugāle un Malta, kur MRSA un *S. aureus* celmu proporcionālās attiecības bija līdzīgas. Tas izskaidrojams ar šajās valstīs tradicionālu pieeju plaši lietot

invazīvas intravaskulāras procedūras arī citu terapijas nodaļu pacientiem (EARSS *Annual Report*, 2005).

Var teikt, ka dažādās Eiropas valstīs laika periodā no 1999. līdz 2009. gadam MRSA īpatsvars procentuāli svārstījās no mazāk kā 1% līdz vairāk kā 50% no visiem izdalītajiem invazīvajiem *S. aureus* izolātiem asinīs. Nemainīgi Eiropas dienvidu reģiona valstīs šie rezultāti bija augstāki un, piemēram, Maltā un Portugālē, pārsniedza 50% no visiem *S. aureus* izolātiem. Pārējās Eiropas valstīs MRSA proporcionālās attiecības ar nelielām svārstībām kopumā saglabājas nemainīgas.

### 6.12. MRSA ierosināto infekciju ārstēšana

MRSA ierosinātās invazīvās infekcijas: persistējoša bakterēmija, nekrotizējoša pneimonija, osteomielīts un citas dziļi lokalizētas infekcijas ir saistītas ar augstiem mirstības rādītājiem un bieži vien ir grūti ārstējamas. Ideālas antibiotikas pret MRSA nav, bet kā antimikrobiālai vielai tai jāatbilst šādām prasībām: jānodrošina ātra baktēriju bojā eja, jābūt labai penetrācijai audos, konstantai antibiotikas farmakodinamikai un farmakokinētikai, lai varētu paredzēt lietojamās devas, zema rezistences attīstības iespējai terapijas laikā, klīniskai un mikrobioloģiskai šīs antibiotikas efektivitātei (Ngyen Graber, 2010). Līdz šim vankomicīns ir izvēles medikaments MRSA infekciju ārstēšanā. Lai gan vankomicīnu monoterapijā MRSA infekciju ārstēšanā lieto jau vairāk nekā 50 gadus, parādās ziņojumi par šīs antibiotikas neefektivitāti (Deresinski, 2007). Vankomicīnam ir vairāki trūkumi, kas var ietekmēt ārstēšanas efektivitāti persistējošas bakterēmijas gadījumā. Pirmkārt, lai arī vankomicīnam ir bakteriocīda iedarbība, tā ir atkarīga no MRSA izolāta īpašībām, MBC: MIC attiecības, mikroorganisma polimorfisma un (*agr*) regulatora gēna iespējamām funkcijas izmaiņām (Jones, 2006).

Pētījumā ASV no 900 asinīm izdalītajiem MRSA 181 izolātam novēroja "toleranci" pret vankomicīnu, definētu kā MBC:MIC attiecību  $\geq 32$ . Otrkārt, lai arī vankomicīna rezistenci novēro galēji reti, pieaug ziņojumu skaits par vankomicīna MIC paaugstināšanos laikā (*creep*), kaut arī rezultāti *in vitro* ir jutības robežās  $\leq 2$  mg/L (CLSI), kā arī ārstēšanas neefektivitāti šādos gadījumos (Sakoulas, Moellering, 2008). Beidzot 2002. gadā tika atrasti divi VRSA celmi ar MIC  $\geq 32$  mg/l vankomicīnu saistībā ar *van A* gēnu plazmīdās (Rybak et al, 2000, Dancer et al, 2003). Ir vairāki ziņojumi par VISA MRSA celmiem ASV, Eiropā, Brazīlijā ar MIC 8 mg/l (Weaver, Patte, 1964, McAleese et al, 2006). Šajos gadījumos vankomicīna terapija var būt neefektīva saistībā ar zemu vankomicīna koncentrāciju audos,

jo infūza terapija un vankomicīna injekcijas līdz 2 g/dienā nepalielina tā koncentrāciju audos – virs 2–3 mg/l plaušās un 5 mg/l ādā un mīkstajos audos. Treškārt, vankomicīna lietošana ir limitēta, jo, lietojot lielākas devas, iespējams nefrotoksisks efekts (Ngyen Graber, 2010). Ceturtkārt, plaša vankomicīna lietošana veicina vankomicīna rezistentu *E. faecium*, *E. faecalis* un citu mikroorganismu izplatīšanos (Uttley et al, 1989, Ruoff et al, 1988).

Linezolīds ir pirmais oksazolidinonu preaparāts, kas nomāc šūnas proteīnu sintēzi ribosomālā līmenī un kuram var būt bakteriostatiska vai bakteriocīda iedarbība atkarībā no dažādiem apstākļiem (Burkhardt et al, 2007). Linezolīds ir aktīvs pret grampozitīvajām baktērijām, to skaitā pret MRSA. Var tikt ordinēts *per os* vai intravenozi. Linezolīds tiek metabolizēts aknās un 30% izdalās ar urīnu. No linezolīda blakus efektiem novēro mielotoksicitāti, kas izpaužas kā trombocitopēnija pacientiem, kurus ārstē ilgāk par 14 dienām, un neirotoksicitāte (Bouza, 2009).

Linezolīds varētu būt izvēles preparāts MRSA gadījumā ar mākslīgo ventilāciju saistītiem pacientiem. Multicentru pētījumā 203 pacientiem ar intrahospitālo pneimoniju intravenozi tika nozīmēts linezolīds 600 mg/d x 2 kombinācijā ar aztreonamu un 193 pacientiem intravenozi tika nozīmēts vankomicīns 1 g x 2 ar aztreonamu 7–21 dienas ilgā terapijas kursā. Klīnisko un mikrobioloģisko efektivitāti vērtēja 12.–28. ārstēšanas dienā, kas bija efektīva, bet nenovēroja linkomicīna priekšrocības, salīdzinot ar vankomicīnu (Rubinstein et al, 2001). Arī citu pētījumu dati apstiprina pieņemumu, ka linezolīdam, salīdzinot ar vakomicīnu, terapijā nav priekšrocību (Stevens, 2002). Par linezolīda lietošanu bakterēmijas gadījumā ar katetriem saistītu bakterēmiju un infekciozā endokardīta terapiju ir maz datu (Bouza, 2009).

Daptomicīns ir cikliskais lipopeptīds, kurš pēc literatūras datiem ir efektīvs grampozitīvo baktēriju, to skaitā MRSA ārstēšanā, bet Latvijā nav reģistrēts (Fluit et al, 2004).

Tigeciklīns ir jauns tetraciklīna derivāts un pirmais gliceklīns, ko FDA 2005. gadā apstiprināja lietošanai. Tigeciklīns piesaistās 30S subvienībai baktēriju šūnā un bloķē aminoacil tRNS iekļūšanu ribosomā A vietā. Pieejams tikai intravenozā formā, *in vitro* aktīva pret gramnegatīvajām un grampozitīvajām baktērijām, to skaitā MRSA. Arī tigeciklīnam nav novērotas priekšrocības, salīdzinot ar vankomicīna terapiju kombinācijā ar aztreonāmu MRSA ierosināto ķirurģisko brūču infekciju ārstēšanā (Breedt et al, 2005, Sacchidanand et al, 2005). Turklāt tigeciklīna lietošanai iespējami tādi gastrointestinālā trakta darbības radīti blakus efekti kā slikta dūša, vemšana un diareja.

## 7. MATERIĀLI UN METODEDES

### 7.1. Darba metodoloģija

Pētījums strukturēts četrās apakšsadaļās.

#### 7.1.1. MRSA gadījumu izpēte PSKUS 2004. –2010. gadā

Laika periods: 2004. – 2010. gads.

Pētījuma objekts: pacienti ar pirmreizēji laboratoriski apstiprinātu MRSA.

Pētījuma populācija: hospitalizētie pacienti.

Analizētie rādītāji

- MRSA intensīvie rādītāji 2004. –2010. gadā, izmantojot gultdienu skaitu.
- MRSA gadījumu sadalījums slimnīcas nodaļās.
- MRSA nēsātāju īpatsvars.

#### 7.1.2. MRSA asins paraugu analīze PSKUS

Laika periods: 2004. –2010. gads.

Pētījums objekts: pirmreizējs hospitalizēta pacienta pozitīvs asins paraugs.

Pētījuma populācija: hospitalizēti pacienti.

Analizētais rādītājs: MRSA īpatsvars no visiem *S. aureus*, kuri izdalīti no asinīm.

#### 7.1.3. No asinīm izdalīto MRSA izplatība Latvijā 2004. –2009. gadā, salīdzinot ar Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla dalībvalstīs izdalīto MRSA izplatību

Laika periods: 2004.–2009. gads.

Dalīblaboratorijas:

- Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Centrālā laboratorija.
- Bērnu klīniskā universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Valsts aģentūra „Latvijas infektoloģijas centrs” Mikrobioloģijas laboratorija.
- Valsts aģentūras „Latvijas infektoloģijas centrs Tuberkulozes un plaušu klīnikas „Mikrobioloģijas laboratorija.

- Rīgas 1. pilsētas slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Rīgas dzemdību nama Mikrobioloģijas laboratorija.
- SIA „Centrālā laboratorija”.
- Vidzemes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Daugavpils reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Ziemeļkurzemes reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Liepājas reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.

Pētījuma objekts: pirmreizējas *S. aureus* mikroorganismu kultūras no asinīm.

Pētījuma populācija: ar ārstniecības iestādi saistīti pacienti.

Analizētie rādītāji:

1. Informācija par uzraudzības tīkla dalīblaboratorijām un slimnīcām atbilstoši EARSS metodoloģijai (1. pielikums).
2. No asinīm izdalīto *S. aureus* izolātu testēšanas rezultāti atbilstoši EARSS izmeklēšanas protokolam (2. pielikums).
3. MRSA atlase analīzei Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā: pēc vienota EARSS protokola visi pirmreizējie no asinīm izdalītie *S. aureus* un MRSA no 2004. līdz 2009. gadam. Atlases gaitā netika iekļauti 2010. gadā izdalītie *S. aureus* un MRSA izolāti, jo centralizētā datu apstrāde notiek nākamā gada otrajā pusgadā.

#### 7.1.4. MRSA izolātu fenotipiskā un genotipiskā analīze

Laika periods: 2004.–2010. gads.

Pētījuma izpildes vieta: PSKUS Centrālā laboratorija.

Pētījuma objekts: nejauši izvēlēti MRSA izolāti no PKUS Centrālās laboratorijas izolātu kolekcijas.

Analizētie rādītāji:

- MRSA un *S. aureus* izolātu fenotipiskās un genotipiskās īpašības.

HI-MRSA izolātu atlase fenotipiskai un genotipiskai analīzei:

- izvēlēti pirmreizēji izdalītie MRSA izolāti no PSKUS Centrālās laboratorijas kolekcijas, proporcionāli pārstāvēti 2004.–2010. gadu dažādos mēnešos.

SI-MRSA izolātu atlase fenotipiskai un genotipiskai analīzei:

- no Latvijas mikrobioloģijas laboratorijām saņemtie fenotipiski jutīgie, izņemot oksacilīnu, pirmreizējie MRSA izolāti no PSKUS Centrālās laboratorijas kolekcijas, izdalīti klīniskajos materiālos no 2004.–2006. gadam. No 2007. gada



no Latvijas mikrobioloģijas laboratorijām fenotipiski jutīgi izolāti, izņemot oksacilīnu, pirmreizēji netika iesūtīti.

*S. aureus* izolātu atlase *spa* tipa noteikšanai:

- no Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla dalības laboratorijām saņemtie desmit pirmreizēji izdalītie *S.aureus* izolāti, tai skaitā līdz pieciem MRSA izolātiem laika periodā no 2006. gada septembra līdz 2007. gada februārim atbilstoši Eiropas *spa* tipēšanas protokolam.

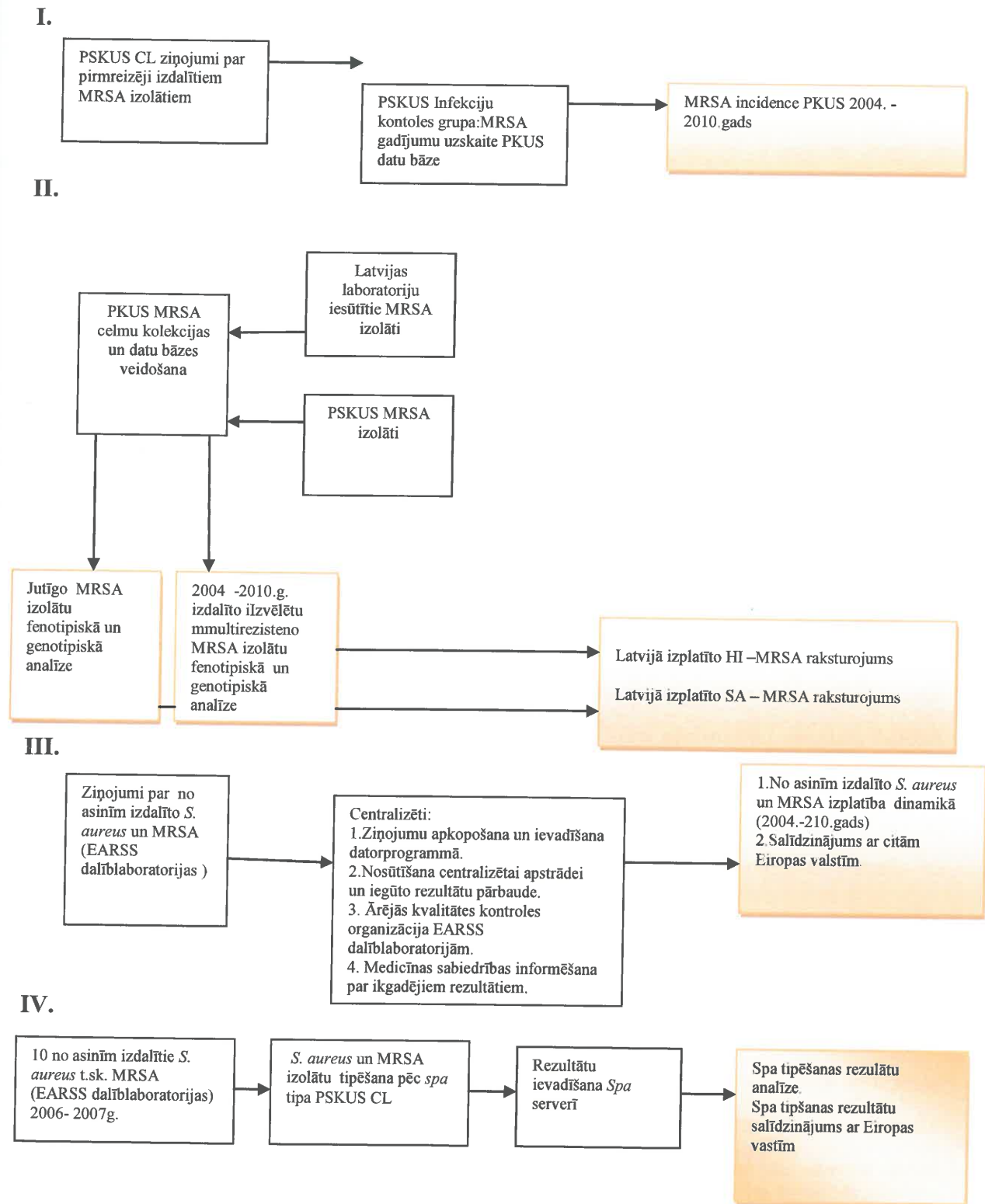
Dalīblaboratorijas:

- Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Centrālā laboratorija.
- Bērnu klīniskā universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Valsts aģentūra „Latvijas infektoloģijas centrs” Mikrobioloģijas laboratorija.
- Valsts aģentūras „Latvijas infektoloģijas centrs Tuberkulozes un plaušu klīnikas „Mikrobioloģijas laboratorija.
- Rīgas 1. pilsētas slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Rīgas dzemdību nama Mikrobioloģijas laboratorija.
- SIA „Centrālā laboratorija”.
- Vidzemes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Daugavpils reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Ziemeļkurzemes reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.
- Liepājas reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.

#### **Izslēgšanas kritēriji pētījumā:**

Atkārtoti MRSA un *S. aureus* izolāti vienam pacientam.

## 7.2. Pētījuma uzbūve



7.2.1. att. Pētījuma uzbūves shēma

### 7.3. MRSA izolātu kolekcijas un datu bāzes veidošana

Pirmreizēji izdalīto MRSA izolātu tīrkultūru sagatavošana un ievietošana ilgstošai uzglabāšanai saldētavā  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā.

Pacienta identifikācijas un demogrāfisko datu ievade elektroniskā datu bāzes failā.

### 7.4. MRSA izolātu laboratoriskās izmeklēšanas metodes

#### 7.4.1. *S. aureus* izolātu izdalīšana no patoloģiskā materiāla

##### *Izmeklēšanas gaita*

Izmeklējamo materiālu ar  $10\ \mu\text{l}$  bakterioloģisko cilpu uzsēja uz Kolumbijas asins agara (BD sastāvu skat. 7.4.1.1. tabulā), mannitola sāls agara (BD sastāvu skat. 9.4.1.2. tabulā); 18–24 stundas  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā audzēja termostatā Kolumbijas asins agaru un 24–48 stundas mannitola sāls agaru. Uz Kolumbijas asins agara stafilokoki auga, veidojot 1,5–2 mm lielas, apaļas, gludas, matētas S tipa kolonijas ar dzeltenu pigmentu vai bez tā, bet uz mannitola sāls agara *S. aureus* kolonijas auga, veidojot dzeltenas kolonijas. No raksturīgām kolonijām gatavoja iztriepi, krāsoja pēc Grama metodes un skatījās raksturīgo stafilokoku morfoloģiju. Piederību *S. aureus* sugai apstiprināja ar plazmas koagulācijas testu (BD) stobriņā. Ja izmeklējamais materiāls bija iztriepe, kuru pārbaudīja, nosakot, MRSA nēsāšanu, materiālu sēja uz MRSA *Select (Bio-Rad)* hromogēnās barotnes (9. 3. tabula) ar zināmu MRSA kontroli un 24 stundas audzēja termostatā  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Pozitīvā gadījumā MRSA auga, veidojot sārtas kolonijas. 2–3 raksturīgas kolonijas pārsēja uz Kolumbijas asins agara un tālāk izmeklēja, kā iepriekš aprakstīts.

Ja radās aizdomas par stafilokoku izraisītu sepsi, 5–10 ml slimnieka asinis nodaļā sēja aerobā BACTC (BD) asins uzsējuma pudelē un tālāk izmeklēja, ievietojot BACTEC 9120 (BD) analizatorā. Ja uzsējuma signāls bija pozitīvs, asins uzsējumu izņēma no BACTEC analizatora un gatavoja iztriepi ar akridinu. Pozitīvā gadījumā iztriepē bija redzamas kokveida baktērijas. Pēc tam asinis sēja uz Kolumbijas asins agara, mannitola sāls agara un izmeklēja, kā aprakstīts iepriekš. Izdalīto mikroorganismu piederību *S. aureus* sugai apstiprināja ar plazmas koagulācijas testu (BD).

**BD 5% Kolumbijas asins agara sastāvs un pagatavošana**

<b>Sastāvdaļas Contents</b>	<b>Daudzums Amount</b>
Kazeīna pankreatiskās šķelšanas produkti	12,0 g
Dzīvnieku audu peptiskās šķelšanas produkti	6,0g
Rauga ekstrakts	3,0g
Liellopu gaļas ekstrakts	3,0g
Graudu ciete	1,0g
Nātrija hlorīds	5,0g
Agars	13,5g
Destilēts ūdens	1000 ml
<i>Pagatavošana: 42,5 g sausās barotnes izšķīdina 1 l destilēta ūdens un, vienmērīgi maisot, uzvāra līdz 1 min. Iepilda sterilās pudelēs un sterilizē autoklāvā 15 min. 121 °C temperatūrā. Atdziestē 45-50 °C un pievieno 5% sterilu defibrinētu auna asiņu. Vienmērīgi sajauc un izlej sterilās Petri platēs pa 15ml. QC S. aureus ATCC 25923 aug, ap koloniju veidojot β hemolīzes zonu. pH 7,3 ± 0,2</i>	

**BD Mannitola sāls agars un pagatavošana**

<b>Sastāvdaļas Contents</b>	<b>Daudzums Amount</b>
Kazeīna pankreatiskās šķelšanas produkti	5,0 g
Dzīvnieku audu peptiskās šķelšanas produkti	5,0 g
Liellopu gaļas ekstrakts	1,0 g
D mannitols	10,0 g
Fenolsarkanais	25,0 mg
Nātrija hlorīds	65,0 g
Agars	15,0 g
Destilēts ūdens	1000 ml
<i>Pagatavošana: 111 g sausās barotnes izšķīdina 1 l destilēta ūdens un, vienmērīgi maisot, vāra līdz 1min. Sterilizē autoklāvā 15 min. 121 °C temperatūrā un izlej sterilās Petri platēs pa 15 ml. QC S. aureus ATCC 25923 aug, veidojot dzeltenas kolonijas. pH 7,4 ± 0,2</i>	

Iztriepju izmeklēšanas algoritms, nosakot MRSA ar MRSASelect barotni:

[http://www.biorad.com/B2B/BioRad/product/br\\_category.jsp](http://www.biorad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp)

**BD Mueller – Hinton agars un pagatavošana**

<b>Sastāvdaļas Contents</b>	<b>Daudzums Amount</b>
Liellopu ekstrakts	2,0 g
Kazeīna skābās hidrolīzes produkti	17,5 g
Ciete	1,5 g
Agars	17,0 g
<i>Pagatavošana: 38 g sausās barotnes izšķīdina 1 l destilēta ūdens un, vienmērīgi maisot, uzvāra līdz 1 min. Sterilizē autoklāvā 15 min. 121 °C temperatūrā un izlej sterilās Petri platēs pa 15 ml. QC S. aureus ATCC 25923. pH 7,3± 0,1</i>	

**7.4.2. Plazmas koagulācijas tests stobriņā**

*S. aureus* producē brīvo un saistīto koagulāzi, kas spēj saistīt plazmas fibrinogēnu, veidojot recekli. Ar sterilu bakterioloģisko cilpu 2–4 kolonijas izmeklējamo mikroorganismu iesēja stobriņā, kurā atradās 0,5 ml truša plazmas un EDTA (BD), un ielika termostatā 36 °C±1 °C temperatūrā, nolasot rezultātu (recekļa veidošanos) pēc četrām stundām, ne vēlāk kā pēc 24 stundām (pozitīvā kontrole – *S. aureus* ATCC 25923 un negatīvā kontrole – *S. epidermidis* ATCC 12228).

**7.5. MRSA izolātu fenotipiskā analīze pēc antimikrobiālās  
jutības rezultātiem**

**7.5.1. S. aureus antimikrobiālās jutības noteikšana ar disku difūzijas metodi agarā***Izmeklēšanas gaita*

No 4–5 24 stundu svaigām *S. aureus* kolonijām, kas izaugušas uz Kolumbijas asins agara, pagatavoja 0,5 McFarland standarta duļķojuma suspensiju fizioloģiskajā šķīdumā. Sagatavoja Petri plates ar *Mueller – Hinton* agaru (7.4.1.3. tabula),

Ar sterilu tamponu suspensiju vienmērīgi noklāja uz *Mueller – Hinton* agara virsmas un pagaidīja 3–5 minūtes istabas temperatūrā, lai agara virsma nožūtu.

Uz agara virsmas uzlika izvēlētos antibiotiku diskus (BD) un 16–18 stundas inkubēja ±36 °C temperatūrā termostatā līdz rezultātu nolasīšanai, bet 24 stundas antibiotiku diskus (BD) inkubēja cefoksitīna jutības rezultātu nolasīšanai.

Pēc inkubācijas ar bīdmēru izmērija kultūras augšanas aiztures zonas diametru (iekļaujot arī diska diametru) tā šaurākajā vietā un veica rezultātu interpretāciju pēc izmantoto antibiotiku disku interpretācijas tabulām. Kvalitātes kontrole ar *S. aureus* ATCC 25923.

### **7.5.2. Oksacilīna rezistences un izdalīto *Staphylococcus aureus* izolātu jutības noteikšana pret antimikrobiālajiem preparātiem**

Oksacilīna rezistenci noteica ar *Cefoxitin* 30µg disku (BD) pēc CLSI standarta: *Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventinth Informational Supplement, January 2007*, bet jutību pret antimikrobiālajiem preparātiem ar *Penicillin* 10 µg, *Gentamicin* 10 µg, *Erythromycin* 15 µg, *Cliprofloxacin* 5 µg, *Vancomycin* 30 µg diskām, lietojot disku difūzijas metodi agarā pēc CLSI standarta: *M2-A9 Performance Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standart –Ninth tion*. Izdalītajiem MRSA ar E-testu noteica MIC pret oksacilīnu un vankomicīnu (Kvalitātes kontrole ar *S. aureus* ATCC 25923).

Tā kā makrolīdu rezistentajiem MRSA var būt konstitucionāli vai inducēti izteikta rezistence pret klindamicīnu (23S RNS *erm* gēna kodēta MLS<sub>B</sub> rezistence pret makrolīdiem, linkozamīnu un streptogramīns B vai *msrA* gēna kodēta rezistence tikai pret makrolīdiem), fenotipiski inducēto rezistenci pret klindamicīnu noteica ar D testu, novietojot blakus eritromicīna un klindamicīna diskus, lietojot disku difūzijas metodi agarā vai izmantojot VIEC2 automatizēto sistēmu (*Feibelkorn et al, 2003, Jorgensen et al, 2004*).

### **7.5.3. Minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC) noteikšana ar E testu<sup>®</sup>**

MIC oksacilīnam un vankomicīnam tika noteikta, izmantojot komerciālos Etest<sup>®</sup> (Bio Merieux) atbilstoši ražotāja noteikumiem, un novērtēta pēc CLSI standarta (Kvalitātes kontrole ar *S. aureus* ATCC 29213).

### **7.5.4. *S.aureus* antimikrobiālās jutības noteikšana un rezultātu izvērtēšana SIR sistēmā ar automatizēto VITEK 2, lietojot AST292 komplektu.**

*S. aureus* MIC tika noteikta, lietojot automatizēto VITEK 2 visām AST 292 komplektā iekļautajām antimikrobiālajām vielām atbilstoši 9.5.4.1. tabulai.

Jutības vērtējums tika veikts automātiski, izmantojot VITEK 2 programmu.

AST292 komplektā iekļautās antibiotikas, koncentrācija un vērtējums SIR sistēmā

	OX			GEN			CIP			ERY			CC			TET			VAN			STX			RIF				
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R					
CLSI MIC vērtējums izteikts mg/l	≤2	-	≥4	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4	≤2	4	≥8	≤0.5	1-2	≥4	≤4	8	≥16	≤4	8-16	≥3	2	≤40	-	≥80	≤1	2	≥4	
VITEK2 antimikrobiālo preparātu koncentrācijas mg/l AST 292 komplektā	≤0.25, 0.5, 1, 2 ≥4			≤0.5, 8, ≥16			≤0.5, 1, 2, 4, ≥8			≤0.25, 0.5, 2, ≥8			≤0.25, 0.5, 1, 2, ≥8			≤1.2, ≥16			≤0.5, 1, 2, 4, 8, ≥16			≤10(0.5/9.5), 8/152.16/304, 32/60 8, ≥ 320(16/304)			≤0.25, 0.5, 2, ≥32				

Kvalitātes kontrole ar *S. aureus* ATCC 29213

### 7.5.5. PBP<sub>2</sub> noteikšana ar Slidex MRSA *S. aureus* oksacilīna rezistences apstiprināšanai

PBP<sub>2</sub> proteīnu noteica ar *Slidex* testu (*Bio Merieux*) atbilstoši ražotāja instrukcijai. Īsumā – ar monoklonālām antivielām pret *S. aureus* PBP<sub>2</sub> klātās lateksa daļiņas aglutinē ar pētāmo *S. aureus* mikroorganismu celmu. Ja izdalītais *S. aureus* producē PBP<sub>2</sub>, veidojās ar neapbruņot aci redzams izpārslojums.

### 7.6. MRSA izolātu molekulāri ģenētiskā analīze

#### 7.6.1. MRSA molekulārā verifikācija

Meticilīnrezistento *Staphylococcus aureus* molekulārā verifikācija tika veikta ar multiplekso – polimerāzes ķēdes reakciju, kas balstās uz noteiktu gēnu – *mecA* un *clfA* (*S. aureus* marķieris) – specifisku amplifikāciju. Vienlaicīgi tika amplificēts arī tikai stafilo-  
kokiem specifisks 16S RNS rajons.

#### Baktēriju suspensijas sagatavošana

Ar 10 µl bakterioloģisko cilpu pārbaudāmo mikroorganismu tīrkultūru suspendēja 200 µl fizioloģiskā šķīduma. Nepieciešamības gadījumā sagatavoto materiālu var uzglabāt līdz vienam gadam -20 °C temperatūrā.

#### Izmeklēšanas gaita

Sagatavoja PĶR maisījumu atbilstoši norādēm 7.6.1.1. tabulā.

7.6.1.1. tabula

#### PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus* molekulārajai verifikācijai

Reāģents	Gala koncentrācija
10 x Taq polimerāzes buferis	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 mM
10 mM dNTP maisījums	0,4 mM
praimeris em77	100 nM
praimeris em78	100 nM
praimeris em79	100 nM
praimeris em80	100 nM
praimeris em81	100 nM
praimeris em82	100 nM
Taq polimerāze	1 U
Destilēts ūdens	līdz 25 µl

7.6.1.2. tabula



## Prameri un to pielietojums

N.p.k.	Praimera secība	Amplificējamais gēns	Pielietojums	Atsauce		
1.	2.	3.	4.	5.		
em77	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	16S rRNA	MRSA molekulārā verifikācija	[Giesbrecht et al. 1998]		
em78	CTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCG					
em79	GCAAAAATCCAGCACAAACAGGAAACGA	<i>clfA</i>				
em80	CTTGATCTCCAGCCATAAATTGGTGG					
em81	TCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGC	<i>mecA</i>				
em82	GACACGATAGCCATCTTCATGTTGG					
em95	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	<i>pls</i>			SCC <i>mec</i> tipizēšana	[Doebeling, 1994]
em96	ATTTACCACAAGGACTACCAGC					
em97	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	<i>Kdp</i>				
em98	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG					
em99	ATCAAGACTTGCAATTCAGGC	<i>mecI</i>				
em100	GCGGTTTCAATTCACCTGTC					
em110	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	<i>mecA</i>				
em111	CCACTTCATATCTTGTAACG		PVL toksīna noteikšana	[Panlilio et al, 1992]		
em117	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	<i>luk-PV</i>				
em118	GCATCASTGTATTGGATAGCAAAAAGC				MLST	[Weller, 2000]
em119	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	<i>arcC</i>				
em120	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG					
em121	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	<i>aroE</i>				
em122	GGTGTGTATTAATAACGATATC					
em123	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	<i>glpF</i>				
em124	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC					
em125	ATCGTTTTATCGGGACCATC	<i>gmk</i>				
em126	TCATTA ACTACAACGTAATCGTA					
em127	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	<i>pta</i>				
em128	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA					
em129	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	<i>tpi</i>				
em130	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC					
em131	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC	<i>yqiL</i>				
em132	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		spa tipa noteikšana	[Shopsin et al., 1999]		
em163	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	<i>spa</i>				
em164	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		hlg toksīna noteikšana	[Dinges et al, 2000]		
em167	GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	<i>hlg</i>				
em168	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG					

2. PĶR mēģenēs ienesa 2 µl testējamo baktēriju suspensiju, 23 µl PĶR maisījumu un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

3. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu MRSA (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

4. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5% agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5 x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45 minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5 x TBE buferi.

5. Pēc amplifikācijas paraugus ienesa iepriekš sagatavotajā agarozes gelā, kur tos 40 minūtēs elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja .

6. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts uz UV transiluminatora un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

### Rezultātu interpretācija

PQR iepriekš aprakstītajos apstākļos iespējams amplificēt no 0 līdz 3 fragmentiem:

- 1) 791 bp fragments, kas atbilst stafilokoku 16S RNS rajonam;
- 2) 638 bp fragments, kas atbilst *clfA* gēnam;
- 3) 499 bp fragments, kas atbilst *mecA* gēnam.

Katrai analīzei tika pievienota pozitīvā (jau zināms, identificēts MRSA) un negatīvā (ūdens) kontrole.

#### 7.6.2. *Staphylococcus aureus* PVL gēnu noteikšana

*Staphylococcus aureus luk* – PV gēns tika noteikts ar PQR, izvēloties specifisku praimeru pāri em 117 un em 118.

#### Izmeklēšanas gaita

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1. punktā.
2. Sagatavoja PQR maisījumu atbilstoši norādēm 7.6.2.1. tabulā.
3. PQR mēģenēs ienesa 1 µl testējamo baktēriju suspensijas, 11,5 µl PCR maisījuma un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.
4. PQR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu TOX (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7. 6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5% agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5 x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45

minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5 x TBE buferi.

7.6.2.1. tabula

**PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus* toksīnu gēnu noteikšanai**

Reaģents	Beigu koncentrācija
10 x Reakcijas buferis (+MgCl <sub>2</sub> )	1 x
10 mM dNTP maisījums	0,1 mM
Praimeris em117	200 nM
Praimeris em118	200 nM
Taq polimerāze	1U
Destilēts ūdens	Līdz 12,5 μl

7.6.2.2. tabula

**PĶR režīmi darbā izmantotajām metodēm**

	MRSA	TOX	SPA	MLST	SCCmec
<b>Uzkarsēšana</b>					
Temperatūra	94°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Laiks	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
<b>Denaturācija</b>					
Temperatūra	94°C	95°C	94°C	95°C	95°C
Laiks	0,5 min	0,5 min	0,75 min	0,5 min	0,5 min
<b>Hibridizācija</b>					
Temperatūra	55°C	50°C	57°C	53°C	50°C
Laiks	0,5 min	0,5 min	0,75 min	1 min	0,5 min
<b>Polimerizācija</b>					
Temperatūra	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
Laiks	1 min	0,5 min	1,5 min	1 min	3 min
Ciklu skaits	39	39	39	39	39
<b>Amplifikācijas nobeigums</b>					
Temperatūra	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
Laiks	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min

6. Pēc amplifikācijas paraugus ienesa iepriekš sagatavotajā agarozes gelā, kur tos 40 minūtēs elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja .

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts uz UV transiluminatora un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

### 7.6.3. SCCmec kasešu tipa noteikšana (Oliveira et al, 2002)

SCCmec kasetes tipa noteikšanai tika izmantota multipleksa PĶR metode ar 17 praimeriem, kas ir specifiski astoņiem dažāda tipa kasešu lokusiem un *mecA* gēnam kā iekšējai pozitīvajai kontrolei.

#### Izmeklēšanas gaita

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1 punktā.
2. Sagatavoja PĶR maisījumu atbilstoši norādēm 7.6.3. 1.tabulā.
3. PĶR mēģenēs ienesa 2 µl testējamo baktēriju suspensijas, 48 µl PĶR maisījuma un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

9.6.3.1. tabula

#### PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus* SCCmec kasetes tipa noteikšanai (Oliveira et al, 2002).

Reāģents	Beigu koncentrācija
10 x Reakcijas buferis	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3mM
10 mM dNTP maisījums	0.2 mM (katrs)
Praimeris em95	400 nM
Praimeris em96	400 nM
Praimeris em97	200 nM
Praimeris em98	200 nM
Praimeris em99	400 nM
Praimeris em100	400 nM
Praimeris em101	800 nM
Praimeris em102	800 nM
Praimeris em103	200 nM
Praimeris em104	200 nM
Praimeris em105	400 nM
Praimeris em106	400 nM
Praimeris em107	800 nM
Praimeris em108	400 nM
Praimeris em109	400 nM
Praimeris em110	800 nM
Praimeris em111	800 nM
<i>Taq</i> polimerāze	1,25 U
Destilēts ūdens	Līdz 50 µl

4. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu SCCmec (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5 % agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5X TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīdu, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45 minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5x TBE buferi.

6. Pēc amplifikācijas paraugus ienesa iepriekš sagatavotajā agarozes gelā, kur 40 minūtēs tos elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja.

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts UV transiluminatora un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

#### 7.6.4. *mecA* gēna klases noteikšana (Okuma et al, 2002).

**MecA gēna klase tika noteikta ar PĶR, izmantojot trīs praimeru pārus.**

##### **Izmeklēšanas gaita**

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1. punktā.
2. Atbilstoši 7.6.4.1. tabulai sagatavoja trīs PĶR maisījumus, kas atšķīrās pēc izmantotā praimeru pāra.
3. Katram no testējamiem izolātiem trijās PĶR mēģenēs ienesa 1 µl testējamo baktēriju suspensiju un pievienoja 24 µl PĶR maisījuma attiecīgi katrā ar atbilstošo praimeru pāri un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

7.6.4.1. tabula

**PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus mecA* gēna klases noteikšanai (Okuma et al, 2002).**

Reāģents	Beigu koncentrācija
10X Reakcijas buferis	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10 mM dNTP maisījums	0,2 mM
Praimeris em209*	200 nM
Praimeris Em208*	200 nM
Taq polimerāze	2,5 U
Destilēts ūdens	līdz 25 µl

\* tabulā norādīts praimeru pāris vienam no trīs PĶR maisījumiem. Otrajam PĶR maisījumam jāizmanto em205+em206 praimeru pāris, trešajam maisījumam – em206+em203 praimeru pāris.

4. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu *SCCmec* (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5 % agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45 minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5x TBE buferi.

6. Pēc amplifikācijas, paraugus ienesa iepriekš sagatavotajā agarozes gelā, kur tos 40 minūtēs elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja .

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts UV transiluminatorā un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

#### 7.6.5. *ccr* gēna tipa noteikšana (Okuma et al, 2002)

*ccr* gēna tips tika noteikts ar četrām PĶR reakcijām, izmantojot piecus specifiskus praimerus. Viens no praimeriem bija kopīgs visām reakcijām, kam pārī tika ņemts attiecīgi kāds no četriem atlikušajiem praimeriem.

#### Testēšanas gaita

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1.punktā.
2. Sagatavoja PĶR maisījumu atbilstoši norādēm 7.6.5.1. tabulā.

7.6.5.1. tabula

#### PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus ccr* gēna tipa noteikšanai

Reāģents	Beigu koncentrācija
10 x Reakcijas buferis	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10 mM dNTP maisījums	0,4 mM
Praimeris em194	200 nM
Praimeris em195*	200 nM
Taq polimerāze	1U
Destilēts ūdens	līdz 25 µl

\* tabulā norādīts praimeris vienam no četriem PĶR maisījumiem. Otrajam PĶR maisījumam izmantojams em196, trešajam – em197, ceturtajam – em198.

3. PĶR mēģenēs ienesa 1 µl testējamo baktēriju suspensijas, 24 µl PĶR maisījuma un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

4. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu *SCCmec* (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5 % agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5 x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45 minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5 x TBE buferi.

6. Pēc amplifikācijas paraugus ienesa iepriekš sagatavotajā agarozes gelā, kur 40 minūtēs tos elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja .

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts UV transluminatorā un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

#### 7.6.6. *Staphylococcus aureus spa* tipa noteikšana

*Staphylococcus aureus spa* tipa noteikšanai sākotnēji ar PĶR tika amplificēta *spa* gēna specifiskā sekvence, tālāk iegūtais PĶR produkts tika attīrīts un sekvenēts.

#### Testēšanas gaita

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1. punktā.
2. Sagatavoja PĶR maisījumu atbilstoši norādēm 7.6.6.1. tabulā.

7.6.6.1. tabula

#### PĶR maisījuma sastāvs *Staphylococcus aureus spa* tipa noteikšanai

Reāģents	Beigu koncentrācija
10 x Reakcijas buferis (+MgCl <sub>2</sub> )	1 x
10 mM dNTP maisījums	0,4 mM
Praimeris em163	200 nM
Praimeris em164	200 nM
Taq polimerāze	1,25U
Destilēts ūdens	līdz 50 µl

3. PĶR mēģenēs ienesa 2 µl testējamo baktēriju suspensijas, 48 µl PĶCR maisījuma un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

4. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā un amplificēja ar programmu SPA (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5% agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5 x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45 minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5 x TBE buferi.

6. Pēc amplifikācijas, lai pārlicinātos, ka amplifikācija bijusi sekmīga un iegūts vajadzīgais PĶR produkts, paraugus ienesa agarozes gelā, kur tos 40 minūtēs elektroforēzē 120 V spriegumā sadalīja.

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts UV transiluminatorā un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

8. DNS attīrīšana pirms sekvenēšanas tika veikta ar firmas „Mbiotech” SpinClean™ PCR *Purification* komplektu, kas paredzēts ātrai vienpavediena vai divpavedienu PĶR produktu attīrīšanai. DNS fragmenti tiek attīrīti no oligonukleotīdiem, nukleotīdiem un polimerāzes 90–95% apmērā.

8.1. Marķētos mikrocentrifūgas stobriņos pārnesa attīrāmo PĶR produktu un pievienoja 5 reizes lielāku tilpumu PĶR purifikācijas bufera no reaģentu komplekta, sajauc saņemot.

8.2. Ievietoja *SpinClean*™ kolonnu savācējstobriņā.

8.3. Pārnesa attīrāmo maisījumu uz kolonnu un istabas temperatūrā centrifugēja vienu minūti 13000 rpm.

8.4. Izlēja savācējstobriņa saturu un ievietoja kolonnu atpakaļ savācējstobriņā.

8.5. Pievienoja 750 µl mazgāšanas šķīduma no reaģentu komplekta un centrifugēja vienu minūti 13000 rpm.

8.6. Atkārtoja 4. soli, vēlreiz centrifugējot vienu minūti, lai pilnībā atbrīvotos no atlikušā mazgāšanas šķīduma.

8.7. Pārnesa kolonnu tīrā 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā.

8.8. Pievienoja 50 µl *Elution* buferi.

8.9. Nogaidīja vienu minūti un vienu minūti centrifugēja ar maksimālo ātrumu.

8.10. Izņēma kolonnu no stobriņa un iegūto attīrīto produktu pārbaudīja agarozes gelā.

9. Attīrītie PĶR produkti tika nosūtīti komerciālai sekvenēšanai.



10. Iegūtās *spa* sekvenču hromatogrammas tika analizētas ar datorprogrammu *Ridom StaphType* (Ridom GmbH).

#### 7.6.7. MRSA ST noteikšana

MLST tika veikta ar ar polimerāzes ķēdes reakciju, kas balstās uz septiņu noteiktu *S. aureus* „housekeeping” gēnu – *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* – specifisku amplifikāciju. Iegūtie PĶR produkti tika attīrīti un sekvenēti. Iegūtie sekvenču dati tika salīdzināti ar *SeqNet* datu bāzē esošajiem un noteikts izolāta sekvenču tips (ST).

#### Testēšanas gaita

1. Sagatavoja baktēriju suspensiju pēc apraksta 7.6.1. punktā.
2. Atbilstoši norādēm 7.6.7.1. tabulā sagatavoja PĶR maisījumu katram no septiņiem „housekeeping” gēniem.

7.6.7.1. tabula

#### PĶR maisījuma sastāvs MLST

Reaģents	Beigu koncentrācija
10 x reakcijas buferis	1 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 mM
10 mM dNTP maisījums	0,2 mM
Praimeris em119*	200 nM
Praimeris em120*	200 nM
Taq polimerāze	1,25U
Destilēts ūdens	līdz 50 µl

\* tabulā norādītais *arcC* gēnam specifiskā praimeru pāra piemērs.

3. Katram no testējamiem izolātiem septiņās PĶR mēģenēs ienesa 2 µl testējamo baktēriju suspensijas un pievienoja 48 µl PĶR maisījuma katrā no septiņām mēģenēm ar atbilstošo praimeru pāri un samaisīja pipetējot. Pirmajos divos punktos aprakstītās darbības tika veiktas ledus vannā.

4. PĶR mēģenes ievietoja amplifikatorā ar programmu MLST (programmas amplifikācijas režīmu skatīt 7.6.2.2. tabulā).

5. Amplifikācijas laikā sagatavoja 1,5 % agarozes gelu. 6 g agarozes iebēra kolbā ar 400 ml 0,5 x TBE bufera un uzmanīgi uzvārīja mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze izšķīda un šķidrums kļuva pilnīgi caurspīdīgs. Agarozes šķīdumam pievienoja 1,8 µl etīdija bromīda, atdzesēja ūdens vannā līdz apmēram 50 °C temperatūrai un ielēja gela formā. Gelu 30–45

minūtes sacietināja istabas temperatūrā, pēc tam to pārvietoja elektroforēzes tankā ar 0,5 x TBE buferi.

6. Pēc amplifikācijas, lai pārliecinātos, ka amplifikācija bijusi sekmīga un iegūts vajadzīgais PĶR produkts, paraugus ienesa agarozes gelā, kur tos 40 minūtēs 120 V spriegumā sadalīja.

7. Amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gelā tika parādīts UV transiluminatorā un pēc nepieciešamības fotografēts ar digitālo kameru.

8. DNS attīrīšana pirms sekvencēšanas tika veikta ar firmas „Mbiotech” *SpinClean*<sup>TM</sup> PCR *Purification* komplektu *kit*, kas paredzēts ātrai vienpavediena vai divpavedienu PĶR produktu attīrīšanai. DNS fragmenti tika attīrīti no oligonukleotīdiem, nukleotīdiem un polimerāzes 90–95% apmērā. DNS attīrīšanas protokolu skatīt 2.7. punktā.

9. Attīrītie PĶR produkti tika pārbaudīti agarozes gelā un nodoti komerciālai sekvenēšanai.

10. Iegūtās „housekeeping” gēnu sekvences tika salīdzinātas ar *SeqNet* datu bāzi, pēc kuras tika noteikts sekvences tips (ST).

### 7. 7. Zinātniskās medicīnas literatūras meklēšana datu bāzēs

Pētījuma ietvaros tika veikts sistemātisks literatūras apskats par pētījumā izvirzītajiem jautājumiem, lai atlasītu, noteiktu un analizētu uz pētījumiem balstītu medicīnas zinātnisko literatūru par MRSA ierosinātām infekcijām, to izplatību, klasifikāciju un iespējamo evolūciju un izplatīšanos ar molekulārbioloģiskām un epidemioloģiskām analīzes metodēm, kā arī laboratoriskām un molekulārās tipēšanas metodēm. Sistemātiskā literatūras apskata ietvaros tika izmantotas:

*PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>),

*PubMed Nucleotide Sequences* (<http://www.nlm.nih.gov/database>),

*PubMed Central* (<http://www.pubmedcentral.nih.gov>) datu bāze,

*Google Scholar* (<http://scholar.google.com>) datu bāzes.

- Par atslēgas vārdiem tika lietoti „Methicillin resistant *Staphylocococys aureus*” ar vaicājumtulkojumu („*Staphylococcus aureus*”[MeSH terms] OR („*staphylococcus*” [All Fields] AND „methicillin resistance”).
- Pēc autora [*Author*].

## 7.8. Datu statistiskās apstrādes metode

### 9.8. Datu statistiskās apstrādes metodes.

MRSA gadījumu un no asinīm izdalīto MRSA incidences ticamības intervāli tika rēķināti izmantojot SPSS 16 datorprogrammu. Incidence tika rēķināta uz 100 000 gultas dienām izmantojot slimnīcas oficiālos statistikas datus.

Korelācijas diagramma veidota izmantotjot Microsoft Excel izklājlapu datu aproksimācijai (trend line method). Rēķināts Spīrmana ranku korelācijas koeficients un pieņemts ticamības līmenis  $p < 0,05$ . Neparametriskais korelācijas tests lietots, jo datu sadalījums nav viennozīmīgs.

## 8. REZULTĀTI

### 8.1. MRSA gadījumu izpēte PSKUS 2004.–2010. gadā

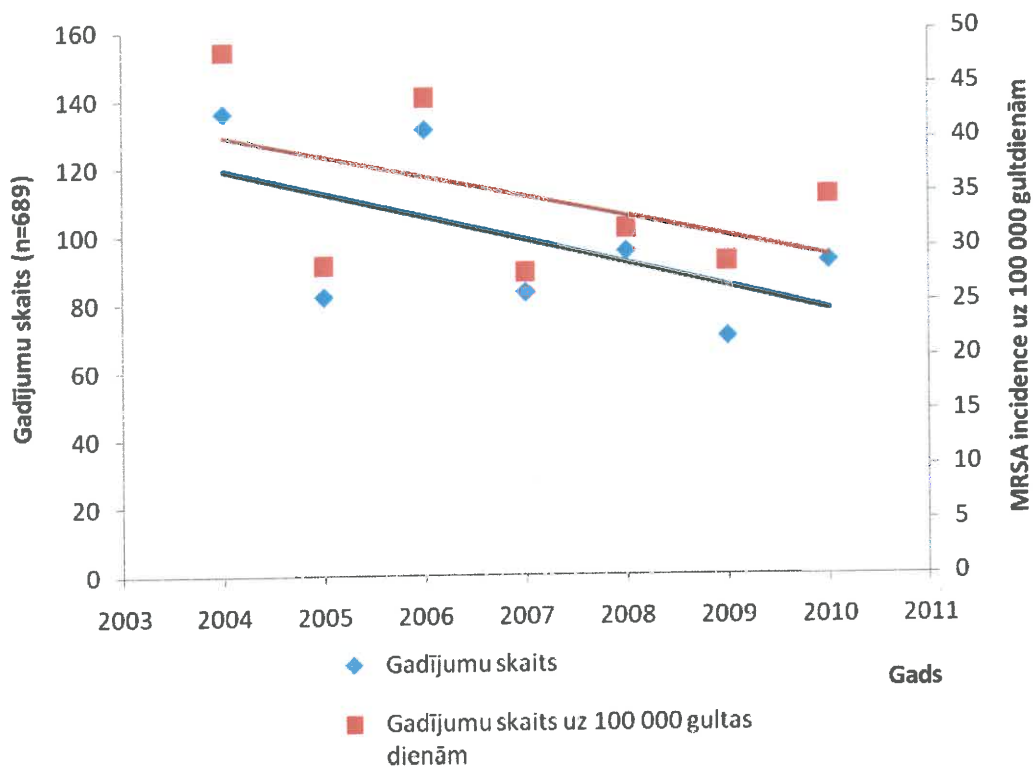
2003. gadā no pacientu patoloģiskajiem materiāliem PSKUS Centrālajā laboratorijā tika izdalīti divi fenotipiski atšķirīgi MRSA, no kuriem viens bija rezistents pret oksacilīnu, eritromicīnu, gentamicīnu, ciprofloksacīnu un trimetoprim/sulfametoksazolu, bet otrs celms bija rezistents tikai pret oksacilīnu un jutīgs pret eritromicīnu, gentamicīnu, ciprofloksacīnu un trimetoprim/sulfametoksazolu. Šādas rezistences profila *S. aureus* celmi literatūrā ir aprakstīti kā stafilokoku hromosomā *mecA* – metecilīna rezistences gēnu saturošie metecilīnrezistentie *S. aureus* celmi. Lai pierādītu šo *S. aureus* tipu piederību metecilīnrezistentajai *S. aureus* grupai un noskaidrotu dažādo MRSA celmu izplatību daudzprofilu slimnīcās, PSKUS Centrālajā laboratorijā tika izstrādātas molekulārās tipēšanas metodes, izvedota MRSA celmu kolekcija un datu bāze no Latvijas mikrobioloģijas laboratoriju iesūtītajiem MRSA izolātiem, veikta izdalīto celmu molekulārā izpēte un tipēšana un iegūtie rezultāti salīdzināti ar citās ES valstīs iegūtajiem rezultātiem (8.4.3.tabula).

Laikā no 2004. līdz 2010. gadam PSKUS 689 ārstētajiem pacientiem pirmreizēji tika izdalīts MRSA un reģistrēts infekciju kontroles nodaļā kā MRSA gadījums. Analizējot katru gadījumu, 41,2% (n=284) tika novērtēti kā MRSA nēsātāji un 58,8% (n=405) bija pacienti ar MRSA infekcijas klīnisko izpausmi. Saslimstība ar MRSA ierosinātām infekcijām PSKUS parādīta 8.1.1. tabulā.

8.1.1. tabula

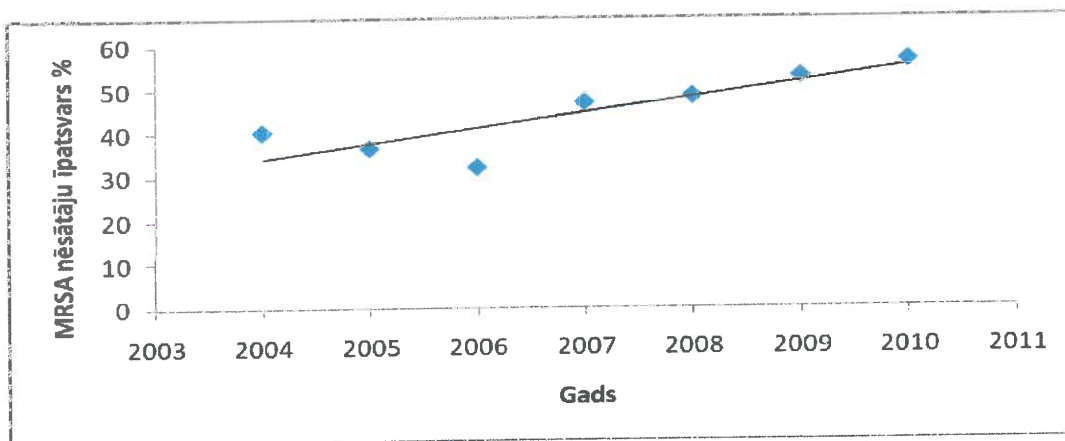
#### MRSA gadījumu skaits un raksturojums PSKUS 2004.–2010. gadā (n=689)

	Gads						
	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.
Guldienu skaits	282198	287813	298077	298973	311022	243777	264126
MRSA gadījumu skaits	136	82	131	83	95	70	92
MRSA incidence uz 100000 guldienu	48,2	28,5	43,9	27,8	31,8	28,7	34,8
95% ticamības intervāls	40,8– 57,0	22,6– 35,4	37,0– 52,1	22,4– 43,4	26,0– 38,9	22,7– 36,2	28,4– 42,7
MRSA nēsātāju īpatsvars % no kopējā MRSA gadījumu skaita	40,4	36,6	32,1	47	48,4	52,9	56,5



8.1.1. att. MRSA gadījumu un MRSA incidences rādītāju korelācijas diagramma 2004. -2010. gadā. MRSA gadījumu skaits;  $R = -0,43$ ,  $p > 0,05$  MRSA incidence;  $R = -0,21$ ,  $p > 0,05$

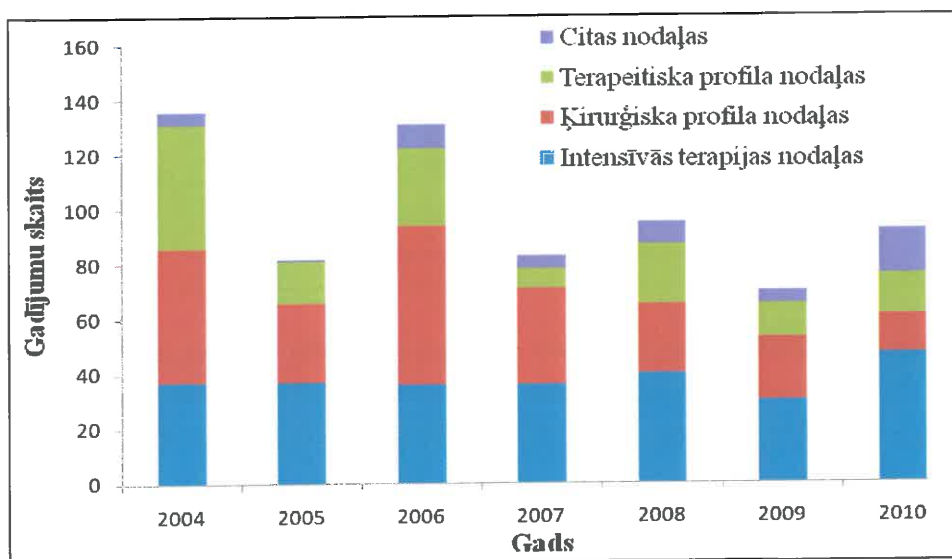
Kā redzams 8.1.1. attēlā, lai arī MRSA gadījumu skaitam un MRSA incidenci uz 100 000 gultdienām ir tendence samazināties, iegūtie rādītāji nav statistiski ticami, jo novērojumu periods ir par īsu. MRSA nēsātāju īpatsvara izmaiņas no visiem MRSA gadījumiem PSKUS parādītas 8.1.2. attēlā.



8.1.2. att. MRSA nēsātāju korelācijas diagramma 2004. -2010. g. (*S. aureus*  $n = 689$  MRSA nēsātāji  $n = 284$ ). MRSA nēsātāju īpatsvars % no visiem MRSA gadījumiem;  $R = 0,86$   $p < 0,05$

Novērojuma periodā vērojama tendence pieaugt MRSA nēsātāju īpatsvaram, kas varētu liecināt par aktīvu MRSA pacientu skrīningu PKUS, un šis pieaugums ir statistiski ticams.

Visi MRSA gadījumi tika analizēti saistībā ar pacienta atrašanos PSKUS nodaļās un gadījumu skaita sadalījums intensīvās terapijas, ķirurģiskajās, terapeitiska profila un pārējās nodaļās parādīts 8.1.3. attēlā.



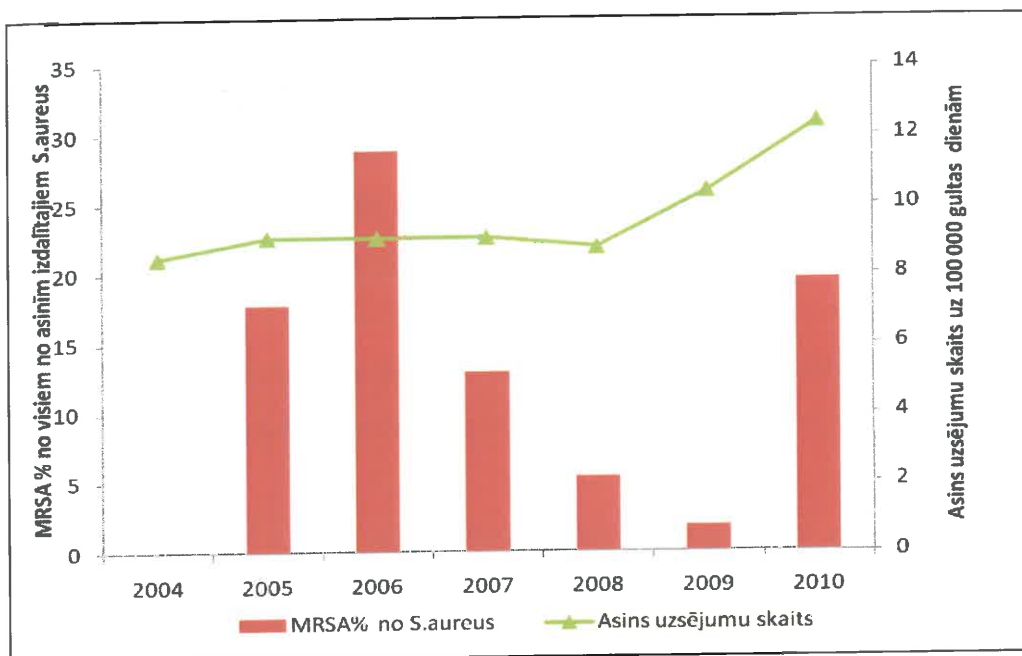
8.1.3. att. MRSA % sadalījums PSKUS slimnīcas nodaļās.  
(MRSA gadījumu skaits n=689)

Lai salīdzinātu PSKUS rezultātus ar citām Latvijas slimnīcām un Eiropas datu bāzi, atbilstoši atsevišķā 8.1.2. tabulā tika analizēti no asinīm izdalītie MRSA.

8.1.2. tabula

No asinīm izdalīto MRSA analīze PKUS 2004.-2010. gadā  
(asins uzsējumu skaits n=18914, MRSA n=38)

	Gads						
	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.
Asins uzsējumu skaits	2389	2605	2695	2704	2723	2530	3268
<i>S.aureus</i>	46	45	38	31	56	55	56
MRSA% no <i>S. aureus</i>	0	17,8	28,9	12,9	5,4	1,8	19,6
MRSA incidence asinīs uz 100000 gultdienām	0	2,8	3,7	1,3	1	0,4	6,4
Ticamības intervāls	0	1,2-5,4	1,8-6,6	0,4-3,4	0,2-2,8	0,01-2,3	4,62-10,31



8.1.4. att. No asinīm izdalīto MRSA % attiecība asins uzņēmumos PSKUS (asins uzņēmumu skaits n=18914, MRSA % no visiem izdalītajiem *S. aureus* =11,6%)

Laikā no 2004. līdz 2010. gadam PSKUS Centrālajā laboratorijā izmeklēti 18 914 asins paraugi. Katram pacientam turpmākā analizē iekļauts pirmais *S.aureus* pozitīvais paraugs. Neskatoties uz MRSA procentuālā īpatsvara samazināšanās tendenci asinīs no visiem izdalītajiem *S. aureus*, izņemot 2006. gadu (n= 28,9%), šī tendence nav statistiski ticami saistāma ar izmeklēto asins paraugu skaita izmaiņām 2004.–2010. gadā.

## 8.2. No asinīm izdalīto MRSA izplatība Latvijā 2004. -2009. g. salīdzinājumā ar Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla dalībvalstīm

2004.–2005. gadā antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iesaistījās septiņas laboratorijas un to apkalpotās slimnīcas:

- Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīcas Centrālā laboratorija,
- Bērnu klīniskā universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija,
- Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija,
- Valsts aģentūras „Latvijas infektoloģijas centrs” Mikrobioloģijas laboratorija,
- Rīgas 1. pilsētas slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija,
- SIA „Centrālā laboratorija”,
- Vidzemes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.

No 2006. līdz 2009. gadam antimikrobiālās uzraudzības tīklam pievienojās vēl piecas laboratorijas un to apkalpotās slimnīcas:

- Rīgas dzemdību nama Mikrobioloģijas laboratorija,
- Daugavpils reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija,
- Valsts aģentūras „Latvijas infektoloģijas centrs“,
- Tuberkulozes un plaušu klīnikas Mikrobioloģijas laboratorija,
- Ziemeļkurzemes reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija,
- Liepājas reģionālās slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija.

2010. gada rezultāti turpmākā analizē nav iekļauti, jo rezultātu apkopošana tiek veikta nākamā gada otrajā pusgadā.



8.2.1. att. Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iesaistīto reģionu un laboratoriju ģeogrāfiskais izvietojums



**Eiropas un nacionālajā antibakteriālās rezistences uzraudzības tīklā iekļauto  
laboratoriju un slimnīcu dati 2005.-2009. gadā**

	Gads				
	2005	2006	2007	2008	2009
Dalīblaboratoriju skaits	11	12	12	12	7
Stacionāru skaits	11	12	12	12	9
Iedzīvotāju skaits*	2 306 534	2 294 590	2 281 305	2 270 894	2 261 294
Asins uzņēmumu skaits	9 395	15 409	15 019	14 584	9717
Gultu skaits stacionāros	4 603	6129	5 969	6 329	5508
Gultdienu skaits	1 276 513	1 651 925	1 609 778	1 746 084	1 304 118
Vidējā gultas slodze procentos	79	77	75	76	82
Vidējais gultdienu skaits uz pacientu	8	7	7	7	7,3
Aptuveni aptvertā iedzīvotāju populācija **	1 801 593	1 076 400	1 580 323	1 710 000	1 697 000
Aptvertā iedzīvotāju populācija %**	78	47	70	77	75

\*Centrālā statistikas pārvalde

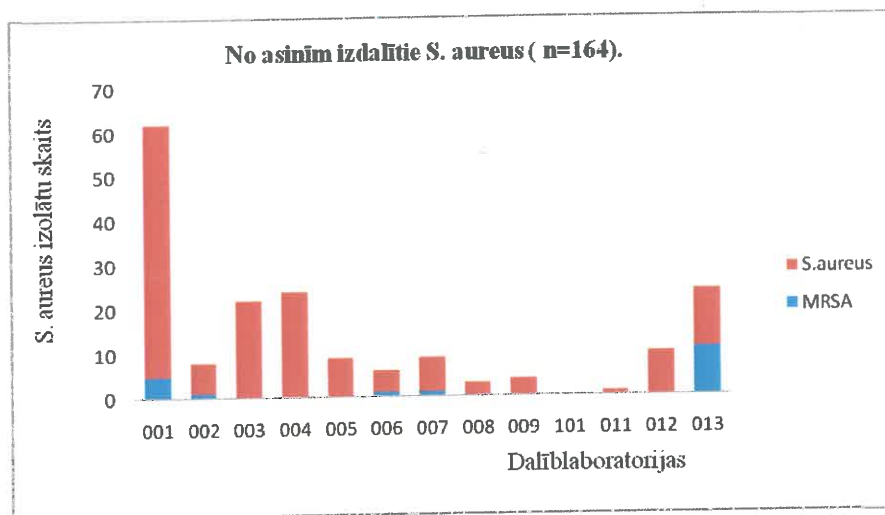
\*\* Aptvertā iedzīvotāju populācija absolūtos skaitļos un procentuāli ir subjektīva dalīblaboratoriju informācija. Lai arī reģionālo slimnīcu aptvertās populācijas rādītāji pamatojas uz iedzīvotāju skaitu atbilstošajā reģionā, neprecīzākā informācija ir saņemta par Rīgu, jo Rīgas pilsētu nosacīti apkalpo divas universitātes un vairākas specializētās slimnīcas, kurās ārstējas ne tikai Rīgas, bet arī citu reģionu iedzīvotāji. Tādēļ dati par aptverto iedzīvotāju populāciju turpmākai analīzei netika izmantoti. 2004.gadā 8.2.1. tabulā apkopotā informācija netika vākta.

**No asinīm izdalīto *S.aureus* un MRSA īpatsvars %**

**(*S. aureus*: n = 907, MRSA: n=129)**

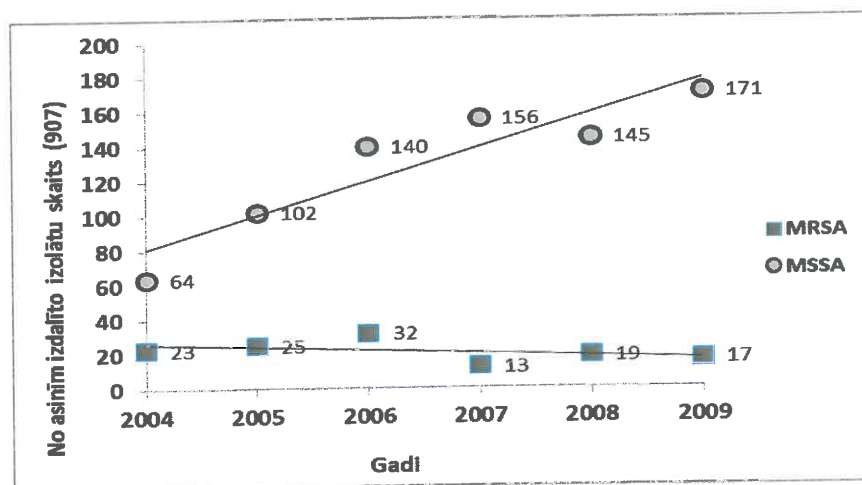
<i>S.aureus</i> izolāti	Gads						Kopā
	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	
No asinīm izdalīto <i>S.aureus</i> izolātu skaits	87	127	172	169	164	188	907
MRSA %	26.4	19,7	18,6	7.7	11,6	9	14,2

Kā redzams 8.2.2. tabulā, no asinīm izdalīto MRSA izolātu īpatsvars no visiem izdalītajiem *S. aureus* 2004.g – 2009.g. atbilstoši samazinājās: 26,4% (n=23) , 19,7% (n= 25) , 18,6% ( n=32) , 7,7%(n = 13), 11,6%(n =19 ) un 9% ( n = 17 )., bet no asinīm izdalīto MSSA izolātu īpatsvars no visiem izdalītajiem *S. aureus* pieauga no 73,6% (n=64) 2004.gadā līdz 91% (n=171) 2009.gadā.



**8.2.2. att. No asinīm izdalīto MRSA sadalījums  
EARSS dalīblaboratorijās 2008. gadā**

Jāatzīmē, ka 2008. gadā no asinīm izdalīto MRSA skaita pieaugumu veido galvenokārt vienas (013) dalīblaboratorijas rezultāti (skat. 8.2.2 attēlu).



**8.2.3. att. No asinīm izdalīto *S. aureus* un MRSA korelācijas diagramma  
2004.–2009. gadā (*S. aureus*  $r=0,94$ ,  $p<0,05$ ), MRSA  $r = -0,6$ ;  $p=0,2$  )\***  
\*Izmantojot Spīrmena korelācijas koeficientu, jo nav viennozīmīgs datu sadalījums.

Laikā no 2004. līdz 2009. gadam ir vērojams no asinīm izdalīto *S. aureus* skaita pieaugums, kas liecina par statistiski ticamu šī mikroorganisma ierosinātās bakterēmijas izplatības pieaugumu. Lai gan vērojama no asinīm izdalīto MRSA samazinājuma tendence, tomēr novērojuma periods ir par mazu, lai iegūtu statistiski ticamus rezultātus ( $p>0,05$ ). Iegūtos rezultātus apstiprina arī Latvijā no asinīm izdalīto *S.aureus* un MRSA incidence uz 100 000 gultdienām (8.2.3. tabula).

**No asinīm izdalīto *S. aureus* un MRSA incidence  
uz 100 000 gultdienām Latvijā**

	Gads				
	2005	2006	2007	2008	2009
No asinīm izdalīto <i>S. aureus</i> incidence	8,0	8,5	9,7	8,3	13,1
Ticamības intervāls (TI)	6,6-9,7	7,2-10,0	7,1-9,8	7,1-9,8	13,1-15,2
No asinīm izdalīto MRSA incidence	1,97	1,94	0,81	1,09	0,81
Ticamības intervāls (TI)	1,33-2,89	1,37-2,79	0,47-1,38	0,70-1,70	1,30 - 2,08

### 8.3. MRSA izolātu fenotipiskais un genotipiskais raksturojums

Neatkarīgi no antimikrobiālās jutības noteikšanas metodes (disku difūzijas metode agarā, minimālās inhibējošās koncentrācijas noteikšana ar E testu vai VITEK2 *Bio Merieux* analizatoru) izdalītajiem MRSA pēc fenotipiskajām īpašībām novēroja divējāda tipa MRSA celmus:

- a) ar multiplu rezistenci pret makrolīdiem, tetraciklīniem, hinoloniem un dažādiem rezultātiem pret aminoglikozīdiem un folijskābes aktīvās formas sintēzes inhibitoriem, kā arī jutību pret rifampicīnu un vankomicīnu kas, kā jau minēts literatūras aprakstā, ir raksturīgs HI-MRSA;
- b) ar rezistenci tikai pret oksacilīnu un jutību pret citām antibiotikām, kas raksturīgs SI-MRSA.

#### 8.3.1. HI-MRSA izolātu fenotipēšana

No PSKUS Centrālās laboratorijas izolātu kolekcijas tika noteikts antimikrobiālās rezistences profils pēc MIC ar VITEK®2 Systems analizatoru 53 izvēlētiem MRSA izolātiem, proporcionāli pārstāvējot 2004.–2010. gadu. Iegūtie rezultāti apkopoti 8.3.1.1. tabulā.

Visu analizēto MRSA izolātu antimikrobiālās rezistences profils atspoguļots 3. pielikumā.

## 8.3.1. 1. tabula

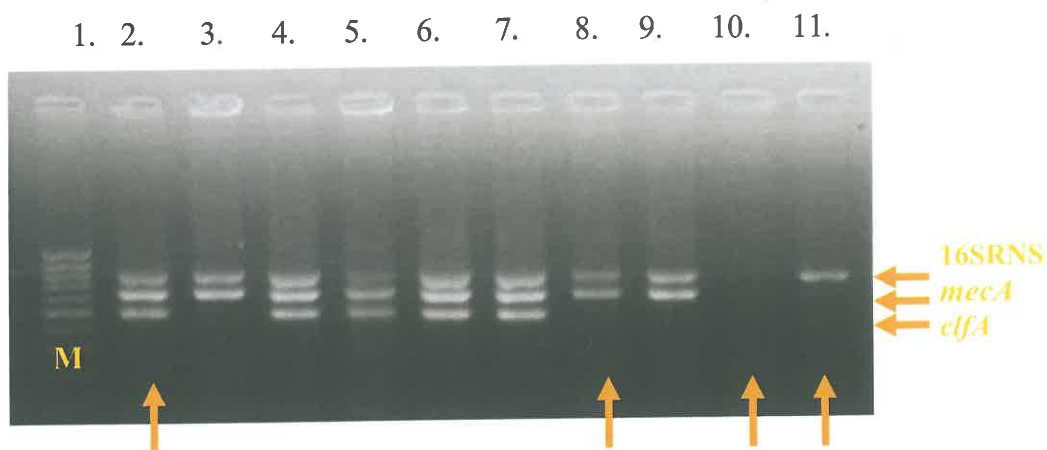
## MRSA izolātu antimikrobiālā jutība izteikta mg/l (n=53)

Gads	OXA		GEN		GIP		ERY		CC		TET		VAN		STX		RIF	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
2004.g.	Izolātu skaits (n=9)	0	9	9	0	9	0	9	2	7	0	9	9	0	2	7	0	9
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	ind.re z.	ind.re z.	≥16	≤0,5-1,5	≤10-40	80- >320	≤0,5	≤0,5	≤10-40	80- >320	≤0,5	≤0,5	≤0,5
2005.g.	Izolātu skaits (n=8)	0	8	6	0	8	0	8	0	8	0	8	8	0	4	4	8	0
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	ind.re z.	ind.re z.	≥16	≤0,5-1	≤10-40	80-160	≤0,5	≤0,5	≤10-40	80-160	≤0,5	≤0,5	≤0,5
2006.g.	Izolātu skaits (n=8)	0	8	6	0	8	0	8	0	8	0	8	8	0	5	5	8	0
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	ind.re z./≥8	ind.re z./≥8	≥16	1	20	≥320	≤0,5	≤0,5	20	≥320	≤0,5	≤0,5	≤0,5
2007.g.	Izolātu skaits (n=6)	0	6	5	0	6	0	6	0	6	0	6	6	0	3	3	6	0
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	ind.re z./≥8	ind.re z./≥8	≥16	≤0,5	≤10-20	≥320	≤0,5	≤0,5	≤10-20	≥320	≤0,5	≤0,5	≤0,5
2008.g.	Izolātu skaits (n=5)	0	5	3	0	5	0	5	0	5	0	5	5	0	2	2	5	0
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	ind.re z.	ind.re z.	≥16	≤0,5-1	≤10-20	≥320	≤0,5	≤0,5	≤10-20	≥320	≤0,5	≤0,5	≤0,5
2009.g.	Izolātu skaits (n=5)	0	5	4	0	5	0	5	0	5	0	5	5	0	3	3	5	0
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	4,0	4,0	≥16	1,0	≤10-40	80	1,0	1,0	≤10-40	80	1,0	1,0	1,0
2010.g.	Izolātu skaits (n=12)	0	12	10	0	12	0	12	1	11	0	12	12	0	12	0	11	1
	Juĥības rezultāti mg/l	≥4	≥16	≥8	≥8	4-≥8	4-≥8	≥16	≤0,25	≤10-40	80	≤0,5	≤0,5	≤10-40	80	≤0,5	≤0,5	≤0,5

Pēc 8.3.1.1. tabulā apkopotajiem antibiogramu rezultātiem redzams, ka visi 53 izmeklētie *S. aureus* izolāti ir rezistenti pret oksacilīnu koncentrācijās, kas ir vienādas un lielākas par 4 mg/l. Visu MRSA izolātu jutība pret oksacilīnu tika apstiprināta ar E testu, lai fenotipiskā līmenī diferencētu iespējamās intrahospitalos un sadzīvē iegūtos MRSA izolātus tālākai izpētei ar molekulārajām metodēm. Visu 53 MRSA celmu oksacilīna rezistence bija >256 mg/l atbilstoši iespējamai oksacilīna koncentrācijas noteikšanai ar E testu. Visi MRSA izolāti bija rezistenti pret ciprofloksacīnu un eritromicīnu koncentrācijā  $\geq 8$  mg/l, tetraciklīnu koncentrācijā  $\geq 16$  mg/l. 50/53 analizētajiem MRSA celmiem tika konstatēta klindamicīna inducētā rezistence, 12/53 celmi bija jutīgi pret gentamicīnu koncentrācijā  $\leq 0,5$  mg/l, 29/53 celmi bija jutīgi pret sulfametoksazolu/trimetoprimu koncentrācijā līdz 2/38 mg/l (40 mg/l), visi MRSA izolāti bija jutīgi pret vankomicīnu 0,5–1,0 mg/ un rifampicīnu  $\leq 0,5$ –1,0 mg/l robežās, izņemot vienu celmu S-8353-10, kas bija rifampicīna rezistents koncentrācijā  $\geq 32$  mg/l. Šāds fenotipiskās rezistences profils pēc literatūras atbilst intrahospitalajiem MRSA celmiem.

### 8.3.2. HI –MRSA izolātu genotipēšana

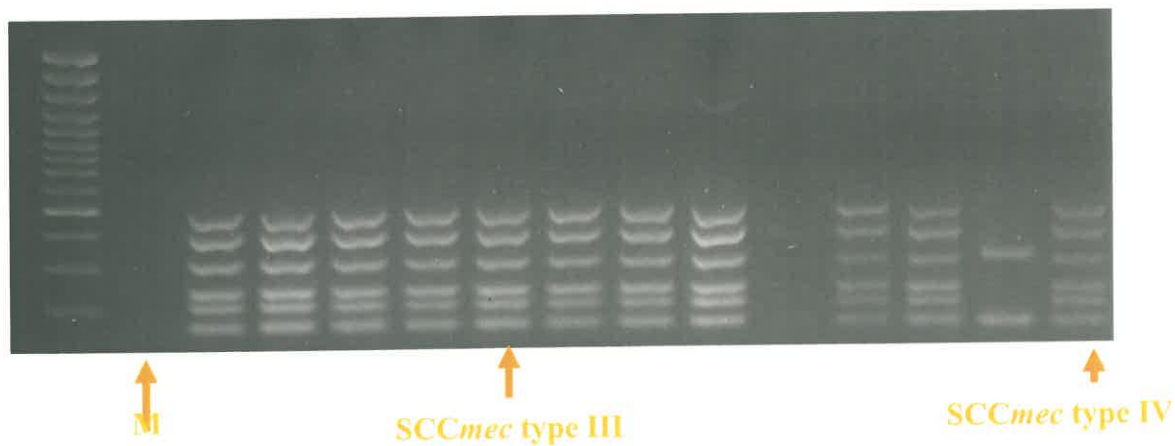
Pētījumā izvēlētie 2004.–2010. gada MRSA izolāti no PSKUS Centrālās laboratorijas kolekcijas pēc fenotipiskās rezistences profila noteikšanas un pirms to tālākas ģenētiskās klasificēšanas tika verificēti kā MRSA ar multipleksu PQR. Ar šo metodi vienlaicīgi iespējams noteikt, vai testējamā baktērija ir stafilokoks, vai testējamā baktērija ir *S. aureus* un vai testējamā baktērija satur *mecA* gēnu – meticilīnrezistences noteicēju. 8.3.2.1. attēlā redzams MRSA molekulārās verifikācijas piemērs – ja paraugam ir visas trīs ģenētisko marķieru zonas, tas ir meticilīnrezistents *S. aureus* (MRSA), ja paraugam ir tikai divas ģenētisko marķieru zonas, tas ir meticilīnjutīgs *S. aureus* (MSSA). Savukārt iekšējai kontrolei bija izvēlēts *E. coli* izolāts un meticilīnjutīgs koagulāzes negatīvs stafilokoks (CoNS). *S. aureus* ir meticilīnrezistents, ja paraugam ir visas trīs ģenētisko marķieru zonas, meticilīnjutīgs *S. aureus* – divas ģenētisko marķieru zonas.



8.3.2.1. att. PĶR amplifikācijas produktu sadalījums 1% agarozes gelā.  
**M** molekulārais marķieris; 2, 4 -7 – meticilīnrezistentais *S. aureus*; 3,8 un 1 – koagulāzes  
 neaktīvie meticilīnrezistentie stafilokoki; 10 – *E. coli*  
 (negatīvā kontrole); 11 – koagulāzes negatīvais stafilokoks

Pēc izolātu meticilīna rezistences noteicēja *mecA* gēna molekulārās verifikācijas ar PĶR tika veikta izolātu ģenētiskā tipēšana:

a) *SCCmec* kasetes tipa noteikšana (n=53) (skat 8.3.2.2. attēlu):.



8.3.2.2. att. *SCCmec* kasetes tipa noteikšana, izmantojot multiplexu PĶR.

Visiem HI-MRSA tika noteikta viena *SCC mec* III tipa kasete.

- b) MLST izvēlētajiem MRSA celmiem,
- c) *spa* tips.

## HI-MRSA sekvenču tipi (n=53)

Gads	Gēns Izolātu skaits	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>Pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	ST
2004.	9	2	3	1	1	4	65	3	368
2005.	8	2	3	1	1	4	65	3	368
2006.	8	2	3	1	1	4	65	3	368
2007.	6	2	3	1	1	4	65	3	368
2008.	5	2	3	1	1	4	65	3	368
2009.	5	2	3	1	1	4	65	3	368
2010.	12	2	3	1	1	4	65	3	368

Kā redzams 8.3.2.1. tabulā, visi HI-MRSA pieder vienam sekvenču tipam –ST 368.

HI-MRSA noteiktie *spa* tipi

Gads	Izolātu skaits	<i>spa</i> atkārtojumi	<i>spa</i> tips
2004.	9	15-12-16-02-25-17-25	t425
2005.	8	15-12-16-02-25-17-25	t425
2006.	8	15-12-16-02-25-17-25	t425
2007.	6	15-12-16-02-25-17-25	t425
2008.	5	15-12-16-02-25-17-25	t425
2009.	5	15-12-16-02-25-17-25	t425
2010.	12	15-12-16-02-25-17-25	t425

Iegūtie rezultāti parāda, ka Latvijā ir izplatīts viens endēmisks HI-MRSA celms ST368-MRSA-III-(t425).

Atsevišķā grupā, no PSKUS Centrālās laboratorijas izolātu kolekcijas ar disku difūzijas metodi agarā, tika noteikts un pēc CLSI standarta analizēts antimikrobiālās rezistences profils visiem fenotipiski atšķirīgajiem MRSA celmiem aizdomīgiem uz SI-MRSA (n=9). Oksacilīna rezistence tika apstiprināta ar E testu un tika izteikta mg/l, nosakot MIC( skat. 8.3.3.1 tabulu).

### 8.3.3. SI-MRSA izolātu fenotipēšana

8.3.3.1. tabula

#### SIR sistēmā (n=9) novērtēta SI-MRSA izolātu antimikrobiālā jutība

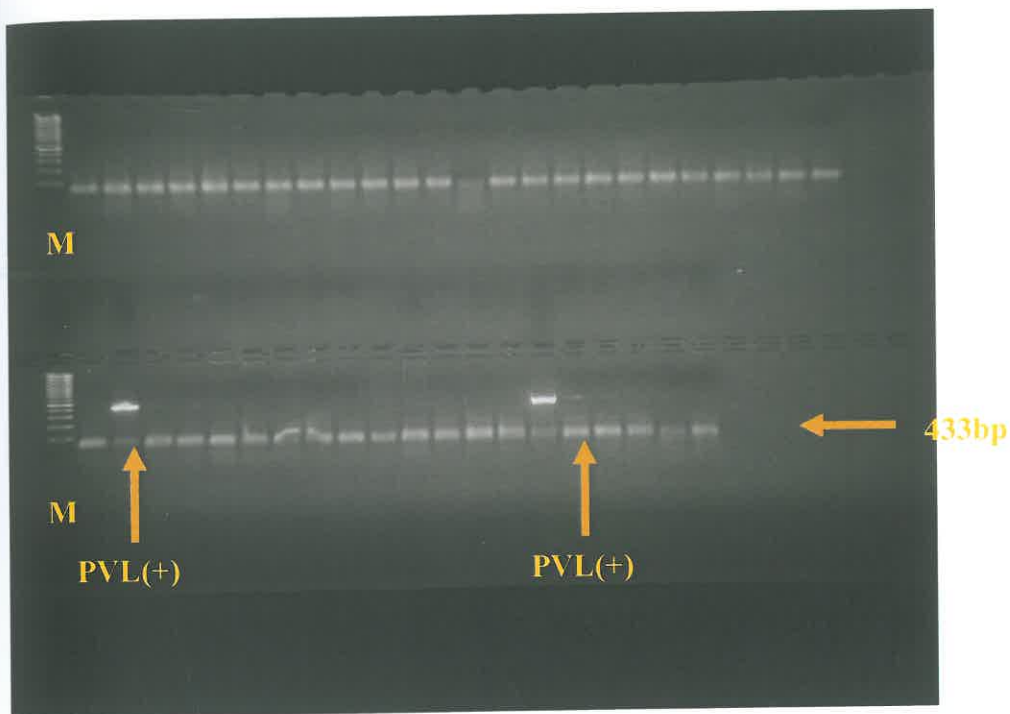
MRSA izolāti	Gads	OXA*	GEN	CIP	ERY	TET	CC	VAN	STX	RIF
S-5408	2003	2,0	S	S	S	S	S	S	S	S
Amb 7	2004	2,0	S	S	S	S	S	S	S	S
M 228	2004	2,0	S	S	S	S	S	S	S	S
A-2185	2004	0,19	S	S	S	S	S	S	S	S
A-0439	2005	0,38	S	S	S	S	S	S	S	S
20050317-708	2005	0,19	S	S	S	S	S	S	S	S
3256	2005	0,09	S	S	S	R	S	S	S	S
200601100524	2006	0,19	S	S	S	S	S	S	S	S

Šos no PSKUS un citām laboratorijām atsūtītos MRSA izolātus fenotipiski raksturo oksacilīna rezistences/jutības robežkoncentrācija ap 2 mg/l un jutība pret pārējiem testētajām antibiotikām.

### 8.3.4. SI-MRSA izolātu genotipēšana

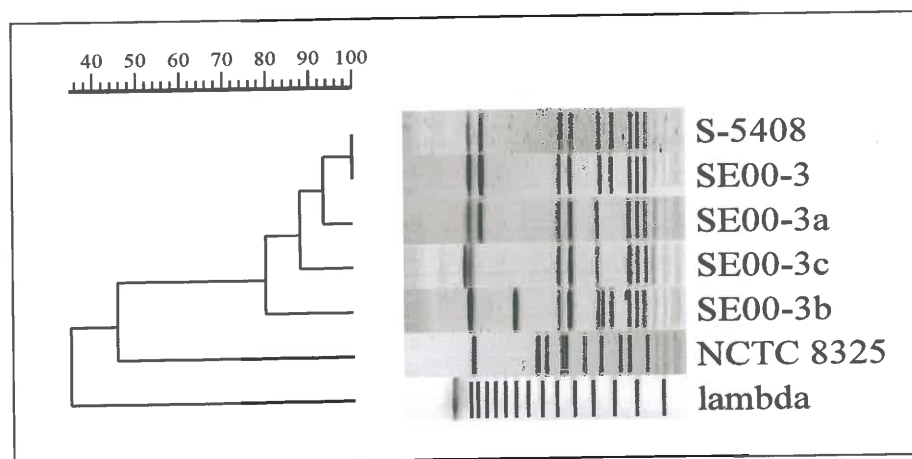
Lai gūtu pārliecību, ka visi, sākot no 2003. gada, pēc fenotipiskajām īpašībām atšķirīgie izolētie *S. aureus* celmi ir MRSA, šie celmi tika verificēti kā MRSA ar multipleksa – PĶR un tad izmeklēti. Lai raksturotu un apstiprinātu pētījumā iekļauto MRSA izolātu atšķirību no citiem datu bāzē esošajiem MRSA celmiem un izpētītu to iespējamo piederību SI-MRSA, pirmkārt, ar polimerāzes ķēdes reakciju tika veikts skrīnings, lai noteiktu PVL toksīna gēnus luk –PV, kas ir viena no galvenajām SI-MRSA celmu raksturīgākajām pazīmēm. PVL toksīna gēnu skrīninga PĶR, salīdzinot ar citām MRSA molekulārās analīzes metodēm, ir tehniski vieglāk veicama, ne tik laikietilpīga, un lētāka metode, tādēļ tā tika izvēlēta primārai MRSA izolātu pārbaudei (8.3.4.1. attēls).





8.3.4.1. att. *Luk-PV* amplifikācijas produktu sadalījums 1% agarozes gelā.  
 M-molekulārais marķieris (*GeneRuler* 100bp Plus, fermenta).  
 Ar bultiņām norādīti PVL pozitīvie izolāti

Lai gan PVL toksīna producēšana ir svarīga SI-MRSA identificēšanas pazīme, visus šo toksīnu producējošos celmus nevar uzskatīt par sadzīvē iegūtiem, jo arī hospitālie celmi var būt PVL toksīna producētāji (*Naimi et al, 2003, Holmes et al, 2005*). Vispirms pirmais Latvijā izdalītais uz sadzīvē iegūto MRSA aizdomīgais izolāts tika salīdzināts ar Zviedrijā ģenētiski līdzīgajiem MRSA celmiem atbilstoši 8.3.4.2. attēlam.



8.3.4.2. att. Zviedrijas un Latvijas ST30 – MRSA – IV izolātu pēc pulsējošā lauka elektroforēzes rezultātiem sastādīta dendrogramma

Līdzīgi HI-MRSA izolātiem, arī šajā gadījumā tika veikta izdalīto SI-MRSA PVL pozitīvo MRSA izolātu klasificēšana pēc *SCCmec* kasetes, sekvences tipa (ST) un *spa* kompleksa.

Visiem SI-MRSA tika noteikta viena *SCC mec* IV tipa kasete (skat 8.3.4.2. tabulu).

8.3.4.1. tabula

#### SI-MRSA sekvneces tipi (n=9)

Izolāta nr.	Gēns							ST
	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	
S-5408-03	2	2	2	2	6	3	2	30
Amb-7	2	2	2	2	6	3	2	30
A-2185-04	2	2	2	2	6	3	2	30
M228	2	2	2	2	6	3	2	30
A-0439-05	2	2	2	2	6	3	2	30
20050317-708	2	2	2	2	6	3	2	30
20050511-676	1	1	1	1	1	1	1	1
3256	1	1	1	1	1	1	1	1
200601100524	2	2	2	2	6	3	2	1

Analizējot 8.3.4.1. tabulā apkopotos gēnu sekvenču rezultātus, jāsecina, ka visi SI-MRSA izolāti ir piederīgi diviem dažādiem sekvenču tipiem (ST). Seši no deviņiem celmiem (20050317-708, Amb-7, M228, A-0439-05, S-5408-03) bija līdzīgi pirmajam Latvijā identificētajam, SI - MRSA celmam un piederīgi ST30 un trīs SI-MRSA celmi bija piederīgi ST1.

8.3.4.2. tabula

#### SI-MRSA *spa* tipi

Celms	<i>spa</i> sekvence	<i>spa</i> tips	ST	<i>SCC mec</i>
S-5408-03	08-16-02-16-02-25-17-24	t019	30	IV
Amb-7	08-16-02-16-02-25-17-24	t019	30	IV
A-2185-04	08-12-02-43-34-16-02-16	t1496	30	IV
M228	08-16-02-16-02-25-17-24	t019	30	IV
A-0439-05	15-12-16-02-16-02-25-17-24	t021	30	IV
20050317-708	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24	t012	30	IV
20050511-676	07-23-21-22-16-34-33-13	t1497	1	IV
3256	07-23-21-16-34-34-33-13	t098	1	IV
200601100-524	07-23-21-16-34-33-13	t127	1	IV

Pēc *spa* tipa tika atrasti divi jauni SA-MRSA ar t1496 un t1497 *spa* tipiem, kas līdz šim nebija zināmi un mūsu pētījumā aprakstīti pirmoreiz (skat. 8.3.4.2. tab.).

**8.4. No asinīm izdalīto *S. aureus* raksturojums  
pēc spa tipa Latvijā salīdzinājumā ar Eiropā izplatītajiem  
*S. aureus* t.sk. MRSA celmiem**

Lai noskaidrotu Latvijā dominējošos *S. aureus* un MRSA celmus un tos salīdzinātu ar citās Eiropas valstīs izplatītajiem *S. aureus* un MRSA celmiem, kā arī noteiktu iespējamo MRSA izplatību Latvijā, PSKUS Centrālā laboratorija piedalījās kolaboratīvā pētījumā, kas aptvēra 26 Eiropas valstis, 450 slimnīcas un 357 laboratorijas. No visām Eiropas Antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīklā iesaistītajām Latvijas laboratorijām pēc vienota protokola laikā no 2006. gada septembra līdz 2007. gada februārim tika saņemti pirmie pieci no asinīm izdalītie invazīvie *S. aureus* un pieci MRSA celmi. Pie sadzīvē iegūtajiem izolātiem pieskaitīja *S. aureus* izolātus pacientiem, kuriem asins uzsējums tika veikts pirmo divu dienu laikā pēc iestāšanās slimnīcā, pārējos *S. aureus* izolātus raksturoja kā intrahospitālos *S. aureus* celmus (sk. 8. pielikumu).

8.4.1. tabulā dots visu *spa* tipa noteikšanas pētījuma dalībvalstu raksturojums pēc iegūtajiem rezultātiem.

8.4.1. tabula

***S. aureus* un MRSA *spa* tipa noteikšanas pētījuma dalībnieku raksturojums**

Valsts	Lab.skaitis	Slimnīcu skaits	Izolātu skaits	MSSA	MRSA*	MSSA Spa tipu skaits	MRSA spa tipu skaits	Izolātu skaits, kas netipējās	(%) netipēto izolātu skaits
Austrija	18	48	174	120	54	70	19	1	0,6
Beļģija	22	22	195	107	88	65	25	1	0,5
Bulgārija	8	8	54	29	25	23	11	0	0,0
Horvātija	11	11	88	50	38	27	13	6	6,8
Kipra	1	1	16	9	7	8	5	0	0,0
Čehija	20	20	145	94	51	64	9	0	0,0
Vācija	14	30	112	108	4	70	2	3	2,7
Somija	5	5	22	15	7	14	7	0	0,0
Francija	23	23	225	114	111	75	27	0	0,0
Vācija	27	27	180	98	82	56	20	1	0,6
Griekija	3	3	35	20	15	12	6	6	17,1
Ungārija	10	13	110	66	44	35	9	2	1,8
Islande	1	1	5	5	0	5	0	0	0,0
Īrija	22	22	169	85	84	55	26	0	0,0
Itālija	19	19	147	80	67	53	15	0	0,0
<b>Latvija</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>43</b>	<b>38</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Malta	1	1	15	3	12	2	5	3	20,0
Nīderlande	18	21	204	195	9	98	9	6	2,9
Norvēģija	11	20	55	55	0	37	0	2	3,6

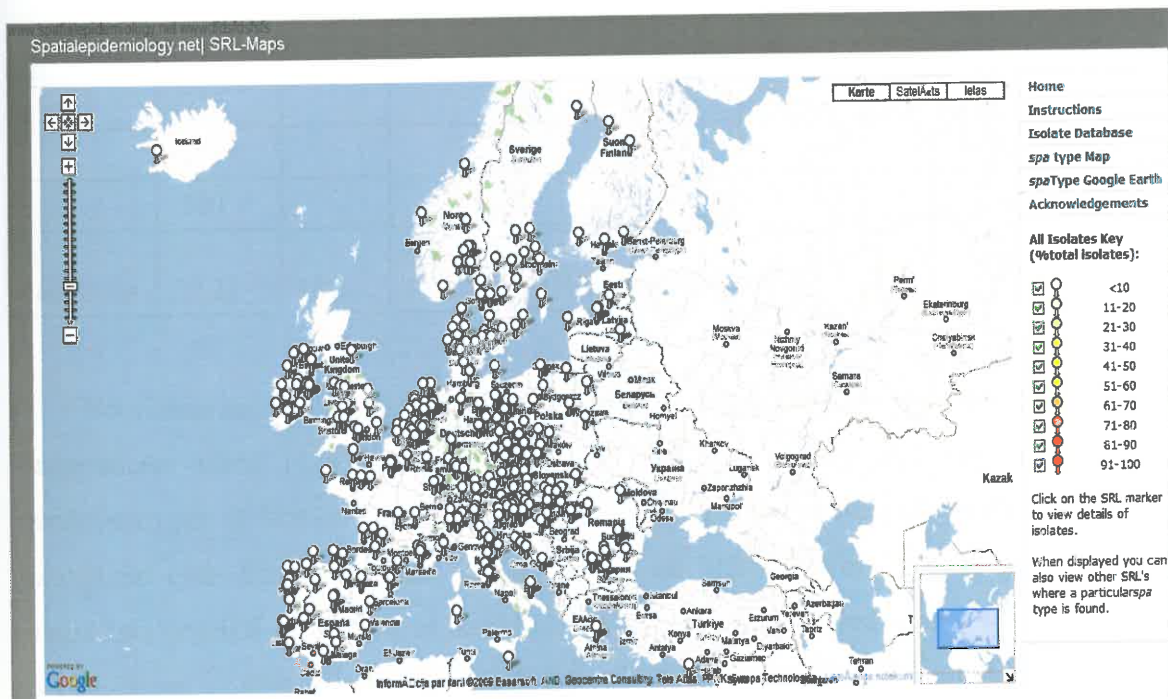
8.4.1. tabulas turpinājums

Valsts	Lab.skaitis	Slimnīcu skaits	Izolātu skaits	MSSA	MRSA*	MSSA Spa tipu skaits	MRSA spa tipu skaits	Izolātu skaits, kas netipējās	(%) netipēto izolātu skaits
Polija	23	23	179	132	47	42	14	0	0,0
Portugāle	12	12	88	48	40	36	13	0	0,0
Rumānija	10	10	36	25	11	18	3	0	0,0
Slovākija	11	12	58	48	10	29	3	2	3,4
Spānija	21	21	204	113	91	57	19	2	1,0
Zviedrija	20	47	200	195	5	90	5	5	2,5
Apvienotā karaliste	15	18	131	71	60	50	15	22	16,8
<b>Kopējais skaits</b>	<b>357</b>	<b>450</b>	<b>2890</b>	<b>1923</b>	<b>967</b>	<b>563</b>	<b>153</b>	<b>62</b>	<b>2.1</b>

\* Piezīme. MRSA skaits neatspoguļo MRSA izplatību valstī, jo atbilstoši protokolam tika pētīti pirmie pieci MSSA un pieci MRSA no asinīm izdalītie invazīvie MSSA un MRSA.

No 11 Latvijas laboratorijām un 12 slimnīcām tika atsūtīti un PSKUS Centrālajā laboratorijā izmeklēti 43 paraugi. No visiem iesūtītajiem izolātiem 38 bija *S. aureus* un 5 MRSA izolāti.

8.4.1. attēlā parādīti iegūtie *spa* tipi dažādās Eiropas valstīs.



8.4.1. att. *Spa* tipu izplatības Eiropas karte

43 Latvijas *S. aureus* izolāti veidoja 21 dažādus *S. aureus spa* tipus (skat 8.4.2. tabulu), no kuriem biežāk sastopamais bija t435 (18,6%) un t015 (11,63%) *spa* tips. Mazākus kompleksus no metilcilin jutīgajiem *S. aureus* izolātiem veidoja t015–5 (13,2%/).

8.4.2. tabula

No 01.09.2006. g.–01.03.2007. g. asinīs izdalīto *S. aureus spa* tipi (n=43).

	<i>spa</i> tipi								
	MSSA	MSSA	MRSA	MSSA	MSSA	MSSA	MSSA	MSSA	MSSA
t084	t435	t425	t015	t331	t693	t1255	t1877	t164	
t091	t435	t425	t015	t331	t693	t1255	t1877	t164	
t189	t435	t425	t015	t331	t693				
t002	t435	t425	t015						
t160	t435	t425	t015						
t2928	t435								
t2934	t435								
<i>spa</i> tipi									
t127	t435								
t267									
t779									
t056									
t2497									
t700									
% daudzums	30,23	18,6	11,63	11,63	6,98	6,98	4,65	4,65	4,65

No visiem analizētajiem MRSA izolātiem, kas bija iesūtīti no trim laboratorijām, tika diagnosticēts viens t425 *spa* komplekss ST 368, kas apstiprināja jau agrāk izteikto pieņēmumu par šī MRSA celma endēmisko izplatību Latvijā. Rezultāti sakrīt ar pētījuma rezultātiem citās Eiropas valstīs, kur *S. aureus* un MRSA celmi izplatās galvenokārt kā ģeogrāfiski noteikti kompleksi ar dažādu izplatības rādiusu. Kā redzams 8.4.3. tabulā, katrā no 17 Eiropas valstīm vairāki izdalītie *S. aureus spa* tipi bija vienādi, noliedzot hipotēzi par nejaušu celmu izplatību reģionā.

Biežāk izdalīto *spa* tipu klasteru raksturojums ES dalībvalstīs

Valsts klastera No.	Valsts	<i>spa</i> tips	<i>spa</i> kom-plekss*	Sekven-ces tips	Laboratoriju skaits, kas ziņoja klastera tipu	Dalības laboratoriju skaits	Laboratorijas, kas ziņoja <i>spa</i> tipa klasteru %	Izolātu skaits	Domājamais izolātu skaits **	MRSA izolātu skaits no kopējā izolātu skaita	MRSA izolātu skaits no kopējā izolātu skaita %
1.	Austrija	t190	190	8	7	18	38.9	11	0,9	10	91
2.	Beļģija	t740	740	45	6	22	27.3	15	1,0	11	73
3.	Beļģija	t038	740	45	8	22	36.4	12	0,8	12	100
4.	Bulgārija	t030	12	239	4	8	50.0	10	0,4	9	90
5.	Horvātija	t041	1	228	7	11	63.6	14	2,2	14	100
6.	Čehija	t003	45	225	16	20	80.0	34	3,8	34	100
7.	Čehija	t130	130	-	3	20	15.0	5	0,4	5	100
8.	Dānija	t230	728	45	7	14	50.0	8	0,7	0	0
9.	Francija	t008	8	8	22	23	95.7	61	13,6	54	89
10.	Francija	t777	777	5	6	23	26.1	9	0,7	8	89
11.	Vācija	t003	45	225	10	27	37.0	24	4,7	23	96
12.	Vācija	t032	32	22	9	27	33.3	29	9,5	29	100
13.	Grieķija	t044	44	80	3	3	100.0	5	0,1	4	8
14.	Ungārija	t062	Singleton	5	2	10	20.0	6	0,3	6	100
15.	Ungārija	t216	Singleton	59	7	10	70.0	7	0,5	7	100
16.	Īrija	t032	32	22	18	22	81.8	38	8,9	38	100
17.	Īrija	t515	32	22	7	22	31.8	8	0,7	8	100
18.	Itālija	t041	1	228	13	19	68.4	23	3,7	23	100
19.	Itālija	t001	1	228	8	19	42.1	9	1,5	9	
20.	Latvija	t435	345	427	4	11	36.4	8	0,2	8	
21.	Latvija	t425	425	368	3	11	27.3	5	0,1	5	100

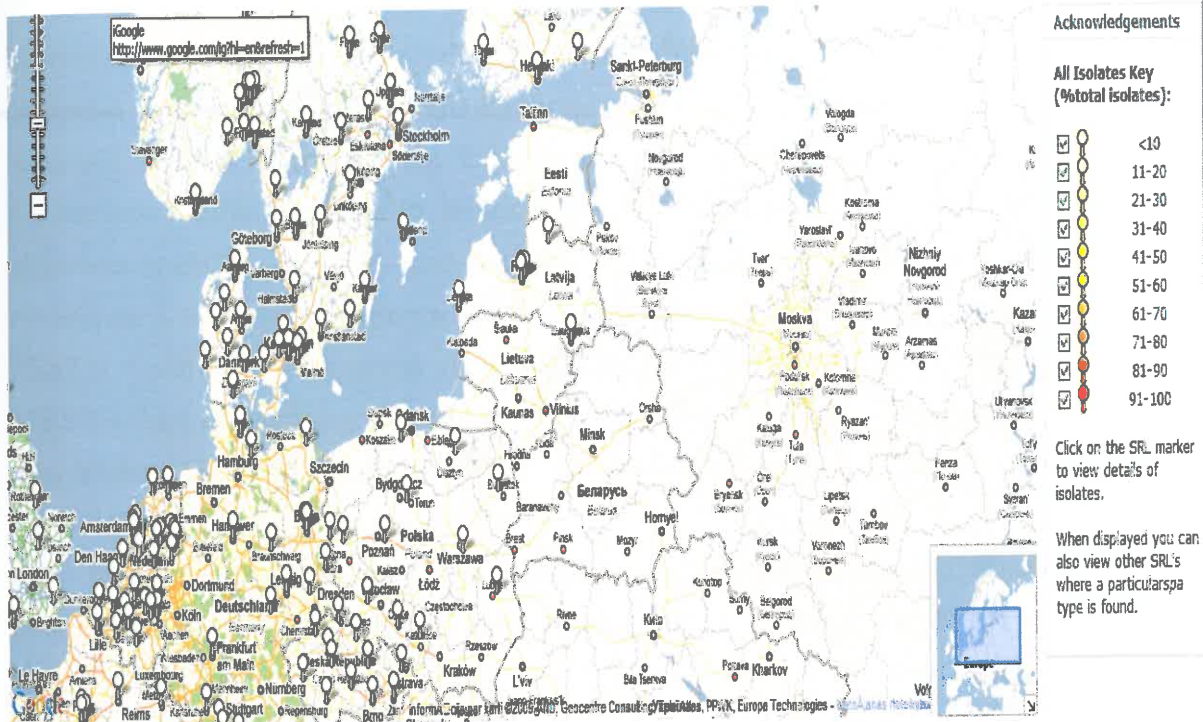
8.4.3. tabulas turpinājums

Valsts klastera No.	Valsts	spa tips	spa kompleks plekss*	Sekven-ces tips	Laborato-riju skaits, kas ziņoja klastera tipu	Dalības laboratoriju skaits	Laboratorijas, kas ziņoja spa tipa klasteru %	Izolātu skaits	Domājamais izolātu skaits **	MRSA izolātu skaits no kopējā izolātu skaita	MRSA izolātu skaits no kopējā izolātu skaita %
22.	Polija	t037	12	239	11	23	47.8	21	2,2	14	100
23.	Polija	t127	127	1	6	23	26.1	17	4,0	17	100
24.	Rumānija	t030	12	239	3	10	30.0	6	0,3	6	67
25.	Spānija	t067	2	5, 125	18	21	85.7	53	4,4	43	100
26.	Spānija	t002	2	5	15	21	71.4	28	10,9	14	100
27.	Lielbritānija	t032	32	22	12	15	80.0	28	6,9	27	81
<b>Kopā</b>					<b>235</b>	-	-	<b>504</b>	<b>83,4</b>	<b>438</b>	<b>96</b>
											<b>87</b>

\* spa kompleksi, kuri iekļauj spa tipus, kuri atšķiras tikai pēc viena indela (inrēcija/delēcija) vai SNP

\*\*vidējais izolātu skaits ar noteiktu spa tipu, kas iegūts, modelējot Eiropas spa tipu izplatību Adaptēts pēc Grundmann H., Aanensen D. M., van den Wijngaard C.C., et al. *Geographic distribution of Staphylococcus aureus causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis* // PLoS Med. 2010;7(1):1-14.

8.4.4. attēlā Eiropas kartē redzami Latvijā biežāk izdalīto *S. aureus* celmu izplatība citās Eiropas valstīs.



LV001 spa Type Summary

[Click to return to European view](#)

No. isolates	spa Type	Pattern	other laboratories (no. isolates elsewhere with same spa Type)	Action
1	t189	r07r23r12r21r17r34	7(7)	<a href="#">click to view on map</a>
1	t1877	r07r23r12r34r12r12r23	3(3)	<a href="#">click to view on map</a>
1	t084	r07r23r12r34r34r12r12r23r02r12r23	71(89)	<a href="#">click to view on map</a>
1	t016	r09r16r02r16r34r13r17r34r16r34	65(82)	<a href="#">click to view on map</a>
1	t002	r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16	93(154)	<a href="#">click to view on map</a>

8.4.4. att. Latvijā izdalīto *S. aureus* spa tipu izplatība Eiropā (n=43)



## 9. DISKUSIJA

2003. gada martā no brūču materiāla PSKUS Centrālajā laboratorijā tika izdalīts *S. aureus* celms S-4105-03, kas bija rezistents pret oksacilīnu, eritromicīnu, gentamicīnu, ciprofloksacīnu un trimetoprim/sulfametoksazolu. Šādas rezistences profila *S. aureus* celmi literatūrā ir aprakstīti kā stafilokoku hromosomā *mecA* – meticilīna rezistences gēnu saturošie MRSA celmi. Tai pat laika periodā, *S. aureus* celmi ar līdzīgu fenotipiskās rezistences profilu tika izdalīti arī citu pacientu materiālos ar šo pacientu nesaistītās slimnīcas nodaļās, un 2003. gada beigās PSKUS kopumā bija reģistrēti 45 meticilīna rezistentie *S. aureus* infekciju gadījumi. Lai pierādītu šo *S. aureus* tipu piederību MRSA, PSKUS Centrālajā laboratorijā tika izstrādātas molekulārās tipēšanas metodes, uzsāka MRSA celmu kolekcijas un datu bāzes veidošana, kā arī izdalīto celmu molekulārā izpēte. Visi pirmreizējie MRSA tika reģistrēti un analizēti slimnīcas infekciju uzraudzības un kontroles nodaļā.

MRSA prevalences rādītāji literatūrā aprakstītajos gadījumos ievērojami variē atkarībā no slimnīcas profila un slimnīcas gultu skaita, valsts ar augstu vai zemu MRSA izplatību un citiem faktoriem. Īpaši svarīga ir MRSA intrahospitālās izplatības kontrole intensīvās terapijas nodaļās kur slimnieku plūsma ir abos virzienos – no nodaļām un uz nodaļām, kas paaugstina iespējamu endēmiska MRSA izplatību slimnīcā (Bouce, 1992). Kaut arī nav pierādīts, ka MRSA celmi ir virulentāki par *S. aureus* celmiem, tomēr domājams, ka daži *S. aureus* celmi salīdzinājumā ar citiem *S. aureus* celmiem var ierosināt stafilokoku infekciju epidēmiju (Shanson 1981, Cookson, Phillips). Kad MRSA endēmiskā uzliesmojuma laikā intrahospitālo MRSA izolātu skaits pārsniedz 10% no visiem intrahospitālajiem *S. aureus*, slimnīcā ievērojami pieaug vankomicīna patēriņš, kā visbiežāk lietotajam antimikrobiālajam preparātam MRSA infekciju gadījumā, kas slimnīcas pacientiem biežāk izpaužās kā kādas smagas pamatsaslimšanas komplikācija. (Pavillard 1982, Walsh et al, 1987, Rao et al, 1988, McManus et al, 1989,).

Kā redzams pēc MRSA% sadalījuma PSKUS 10.1.3. attēlā, lielākais MRSA gadījumu skaits reģistrēts intensīvās terapijas un ķirurģijas nodaļās. Meticilīna rezistentie *S. aureus* biežāk bija sastopami intensīvās terapijas nodaļās arī citās valstīs, izņēmumi bija Francija, Izraēla, Īrija, Portugāle un Malta, kur meticilīna rezistentu *S. aureus* un *S. aureus* celmu proporcionālās attiecības bija līdzīgas. (EARSS Annual Report, 2005, page 46)

Lai arī ir vērojama tendence MRSA gadījumu skaitam samazināties 2004.-2010.g. laika periodā pēc 10.1.1. tabulas rezultātiem, šī tendence nav statistiski ticama jo MRSA izplatību slimnīcā ietekmē daudzi faktori un uzraudzības gadu skaits šajā gadījumā ir nepietiekams. Kā MRSA izplatību ietekmējošie faktori PSKUS jāatzīmē neatliekamās palīdzības pacientu

īpatsvara palielināšanās, personāla izmaiņas, slimnīcas ekonomiskās situācijas izmaiņas pēdējo trīs gadu laikā. Pētījumā nav aptvertas ar MRSA inficēto pacientu pamatdiagnozes analīze, kuriem biežāk šī infekcija raksturojās kā pamatsaslimšņas komplikācija, un citi faktori, kas var ietekmēt MRSA izplatību. Lai pamatotu gadījumu skaita izmaiņas katrā gadā, ir nepieciešama detalizēta katra gadījuma analīze saistībā tādiem mainīgiem lielumiem kā slimnīcas iekšējās struktūras izmaiņām šajā periodā, slimnieku kontingentu raksturojošiem lielumiem, slimnieku skaitu nodaļās, gultu noslogojumu, riska pacientu grupu apsekošanu, medicīnas personāla apmācību sanitārās higiēnas normu ievērošanā pie endēmiskas situācijas nodaļā, slimnīcas ekonomisko situāciju šai periodā, slimnīcas personāla izmaiņas un studentu plūsmas intensitāti augsta MRSA riska nodaļās un citiem faktoriem. Pēc rezultātiem MRSA gadījumu skaitam nav raksturīga sezonālitate un gadījumu skaita svārstības gada mēnešos ir atkarīgas no citiem faktoriem.

Pēc rezultātiem novērojams statistiski ticams MRSA nēsātāju īpatsvara pieaugums no visiem reģistrētajiem MRSA gadījumiem 10.1.2. attēlā, kas, domājams, saistīta ar labāku pacientu skrīningu uz MRSA nēsāšanu, MRSA infekciju atpazīstamību, un agrīnu MRSA laboratorisko diagnostiku. Pretepidēmisko pasākumu kopums MRSA infekcijas gadījumā iespējams ietekmēja arī MRSA īpatsvara samazināšanos no visām *S. aureus* ierosinātajām bakterēmijām (10.1.4. attēls), kuru gadījumos tika nozīmēta laboratoriskā asins paraugu izmeklēšana. Lai arī pacientiem ar ilgstošu temperatūru, klīniski smagām blaknēm, neefektīvu standarta terapiju tiek nozīmēti asins uzņēmumi, tomēr vienotu vadlīniju trūkums asins paraugu noņemšanas indikācijām pie aizdomu gadījumā par bakterēmiju, iespējams, ietekmē pētījuma rezultātus saistībā ar MRSA atradni asins paraugos. Ievērojamais asins paraugu skaits un MRSA atradne asinīs, visticamāk, ir saistīta ar uzsākto Latvijas veselības aprūpes reorganizācijas procesu un atsevišķu slimnīcu slēgšanu, kā rezultātā palielinājās klīniski smagu pacientu īpatsvars 2010. gadā. Tādejādi apstiprinājās izvirzītā hipotēze, ka MRSA infekcijas nav nejauša parādība Latvijas slimnīcās, kā tika domāts sākotnēji, bet šī izsaucēja ierosināto infekciju atpazīšana un uzraudzība ir kļuvušas par vienu no laboratorijas, infekciju kontroles un epidemiologu ikdienas darba uzdevumiem.

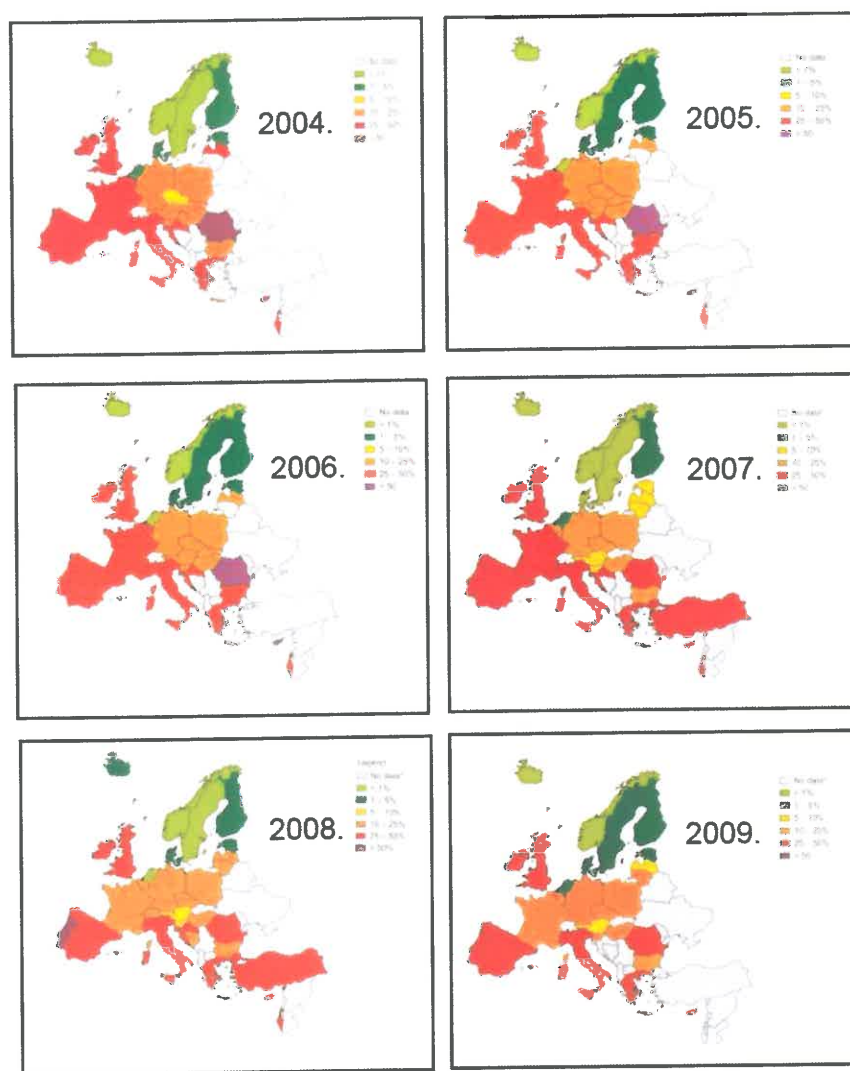
Lai noskaidrotu MRSA izplatību Latvijā salīdzinājumā ar citām Eiropas valstīm, visi *S. aureus*, t.sk. MRSA pozitīvie asins uzņēmumi tika izmeklēti un reģistrēti atbilstoši EARSS Net protokolam un salīdzināti ar citu valstu rezultātiem. Kā obligāts priekšnosacījums bija dalīblaboratoriju iesaistīšanās ikgadējās ārējās kvalitātes kontroles programmās saistībā ar izdalīto mikroorganismu identifikāciju un antibakteriālās jutības noteikšanu lai nodrošinātu iegūto datu ticamību un kvalitāti. 2004. gadā, kad Latvijas slimnīcas un laboratorijas

iesaistījās Eiropas antimikrobiālās uzraudzības tīklā, vidējais MRSA īpatsvars Eiropā no visiem asinīs izdalītajiem *S. aureus* bija 24% ar lielām atšķirībām Eiropas ziemeļu daļas valstīs mazāk par 1%, Centrālajā Eiropā 5–20% un visaugstākajiem rādītājiem Eiropas dienvidu rajona valstīs 30–40%. Pret citiem antimikrobiālajiem preparātiem šai laika periodā salīdzinoši *S. aureus* rezistence bija viszemākā pret rifampicīnu un visaugstākā pret ciprofloksacīnu. 2004. gadā Latvijā MRSA procentuālā attiecība pret visiem izdalītajiem invazīvajiem *S. aureus* izolātiem asinīs bija 26% (23/87) kā redzms 10.2.2.tabulā un ievērojami atšķīrās no citām ziemeļu reģiona valstīm, piemēram, Zviedrijas – <1%, Somijas 3% un kaimiņu valsts Igaunijas – 5%. Iespējams, ka situācija visā valstī šajā laika periodā bija vēl sliktāka, jo antimikrobiālās uzraudzības tīklā bija iesaistītas tikai apmēram puse Latvijas slimnīcu ar to apkalpojošām mikrobioloģijas laboratorijām un dati par aptverto iedzīvotāju populāciju uzskatāmi par neprecīzu rādītāju, kas pamatojās uz anketēšanas rezultātiem. 2005. gadā vidējais invazīvo meticilīna rezistentu *S. aureus* līmenis Eiropā bija zemāks par 25%, ar stabili zemiem rādītājiem Latvijas kaimiņu valstīs – Īslandē – 0%, Norvēģijā – 1%, Zviedrijā – 1% un Igaunijā samazinājās līdz 2%. Latvijā meticilīna rezistentu *S. aureus* īpatsvars samazinājās tikai nedaudz un sastādīja 19% no visiem izdalītajiem 127 *S. aureus* celmiem.

Raksturīgi, ka Latvijā izdalīto invazīvos MRSA fenotipiski raksturoja multirezistence pret makrolīdiem, hinoloniem, tetraciklīniem, daļēji aminoglikozīdiem, sulfametoksazolu/trimetoprim un jutību pret rifampicīnu. 2006.–2007. gadā Eiropā pusei EARSS tīkla dalībvalstu MRSA proporcijas no visiem ziņotajiem invazīvajiem *S. aureus* asinīs bija vairāk par 25% un nemainīgi šāds rezultāts no Centrāleiropas valstīm bija Lielbritānijā un Īrijā. Ziemeļvalstu un Igaunijas meticilīna rezistentu *S. aureus* proporcionālais līmenis bija salīdzinoši nemainīgs un 2006. gadā arī Lietuvā meticilīna rezistentu *S. aureus* proporcija no visiem ziņotajiem invazīvajiem *S. aureus* asinīs bija ievērojami zemāka un sastādīja 12%, salīdzinot ar Latviju.

Iespējams, ka šie rezultāti nav objektīvi, jo tikai Latvijā no trijām Baltijas valstīm, šai periodā bija pieejamas molekulārās izmeklēšanas metodes MRSA izolātu apstiprināšanai. Kopumā var teikt, ka dažādās Eiropas valstīs laika periodā no 1999. līdz 2009. gadam meticilīna rezistentā *S. aureus* īpatsvars procentuāli svārstījās no mazāk kā 1% līdz vairāk kā 50% no visiem izdalītajiem invazīvajiem *S. aureus* izolātiem asinīs. Nemainīgi Eiropas dienvidu reģiona valstīs šie rezultāti bija augstāki. No 2007. gada 31. jūlija Valsts aģentūra „Sabiedrības veselības aģentūra” ar rīkojumu nr. 41. pieņēma „Labas sabiedrības veselības prakses vadlīnijas rīcībai meticilīnrezistentā *Staphylococcus aureus* (MRSA) apstipri-

nāšanas gadījumā stacionārās ārstniecības iestādēs". Domājams, ka pasākumi MRSA izplatības ierobežošanai bija veiksmīgi un daļēji izskaidro perioda efektu, kad Latvijā 2006. – 2007. gadā MRSA gadījuma skaits samazinājās līdz 7,5% no kopējo *S.aureus* skaita asinīs. Detalizēti analizējot 2008. gada antimikrobiālās rezistences uzraudzības tīkla darba rezultātus Latvijā, redzams, ka procentuālais MRSA izolātu skaita pieaugums, salīdzinot ar visiem no asinīm izdalīto *S. aureus* izolātiem laboratorijās, ir saistīts ar vienu no slimnīcām, kur, iespējams, MRSA ir endēmisks vienā nodaļā un sastāda vairāk nekā 94% no visiem no asinīm izdalītajiem *S. aureus* (15 no 16 *S. aureus* izolātiem) kā redzams 10.2.2.attēlā. Kopumā laikā no 2004. līdz 2009. gadam Latvijā līdzīgi kā Slovākijā un atšķirībā no pārējām EARSS Net tīklā iekļautajām Eiropas valstīm saglabājās tendence no asinīm izdalīto MRSA izolātu skaitam samazināties (Kock et al, 2010). Uzskatāmi MRSA situācijas izmaiņas 2004.–2010. gadā parādītas 9.1. attēlā.



9.1.att. MRSA procentuālais daudzums Eiropā un samazināšanās tendences Latvijā (EARSS 2004.–2009.g.).

Literatūrā aprakstītie sadzīvē iegūtie MRSA celmi, kurus fenotipiski raksturo jutība pret lielāko daļu antimikrobiālo vielu (*Herold et al*, 1998) asinīs laika periodā no 2004. līdz 2009. gadam Latvijas EARSS dalīblaboratorijās netika izdalīti. Iespējams, ka tas ir saistīts ar nelielo invazīvo sadzīvē iegūto MRSA infekciju izplatību Latvijā vai iespēju šādus celmus nediagnosticēt, jo oksacilīna rezistence šiem celmiem nereti ir uz jutības robežas, kā arī to, ka sadzīvē iegūtās MRSA infekcijas biežāk izpaužas kā ādas un mīksto audu slimības, ko ārstē ambulatoriski.

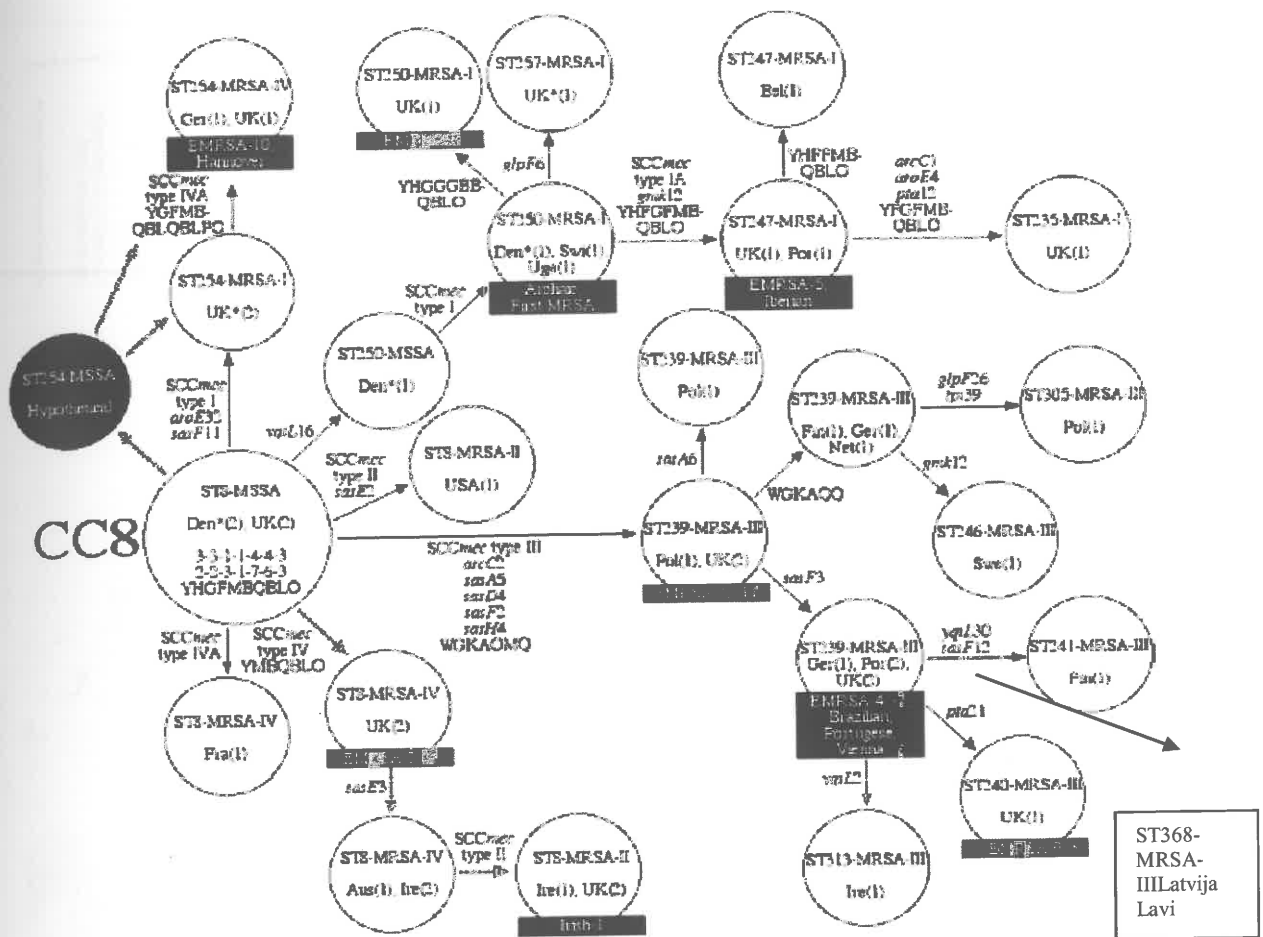
Pēc fenotipiskajām īpašībām nebija iespējams noteikt dažādo MRSA celmu izplatību Latvijā, jo visiem MRSA celmiem bija raksturīga multirezistentce. Tādēļ no dažādiem patoloģiskajiem materiāliem tika izvēlēti 2004.–2010. gadā izdalītie MRSA celmi no PSKUS Centrālās laboratorijas kolekcijas padziļinātai fenotipiskai izvērtēšanai, pamatojoties uz dažādu ikdienas praksē lietotu antibiotiku minimālās inhibējošās koncentrācijas noteikšanu ar VITEK 2 analizatoru. Pēc iegūtajiem rezultātiem, domājams, ka visi izdalītie MRSA izolāti ir līdzīgi un ir izplatījušies viens vai vairāki HI- MRSA celmi. Otru skaita ziņā salīdzinoši mazāku grupu veidoja PSKUS Centrālās laboratorijas datu bāzē esošie *S. aureus* izolāti, kuru antibiotikogrammu rezultāti ievērojami atšķīrās un pārsvarā bija jutīgi pret visām ikdienas praksē lietotajām antibiotikām. Arī oksacilīna rezistence pēc minimālās inhibējošās koncentrācijas šiem izolātiem svārstījās uz rezistences robežas.

Nemot vērā, ka *S. aureus* kā oportūniskais patogēns ierosina plaša spektra sadzīvē un ārstniecības iestādēs iegūtās infekcijas, MRSA celmu molekulārā izpēte bija pētījuma izpētes procesa nozīmīga sastāvdaļa. *S. aureus* izolātiem ir raksturīga iegūto virulences un rezistences gēnu klonāla ģenētiskā izcelsme, jo *S. aureus* šos virulences un rezistences gēnus iegūst horizontālās DNS pārnesšanas ceļā (*Enright et al*, 2002), tādēļ ar ģenētiskās tipēšanas metodēm iespējams atrast dažādu MRSA celmu klonus ar specifiskām virulences un rezistences determinantēm (*Feil et al*; 2003). Daudzie hromosomālie *S. aureus* ģenētiskie marķieri dod plašu atbilstošu *S. aureus* celmu klasifikāciju klonālos kompleksos (*Enright*, 2000). Katram MRSA celmam ir raksturīgi divi ģenētiskie marķieri – SCCmec tips un klonālā kasete. Pamatojoties uz identificēto *S. aureus* klonu dažādību vai pretēji viendabīgumu, iespējama samērā precīza sabiedrības veselībai nozīmīgu celmu izplatīšanās kontrole, piemēram, sadzīvē un ārstniecības iestādēs iegūtā MRSA, tā evolūcijas un epidemioloģijas uzraudzība.

Pamatojoties uz klīnisko informāciju un laboratoriju datiem Dānijā, 2001. gadā tika veikta detalizēta 81 MRSA celmu epidemioloģiskā un molekulārā izpēte. MRSA tika raksturoti un tipēti, izmantojot pulsējošā lauka elektroforēzi (PFGE), *spa* tipēšanu,

multilokusa sekvenču un SCC*mec* tipēšanu. Salīdzinot 45 sadzīvē iegūtās MRSA izraisītās infekcijas un 36 ar ārstniecības iestādēm saistītās MRSA izraisītās infekcijas, tika novērotas vairākas būtiskas atšķirības. Sadzīvē iegūto MRSA izdalīja galvenokārt no ādas un zemādas infekcijām. Šiem celmiem bija raksturīgs *Panton-Valentine leucocidin* toksīns un lielākā daļa no tiem (84%) piederēja vienam klonālajam ST80- MRSA tipam, kas reti bija sastopams intrahospitālajiem MRSA celmiem. Intrahospitālos MRSA celmus raksturoja liela klonālā dažādība, ieskaitot dažus pandēmiskos klonus. Domājams, ka nelielais intrahospitālo infekciju skaits un lielā izdalīto klonu dažādība varētu būt infekciju kontroles pasākumu rezultāts, kas ierobežoja MRSA izplatību Dānijas slimnīcās. ST80-MRSA klona izplatības mehānisms sadzīvē nebija zināms (*Faria et al*, 2005).

Pārbaudīt visus PSKUS kolekcijā esošos izolātus ar ģenētiskās tipēšanas metodēm ierobežoto materiālo resursu dēļ nebija iespējams, tādēļ izpētei tika izvēlēti atsevišķi 2004.–2010. gadā izdalītie MRSA celmi no PSKUS Centrālās laboratorijas izolātu kolekcijas. Pēc SCC *mecA* kasetes tipa, ST un *spa* tipa visi MRSA izolāti laikā no 2003. līdz 2010. gadam bija ģenētiski vienādi – ST368-MRSA-III, izņemot pirmo S-4105 MRSA celmu. MLST analīze liecināja, ka Latvijas slimniekiem izdalītais ST368-MRSA-III pieder klonālajam kompleksam CC8. Tā ģenētiski tuvākais celms ir ST239-MRSA-III, kas ir plaši izplatīts Lielbritānijā Vācijā un Polijā. Latvijas izolāta vieta hipotētiskā evolūcijas modelī CC8 kompleksā ir parādīta 9.2. attēlā.



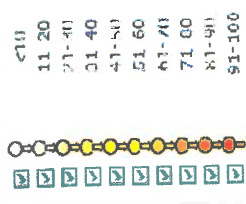
9.2.att. SCC III tipa kasetes hipotētiskais izcelsmes modelis

Bez tam PSKUS Centālajā laboratorijā no 2003. gada tika veikta slimnīcā izdalīto un no citām slimnīcām apstiprināšanai un padziļinātai izpētei atsūtīto MRSA izolātu izpēte, kā tipēšanas metodi lietojot visu pētīto izolātu *spa* tipa noteikšanu un iegūto rezultātu ievadi centrālā *Rindom SpaServer* serverī ([www.spaserver.rindomde](http://www.spaserver.rindomde)) centralizētai datu apstrādei (8. pielikums).

Kā redzams pēc pētījuma rezultātiem Eiropas savienības dalībības valstīs MRSA kloni izplatās galvenokārt kā ģeogrāfiski noteikti kompleksi, kuru izplatības rādiuss ir dažāds. Hipotētiski var pieņemt, ka Latvijā sastopamie *S. aureus* celmi ir izplatījušies no tuvējām Eiropas valstīm: Polijas, Vācijas, Horvātijas, kur sastopami Latvijai raksturīgie *spa* kompleksi, lai gan dominējošie tipi šajās valstīs ir citi – (<http://www.spatialepidemiology.net/SRL-Maps>).

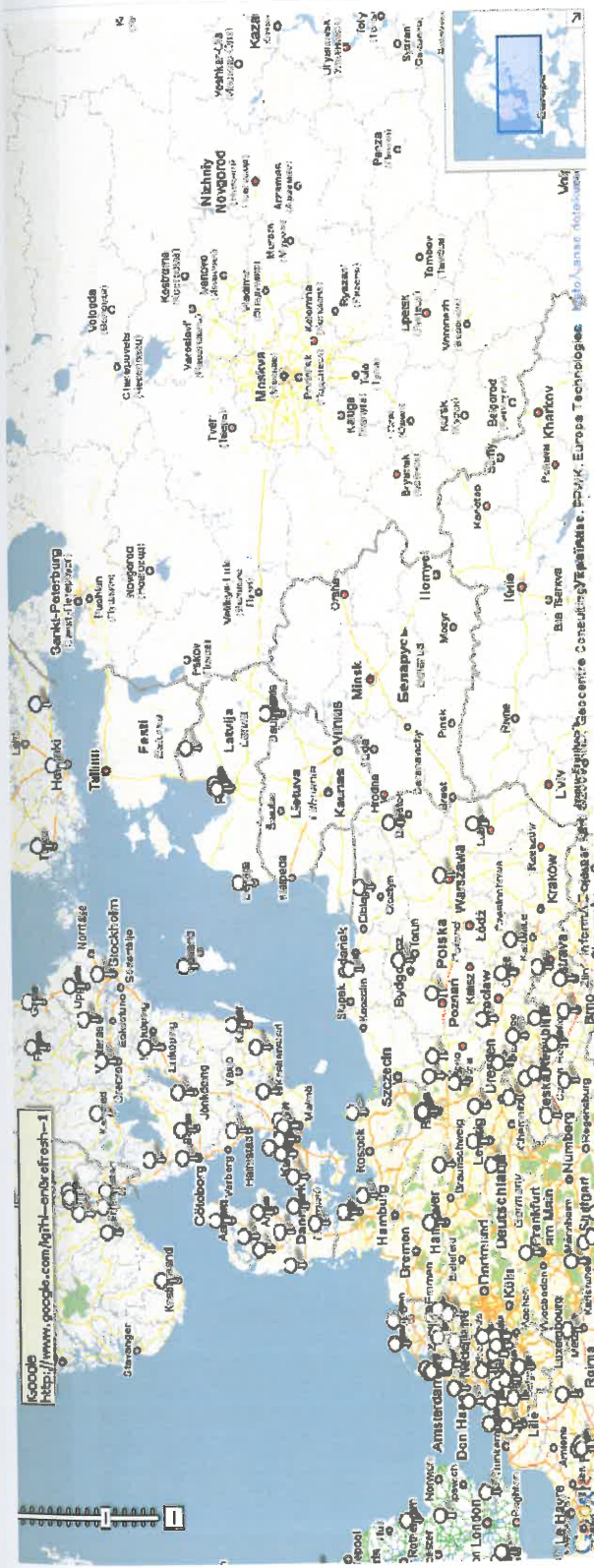
**Acknowledgements**

**All Isolates Key (%total isolates):**



Click on the SRL marker to view details of isolates.

When displayed you can also view other SRL's where a particular spa type is found.



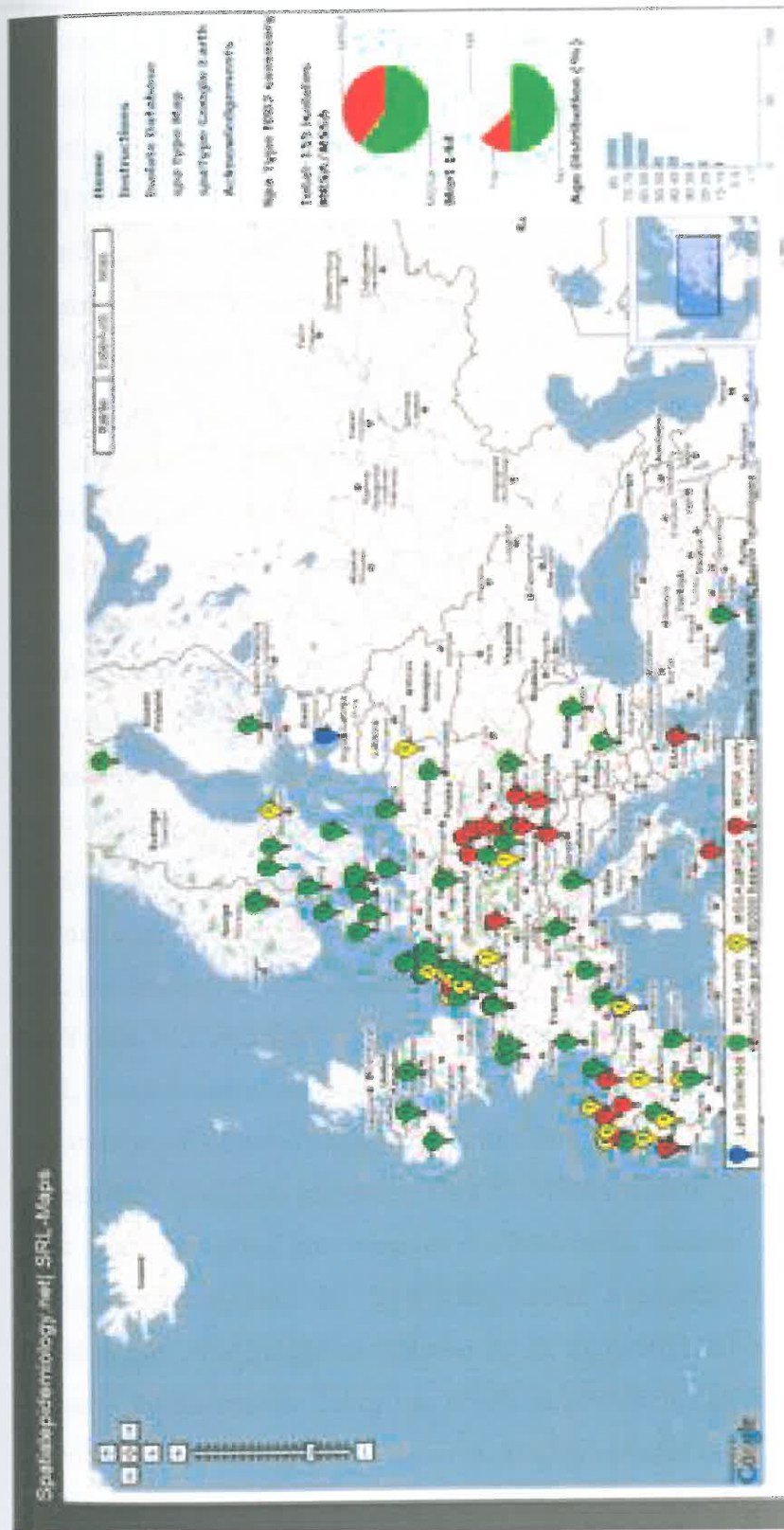
Click to return to European view.

LVO01 spa type Summary

No. isolates	spa Type	Pattern	other laboratories (no. isolates elsewhere with same spa Type)	Action
1	t189	+0723r12c34t17c4	7(7)	click to view on map
1	t1077	+0723r12c34t12c123	3(3)	click to view on map
1	t084	+0723r12c34t12c123c02t12c23	71(83)	click to view on map
1	t015	+05r16c07r16c24t13r17c4r16c34	85(97)	click to view on map
1	t002	+26r23r17c04r17c20r17c12r17c16	93(154)	click to view on map

9.3. att. Latvijā un citās Eiropas valstīs sastopamie *S. aureus* spa tipi.





9.4. att. 002 *S. aureus spa* tipa izplatība Latvijā un Eiropā

Zilā krāsā - Latvijā izdalītais t002 *S. aureus* klons. Zālā krāsā – citas t002i klona izplatības ģeogrāfiskās vietas *S. aureus* celms  
 Sarkanā krāsā – t002 klona izplatība meticilīna rezistentajos *S. aureus* celmos.

Šādu meticilīna rezistentā *S. aureus* celma klonālu izplatīšanos var raksturot ar Latvijā izdalītā un citās Eiropas valstīs sastopamā *S. aureus spa* tipa t002, kas sastopams gan *S. aureus*, gan MRSA celmos un šī izplatība ir parādīta 9.4. attēlā.

Kopumā šī pētījuma ietvaros 86,9% no izdalītajiem *S. aureus* izolātiem bija meticilīna rezistenti. Desmit Eiropas valstīs situāciju raksturoja divi biežāk sastopamie *spa* tipi. Četrās no tām divi *spa* tipi bija ģenētiski līdzīgi un piederēja vai nu tam pašam *spa* kompleksam, vai atšķīrās ar vienu ģenētiskās determinantes variāciju. Piemēram, Čehijā un Vācijā bija izplatīts *spa* tipa t003(t003/ST225/SCCmecII), Bulgārijā un Rumānijā – t030 (t030/ST239/CSSmecIII), Itālijā un Horvātijā – t041(t041/ST228, SCCmecI). Pēc *spa* tipa izplatības Eiropas kartē un *spa* datu bāzes redzams, ka Latvijā ir sastopams viens endēmiskais MRSA celms – t425, bet no visiem izmeklētajiem izolātiem ir divi dominējošie MRSA kompleksi – t435 – (21,2%) un t015–(97,9%) un nav sastopams *S. aureus* celms, līdzīgi citiem pētījumā iesaistīto valstu rezultātiem, kur izdalīto MRSA un *S. aureus* celmu *spa* atkārtojumu kompleksi bija vidēji divi biežāk sastopamie kompleksi valstī ar atsevišķiem izņēmumiem, kas raksturo endēmisku MRSA celmu izplatību katrā valstī/reģionā (*Grundmann et al*, 2010).

Vispirms izplatījies slimnīcās visā pasaulē MRSA pašlaik jau kļuvis arī par nozīmīgu sadzīvē iegūstamu patogēnu. 1993. gadā Austrālijā identificēja pirmos MRSA celmus, kas tika izdalīti no slimniekiem, kuri iepriekš nebija atradušies ārstniecības iestādē. Kā parādīja turpmākā izpēte, šie celmi ievērojami atšķīrās no līdz šim zināmajiem intrahospitālajiem MRSA celmiem (*Udo, Grubb*, 1993). Pazīmes, kas atšķir hospitālos MRSA celmus no sadzīvē iegūstamajiem, ir hospitālo riska faktoru neesamība, jutība pret lielāko daļu antimikrobiālo vielu, izņemot beta laktāmus (*Herold et al*, 1998), atšķirīgs hromosomālais fons, kas nesakrīt ar biežāk atrasto hospitālo celmu genotipiem (*Vandenesch et al*, 2003), IV vai V tipa SCCmec kasete, kas reti sastopama intrahospitālajiem celmiem (*Okuma et al*, 2002, *Vandenesch et al*, 2003, *Ito et al*, 2004), kā arī gēni, kas kodē Pantona – Valentīna leukocidīnu – PVL toksīnu (*Dufour et al*, 2002). Visas šīs pazīmes var veiksmīgi analizēt ar molekulārās bioloģijas metodēm. Otra SI-MRSA izolātu īpatnība ir arī tā, ka nereti tie aug ātrāk par hospitālajiem celmiem. Salīdzinoši lielais augšanas ātrums varbūt ir priekšnosacījums tam, lai SI-MRSA varētu veiksmīgi kolonizēt cilvēka organismu, izkonkurējot citas baktērijas (*Okuma K. Et al.*, 2002). SI-MRSA celmi var rasties divos veidos – intrahospitālie celmi var nonākt ārpus slimnīcas, kur tie izplatās no indivīda uz indivīdu, bet tie var rasties arī *de novo*, MRSA celmam iegūstot meticilīna rezistences gēnu kompleksu. *S. aureus* celmi, ieskaitot arī MRSA, var kolonizēt saimnieka organismu ilgu

laiku pirms infekcijas izraisīšanas. HI-MRSA kolonizācija parasti netiek diagnosticēta un var izraisīt infekciju pat vairākus mēnešus pēc slimnieka izrakstīšanas no slimnīcas, kad viņš jau atrodas sabiedrībā, tādēļ ir grūti noteikt to MRSA celmu rašanos, kas sadzīvē izraisījuši MRSA infekcijas.

Literatūrā dažādu autoru definējums SI-MRSA celmiem atšķiras, piemēram, sadzīvē iegūta izolāta definējums parasti pamatojas uz MRSA izolācijas laika attiecību pret hospitalizācijas laiku. Rezultātā lielākā daļa sadzīvē iegūto MRSA gadījumu ir saistīti ar nesenu tiešu vai netiešu saistību ar ārstniecības iestādi, piemēram, nesenu hospitalizāciju, mediķa mājas vizīti, klīnikas apmeklējumu, antibiotiku terapiju, hroniskām slimībām vai ciešu kontaktu ar šiem riska faktoriem pakļautu personu. Tas viss liecina, ka šīs infekcijas ir saistītas ar HI-MRSA, kas ir nonākuši ārpus slimnīcas. Šādā veidā tipa sadzīvē iegūtie MRSA celmi parasti ir multirezistenti.

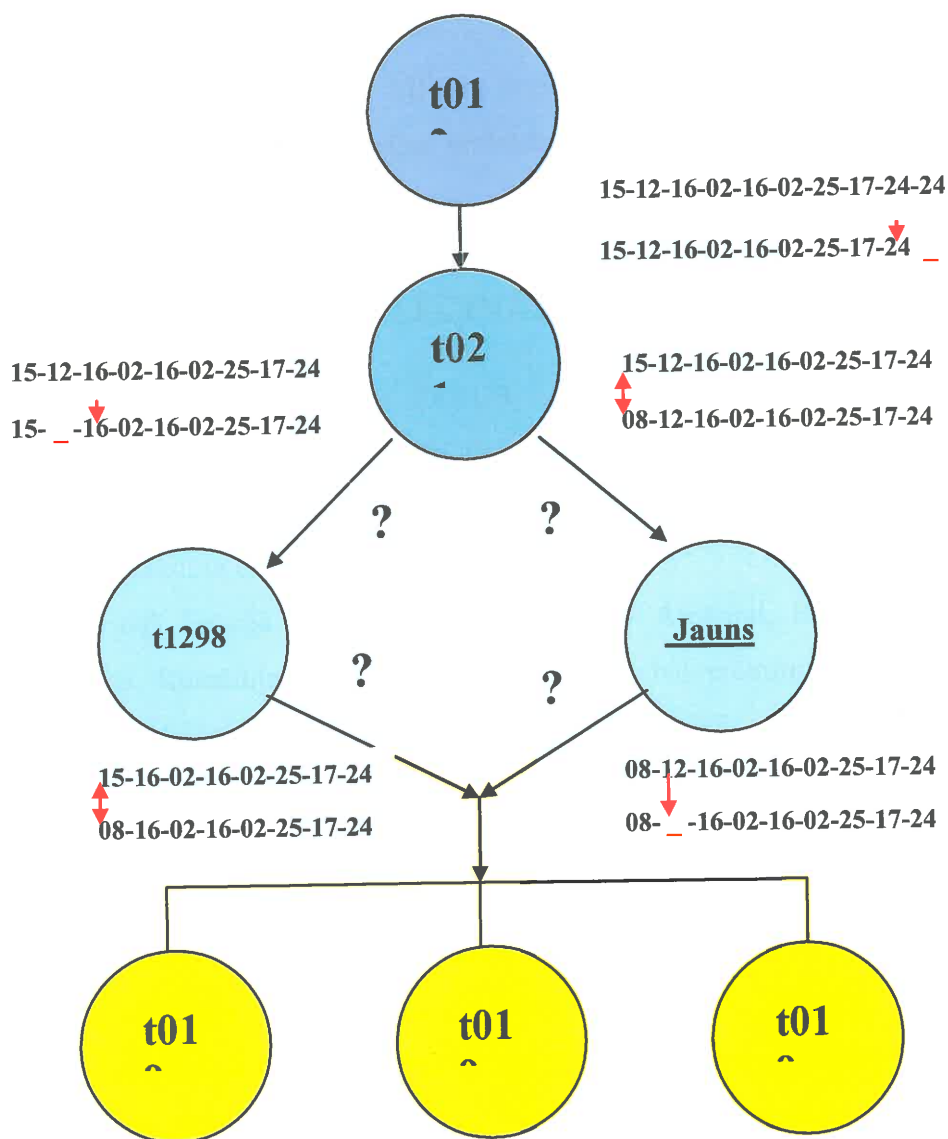
Otra veida SI-MRSA celmi, kas tiek izolēti no pacientiem, kuriem nav bijusi saskarsme ar ārstniecības iestādēm vai to darbiniekiem, biežāk ir jutīgi pret antibiotikām, izņemot beta laktāma antibiotikas. Ja pirmie SI-MRSA celmi tika izolēti seksuālo minoritāšu un nelabvēlīgo sabiedrības slāņu indivīdiem, tad vēlāk tie tika izolēti jau arī no labklājīgas vides, skolniekiem, sportistu grupām, jauniesauktajiem un citiem noslēgtiem kolektīviem (*Charlebois et al, 2004*).

Pēdējā laikā PVL ir izraisījis lielu interesi, ņemot vērā tā saistību ar bērnu un jaunu cilvēku saslimšanu, nenonākot kontaktā ar ārstniecības iestādēm. ASV ir konstatēti ādas infekciju uzliesmojumi homoseksuāliem cilvēkiem, ieslodzītajiem un arī skolniekiem. Līdzīgi ziņojumi ir saņemti par ar PVL saistītām ādas infekcijām geju sabiedrībās Nīderlandē (*Wannet, 2003*), skolniekiem Šveicē (*Boubaker et al, 2004*) un veselības aprūpes personālam Skotijā (*Scottish Centre for Infection and Environmental Health, 2002*). Satraucošs ir fakts, ka pieaug tādu gadījumu skaits, kad PVL pozitīvie celmi ir saistīti ar sadzīvē iegūtu nekrotisku pneimoniju. PVL producējošo *S. aureus* saistību ar sadzīvē iegūto pneimoniju pirmo reizi aprakstīja *Lina*, kas izstrādāja arī PQR PVL gēnu noteikšanai (*Lina et al, 1999*) un, apstiprinot iepriekšējos pētījumus, kas veikti ar dubulto imūndifūzijas metodi, pierādīja, ka PVL gēni ir ļoti cieši saistīti ar primārajām ādas infekcijām, īpaši, furunkulozi (*Holmes et al, 2005*). PVL gēnus visā pasaulē izmanto par marķieri sadzīvē iegūto MRSA celmu identificēšanai.

Latvijā pirmais PVL pozitīvais SI-MRSA celms tika izolēts drīz pēc pirmajiem atklātajiem HI-MRSA celmiem 2003. gada sākumā. PVL pozitīvā ST30-MRSA-IV celma izolēšana Latvijā bija svarīgs atklājums un apstiprināja hipotēzi par SI-MRSA izplatību

sabiedrībā Pēc gēnu sekvencu rezultātiem, izdalītie SI-MRSA bija piederīgi diviem dažādiem sekvenču tipiem: ST30 un ST1.

Analizējot piecu izdalīto SI-MRSA ST30 celmu *spa* gēna variablu atkārtojumu reģionu sekvenses, tika noskaidrots, ka šiem celmiem ir dažādi *spa* tipi. Ņemot vērā nelielo SI-MRSA izolātu skaitu, bija iespējams izveidot tikai hipotētisku modeli par *spa* tipa t021 izveidošanos no t012, un tai sekojošu t019 izveidošanos no t021.



9.5. att. Meticilīnrezistentu *S. aureus spa* tipu pārveidošanās hipotētiskais modelis (Zilā krāsā atzīmēti hipotētiskie celmi, kas praksē netika izdalīti.)

MRSA ir viens no galvenajiem nozokomiālo infekciju izraisītājiem daudzās attīstītās pasaules valstīs (Lowy, *J. Clin. Invest.*, 2003, 111:1265–1273). Īpašam riskam ir pakļauti gados vecāki cilvēki, ķirurģisko un intensīvas terapijas nodaļu pacienti. *S. aureus* citu patogēnu vidū izceļas ar tam piemītošu virulenci, spēju izraisīt virkni dažādu dzīvībai bīstamu infekciju un ātri pielāgoties apkārtējās vides izmaiņām. Sevišķi jāuzsver *S. aureus* celmu rezistence pret daudzām antibiotikām, kas apgrūtina un sadārdzina terapiju. Pēdējos gados MRSA ir parādījies arī Latvijā. Lai arī ir nepieciešama turpmāka MRSA infekciju molekulāri epidemioloģiskas informācijas analīze, veiktais pētījums ir devis pierādījumus MRSA izplatībai Latvijā un norādījis virzienus zinātniski pamatotai MRSA infekciju kontroles un epidemioloģijas izpētei MRSA infekciju gadījumos, kā arī ir izstrādātas metodes izdalīto MRSA klonālās piederības noteikšanai.

## 10. SECINĀJUMI

1. Kopējais MRSA gadījumu skaits PSKUS no 2004.–2010. gadā ir bez būtiskām izmaiņām. Pētījuma periodā statistiski ticami pieauga no jauna identificēto MRSA nēsātāju skaits un samazinājās MRSA bakterēmiju īpatsvars, kas norāda uz MRSA uzraudzības pasākumu efektivitāti.
2. Pētījuma periodā Latvijā, līdzīgi Eiropas valstīm – Austrijai, Bulgārijai, Francijai, Grieķijai, Īrijai, Rumānijai un Lielbritānijai, MRSA bakterēmiju īpatsvars no visām *S.aureus* ierosinātajām bakterēmijām konsekventi samazinājās no 26,6% (2004. g.) līdz 9% (2009. g.).
3. Latvijā ir endēmiski izplatīts viens HI – MRSA celms - ST368-MRSA-III, kas pieder *t425 spa* tipam. Bez tam Latvijā ir konstatēti divi SI-MRSA celmi: ST30-MRSA-IV un ST1-MRSA-IV, bet to izplatība nav zināma.
4. ST368-MRSA-III nav sastopams kā intrahospitālo infekciju izsaucējs citās Eiropas valstīs, kas apstiprina šī celma endēmisko izplatību Latvijā, bet ir zināmi MSSA celmi, kuri pieder šim sekvenču tipam. ST30-MRSA-IV un ST1-MRSA-IV ir identiski Eiropā sastopamajiem SI – MRSA celmiem.

## 11. PUBLIKĀCIJU SARAKSTS PAR DARBĀ IZVĒLĒTO TĒMU

1. Dumpis U, Balode A, Vigante D, Narbutė I, Valinteliene R, Pirags V, Martinsons A, Vingre I. Prevalence of nosocomial infections in two Latvian hospitals. *Eurosurveillance Monthly*, 2003, 8, 3.

2. Miklaševičs E., Hæggman S., Balode A., Sanchez B., Martinsons A., Olsson-Liljequist O., Dumpis U. Report on the first PVL-positive community acquired MRSA strain in Latvia. *Eurosurveillance Monthly*, 2004, 9, 5-6.

3. Balode A., Dumpis U., Bagrađe L., Djundika T., Ivuškāne S., Rudzīte D., Martinsons A., Miklaševičs E. Identification of SCCmec type in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Latvian hospitals. *RSU Zinātniskie raksti 2004. Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija*. 2005, 58-60.

4. Kise L., Nimroda L., Balode A., Martinsons A. Community acquired bacterial upper respiratory tract infections antibacterial therapy. *Acta Chirurgica Latviensis*, 2006, 6, 78 – 81.

5. Čupāne L., Pugačova Ņ., Selga I., Balode A., Gardovska D., Miklaševičs E. Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas MRSA izolātu klīniskais un molekulārais raksturojums. *RSU Zinātniskie raksti 2007. Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija*. 2008, 219-223.

6. van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H, Ferech M; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 1722-1730.

7. Dumpis U., Aldiņš P., Balode A., Baumanis V., Bērziņa D., Čonka M., Dimiņa E., Gaile I., Grunskis A., Jansone I., Melbārde-Kelme A., Miklaševičs E., Prokopoviča I., Šķenders G., Zole E. Nozīmīgāko multirezistento baktēriju epidemioloģija un molekulārais raksturojums Latvijā. Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošās slimības. Zinātniskā analīze un galvenās rekomendācijas (red. V. Pīrāgs), VSIA Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Rīga, 2009, 161 – 170.

8. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW; European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010 Jan 12;7(1):e1000215.

9. Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gur D, Jarlier V, Kahlmeter G, Monen J, Monnet D, Rossolini G, Suetens C, Weist K, Heuer O; the EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveill.* 2011 Mar 17;16(11).

## 12. PUBLICĒTĀS TĒZES UN ZIŅOJUMI KONFERENCĒS

1. Miklasevics E., Balode A., Dumpis U., Martinsons A. Initial molecular characterization of the first MRSA outbreak at P. Stradins Clinical University Hospital. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2004, **10**, Suppl. 3, 130.
2. Kockina E., Miklasevics E., Balode A., Dumpis U. Clinical and epidemiological characteristics of first cases of MRSA infection in a Latvian university hospital. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2004, **10**, Suppl. 3, 575.
3. Miklaševičs E., Dumpis U., Balode A. MRSA molekulārā epidemioloģija Latvijā. Latvijas Universitātes 62. zinātniskā konference. Dabas zinātnes. Medicīna. Referātu tēzes. 2004, 37.
4. Balode A., Dumpis U., Olsson-Liljequist B., Bagrade L., Djundika T., Ivuskane S., Rudzite D., Miklasevics E. Molecular characterization of methicillin resistant *S. aureus* isolates reveals the first community acquired strain in Latvia. 6th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Strategies for Prevention and Treatment of Infectious Diseases", Palanga, Lithuania. Abstract book, 2004, p. 93.
5. Kockina E., Balode A., Miklasevics E., Dumpis U. Clinical and epidemiological features of MRSA outbreaks in Latvian University hospital. 6th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Strategies for Prevention and Treatment of Infectious Diseases", Palanga, Lithuania. Abstract book, 2004, p. 101.
6. Cupane L., Pugacova N., Bagrade L., Drukalska L., Balode A., Dumpis U., Martinsons A., Miklasevics E. Molecular characterization of MRSA outbreaks in a Children's University Hospital. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2005, **11**, Suppl. 2, 679.
7. Balode A., Cupane L., Dumpis U., Kannina I., Rudzite D., Martinsons A., Miklasevics E. Clonal spread of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latvia. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2006.
8. A. Balode, L. Cupane, U. Dumpis, I. Kannina, L. Kluga, D. Rudzite, A. Martinsons, E. Miklasevics. Genetic diversity of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latvia. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Maastricht, 2006.
9. L. Čupāne, M. Piņķe, U. Dumpis, K. Aksenoka, A. Balode, E. Miklasevics. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* among personal of Latvian military unit in Iraq. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Challenges and New Opportunities", Riga, Latvia. Abstract book, 2006, p. 41.
10. Pujate E., Kvista E., Miklaševičs E., Grāve I., Balode A., Dumpis U. Analysis of epidemiological situation of MRSA infections in large multidisciplinary teaching hospital. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Challenges and New Opportunities", Riga, Latvia. Abstract book, 2006, p. 40.
11. Balode A., Rudzīte D., Ivuškāne S. Resistance of Gram-negative bacteria in ICU of Riga hospitals. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Challenges and New Opportunities", Riga, Latvia. Abstract book, 2006, p. 41.

12. Balode A. Antibiotic resistance surveillance network in Latvia. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Challenges and New Opportunities", Riga, Latvia. Abstract book, 2006, p. 42.
13. Berzina D., Frave I., Balode A. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* at Pauls Stradins Clinical University Hospital. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious diseases "Current Challenges and New Opportunities", Riga, Latvia. Abstract book, 2006, p. 43.
14. Pujate E., Balode A., Oss P., Dumpis U. Association between antibiotic use and incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in general intensive care unit. . 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2007.
15. M. Piņķe, L. Čupāne, A. Balode, E. Pujate, U. Dumpis, K. Aksenoka, E. Miklaševičs. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* among soldiers in Latvian contingent in Iraq. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infection* 2007, S342 – S343.
16. Čupāne L., Pujate E., Balode A., Gardovska D., Miklaševičs E., Dumpis U. Jaundzimušo ādas infekcijas izraisītāja molekulārā analīze. 2007. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2007, 146.
17. Balode A., Grāve I., Piņķe M. Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Centrālās laboratorijas Mikrobioloģijas un seroloģijas nodaļā veikta asins uzņēmumu analīze par 2003. – 2006. gadu. 2007. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2007.
18. Piņķe M., Čupāne L., Pujate E., Balode A., Dumpis U., Aksenoka K., Miklaševičs E. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* among soldiers of Latvian contingent in Iraq, Kosovo and Alūksne. 2007. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2007, 153.
19. Čupāne L., Dzirniece A., Drukaļska L., Pugačova Ņ., Balode A., Nora Z., Gardovska D., Miklaševičs E. Pirmais sadzīvē iegūtā MRSA uzliesmojums Latvijā ārpus stacionāra. 2008. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2008, 127.
20. Čupāne L., Pugačova Ņ., Drukaļska L., Selga I., Balode A., Gardovska D., Miklaševičs E. Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas *S. aureus* izolātu klīniskais un molekulārais raksturojums. 2008. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2008, 128.
21. Čupāne L., Dzirniece A., Pugačova Ņ., Balode A., Nora Z., Gardovska D., Miklaševičs E. Sadzīvē iegūtā meticilīnrezistentā *S. aureus* nēsāšana bērniem ārpus stacionāra – bērnu aprūpes centrā. 2009. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2009, 146.
22. Cupane L., Pugacova N., Drukalska L., Selga I., Balode A., Gardovska D., Miklasevics E. Spread of PVL positive *S. aureus* among patients at Children clinical university hospital. 27th Annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 2009



### 13. Literatūras saraksts

1. Albelda S. M., Smith C. W., Ward P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury // *FASEB J*; 1994; 8–504.
2. Appelbaum P. C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin Microbiol Infect*, 2006.
3. Avison M. B., Bennett P. M., Howe R. A., Walsh T. R. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. // *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49(2): 255–60.
4. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA // *Lancet*, 2002; 359: 1819–1827.
5. Baddour L. M., Taydi M.M., Walker E., et al. Virulence of coagulase-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis // *J Med Microbiol*, 1994; 41: 259–263.
6. Bahrain M., Vasiliades M., Wolff M., et al. Five cases of bacterial endocarditis after furunculosis and the ongoing saga of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // *Scand J Infect Dis*, 2006; 38(8): 702–707.
7. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci // *J Clin Pathol*, 1961; 14: 385–393.
8. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M., Infection by penicillin-resistant *Staphylococci* // *Lancet*, 1948; 2(6530): 641–644.
9. Benito N., Miró J. M., de Lazzari E., et al. Health care-associated native valve endocarditis: importance of non-nosocomial acquisition // *Ann Intern Med*, 2010; 152(7): 480.
10. Berger-Bachi B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* // *Cell Molecular Life Science*, 1999; 56: 764–770.
11. Berger-Bachi B., Senn M. M., Ender M., et al. Resistance to beta lactam antibiotics // *Staphylococci in human disease* / Ed by Crossley K. B., K., Fefferson K. K., Archer G. L. et al. – 2nd ed. – Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009 –Pp.177–178.
12. Boubaker K., Diebold P., Blanc D. S., et al. 2004. Panton-Valentine leukocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren // *Emerg. Infect. Dis*, 10:121–124.
13. Bouza E. New therapeutic choices for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin Microbiol Infect*. 2009;Suppl 7:44-52.
14. Boyce J. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1992; 13(12): 725–37.
15. Boyle-Vavra S., Daum R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin // *Lab Invest*, 2007; 87(1): 3–9.
16. Breedt J., Teras J., Gardovskis J., et al. Tigecycline 305 cSSSI Study Group. Safety and efficacy of tigecycline in treatment of skin and skin structure infections: results of a double-blind phase 3 comparison study with vancomycin-aztreonam // *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(11): 4658–66.
17. BrissonNoel A., Courvalin P: Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus* // *Gene*, 1986; 43–247.
18. BrissonNoel A., Delrieu P., Samain D., Courvalin P: Inactivation of lincosamide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosamid-nucleotidyl transferases and comparison of the corresponding resistance genes // *J Biol Chem*, 1988; 263–14880.
19. Brown D. F., Edwards D. I., Hawkey P. M., et al. Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) // *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56(6): 1000–18.

20. Brown S., Zhang Y. H., Walker S. A revised pathway proposed for *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid biosynthesis based on in vitro reconstitution of the intracellular steps // *Chem Biol*, 2008; 15(1):12–21.
21. Burkhardt O., Pletz M. W., Mertgen C. P., et al. Linezolid – the first oxazolidinone in the treatment of nosocomial MRSA pneumonia // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2007; 2(2): 123–30.
22. Cabell C.H., Abrutyn E. Progress toward a global understanding of infective endocarditis. Early lessons from the International Collaboration on Endocarditis Investigation// *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16(2):255-272.
23. Carrillo-Marquez M.A, Hulten K.G, Hammerman W. Et al. Staphylococcus aureus Pneumonia in Children in the Era of Community-acquired Methicillin-resistance at Texas Children's Hospital // *Pediatr Infect Dis J*. 2011r 14. [Epub ahead of print] .
24. Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric death from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota 1997-1999 // *MMRW Morb Mortal Wkly Rep*, 1999; 48:707–710.
25. Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*- Pennsylvania // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002; 18; 51(41): 931.
26. Cercenado E., Ruiz D. G. Community-acquired methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*(Spanish)/enferm // *Infec Microbiol Clin*, 2008; 26(10): 19–24.
27. Chambers H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging Infectious diseases*. Vol. 2. No 2, 2001p178–179.
28. Chambers H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications // *Clin. Microbiol*, 1997; 10:781–791.
29. Chang C. F., Kuo B. I., Chen T. L., et al. Infective endocarditis in maintenance hemodialysis patients: fifteen years' experience in one medical center // *J Nephrol*, 2004; 17(2): 228–235.
30. Charlebois E. D., Pedreau – Remington F., Kreiswirth B., et al. Origins of community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Infect. Dis*, 2004; 39: 47–54.
31. Chikramane S. G., Matthews P. R., Noble W. C., et al. Tn554 inserts in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England: comparison With an American methicillin-resistant group // *J. Gen. Microbiol*, 1991; 137: 1303–1311.
32. Coia J. E., Duckworth G. J., Edwards D. I., et al. Joint Working Party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) in healthcare facilities // *J Hosp Infect*, 2006; 63(1): 1–44. Erratum in: // *J Hosp Infect*, 2006; 64(1): 97–8.
33. Colin D. A., Meunier O., Staali O., et al.. Action mode of two components pore-forming leucotoxins from *S.aureus* // *Med. Microbiol. Immunol*, 1996; 185:107.
34. Cooper B. S., Stone S. P/Kibbler C. C. et al. Isolations measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: systematic review of the literature // *BMJ*, 2004; 533–538.
35. Cooper G., Platt R. *Staphylococcus aureus* bacteremia in diabetic patients. Endocarditis and mortality. *Am J Med*, 1982; 73(5): 658–662.
36. Couto I., de Lencastre H., Severina E., et al. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri* // *Microb. Drug Resist*, 1996; 2: 377–391.
37. Couto I., Wu S., Tomazs A., de Lencaste H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mec A* homologue native to the species // *J. Bacterial*, 2003; 185: 645–653.
38. Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., et al. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50 // *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(9): 2276–85.
39. Dancer S. J., Robb A., Crawford A. et al. Oral streptogramins in the management of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) infections // *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51(3): 731–735.

40. Davis K. A., Stewart J. J., Crouch H. K., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection // *Clin Infect Dis*, 2004(6): 776–782.
41. De Buyser M. L., Morvan A., Auber S. Evaluation of a ribosomal gene probe for the identification of species and subspecies within genus *Staphylococcus* // *J Gen Microbiol*, 1992; 138(5): 888–899.
42. De Jong A., Bywater R., Butty P., et al. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals // *J Antimicrob Chemother*, 2009; 63(4): 733–44.
43. Deresinski S. Counterpoint: Vancomycin and *Staphylococcus aureus* an antibiotic enters obsolescence // *Clin Infect Dis*, 2007; 44(12): 1543–1548.
44. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey // *Clin Infect Dis*, 2005; 40: 562.
45. Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin Microbiol Infect*, 2007; 13(3): 222–235.
46. Devriese L. A., Van Damme L. R., Fameree L. Methicillin(oxacillin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1972; 19: 598–605.
47. Diekema D. J., Pfaller M. A., Jones R. N., et al. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. SENTRY Participants Group // *Int J Antimicrob Agents*, 2000; 13(4): 257–271.
48. Diekema D. J., Pfaller M. A., Schmitz F. J., et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999 // *Clin Infect Dis*, 2001; 32(2): 114–32.
49. Doern G. V., Jones R. N., Pfaller M. A., et al. Bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue infections: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). SENTRY Study Group (North America) // *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 34(1): 65–72.
50. Dryden M. S. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 34(1): 2–7.
51. Dumpis U., Pujāte E., Perevoščikovs J. Labas sabiedrības veselības prakses vadlīnijas rīcībai ar meticilīnrezistentā *S.aureus* (MRSA) apstiprināšanas gadījumā stacionārās ārstniecības iestādēs. Epidemioloģijas biļetens. Valsts aģentūra. 2007; 41(999): 1–11
52. Eady E. A., Cove J. H. Staphylococcal resistance revisited: community - acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections // *Curr Opin Infect Dis*, 2003; 16: 103–124.
53. Eady E. A., Ross J. I., Tipper J. L., et al. Distribution of the genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci // *J Antimicrob Chemother*, 1993; 31–211.
54. EARSS *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report*, 2008, The Netherlands.
55. EARSS. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report* 2005. Bilthoven: EARSS Management.
56. EARSS. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report* 2004. Bilthoven: EARSS Management.
57. Enright M. C., Day N. P., Davies C. E., et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* // *J Clin Microbiol*, 2000; 38(3): 1008–1015.
58. Enright M. C., Robinson D. A., Randle G., et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99(11): 7687–7692.
59. Eron L. J., Lipsky B. A., Low D. E., et al. Managing skin and soft tissue infections; expert panel recommendations on key decision points // *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52(1): 3–17.

60. European Centre of Disease Prevention and control/European Medicines Agency [ECDC/EMA]. Joint technical report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: ECDC/EMA; 2009 // [www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_react.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_react.pdf).
61. Euzéby J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet // *Int J Syst Bacteriol*, 1997; 47(2): 590–592.
62. Eveillard M., Martin Y., Hidri N., Boussougnant Y., Joly-Guillou M. L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration and transmission to households // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004; 25: 114–120.
63. Faria N. A., Oliveira D. C., Westh H., et al. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection // *J Clin Microbiol*, 2005; 43(4): 1836–1842.
64. Feibelkorn K. R., Crawford S. A., McElmeel M. L., et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci // *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 4740–4744.
65. Feil E. J., Cooper J. E., Grundmann H., et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? // *J Bacteriol*, 2003; 185: 3307–3316.
66. Ferrero L., Cameron B., Manse B., et al. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones // *Mol Microbiol*, 1994; 13(4): 641–653.
67. Ferretti J. J., Gilmore K. S., Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities // *J Bacteriol*, 1986; 167(2): 631–638.
68. Finch R. Gram-positive infections: lessons learnt and novel solutions // *Clin Microbiol Infect*, 2006; 12(18): 3–8.
69. Finkelstein R., Sobel J. D., Nagler A., et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: comparison of nosocomial and community-acquired infection // *J Med*, 1984; 15(3): 193–211.
70. Fluit A. C., Schmitz F. J., Verhoef J., Milatovic D. Daptomycin in vitro susceptibility in European Gram-positive clinical isolates // *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 24(1): 59–66.
71. Fowler V. G. Jr., Olsen M. K., Corey G. R., et al. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia // *Arch Intern Med*, 2003; 163(17): 2066–2072.
72. Fowler V. G., Miro J. M., Hoen B., et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress // *JAMA*, 2005; 294(8): 900.
73. French G. L. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage // *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15(7): 10–6.
74. Gaynes R, Edwards J. R.; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli // *Clin Infect Dis*, 2005; 41(6): 848–854.
75. Geffers C, Gastmeier P. Nosocomial Infections and Multidrug-resistant Organisms in Germany: Epidemiological Data From KISS (The Hospital Infection Surveillance System) // *Dtsch Arztebl Int*, 2011; 108(6): 87–93.
76. Gemmell C. G., Edwards D. I., Fraise A. P., et al; Joint Working Party of the British Society for Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and Infection Control Nurses Association. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK // *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57(4): 589–608.
77. Germaud P., Caillet S., Caillon J., Allenet M. C. Community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* in non-HIV infected adult patients // *Rev Pneumol Clin*, 1999; 55(2): 83–87.

78. Gessr R. M., McCarroll K. A., Woods G. L. Efficacy of ertapenem against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in complication skin/skin structure infections; results of a double-blind clinical trial versus piperacillin-tazobactam. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 44: 281–288.
79. Ghoshal U., Garg A., Tiwari D.P., et al. Emerging vancomycin resistance in enterococci in India // *Indian J Pathol Microbiol*. 2006 ;49(4):620-622.
80. Giesbrecht P., Kersten T., Maidhof H., Wecke J. Staphylococcal cell wall morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin // *Microbiol Mol. Biol. Rev*, 1998; 62: 1371–1414.
81. Gillespie M. T., May J. W., Skurray R. A. Detection of an integrated tetracycline resistance plasmid in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J Gen Microbiol*, 1986; 132(6): 1723–8.
82. Gillet Y., Issarte I. B., Vanhems P., et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantoin-Valentin leucocidine and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients // *Lancet*, 2002; 359: 753–759.
83. Goldrick B. First reported case of VRSA in the United States // *Am J Nurs*, 2002; 102(11): 17.
84. Gómez Gómez J., Casas Aranda I., Ruiz Gómez J., et al. [*Staphylococcus aureus* bacteremia at a general hospital] // *An Med Interna*, 1990; 7(3): 133–137.
85. Gorwitz R. J., Kruszon-Moran D., McAllister S. K., et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004 // *J Infect Dis*, 2008; 197: 1226–1234.
86. Grundmann H., Aanensen D. M., van den Wijngaard C. C., et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis // *PLoS Med*, 2010; 7(1): 1–14.
87. Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat // *Lancet*, 2006; 368(9538): 874–885.
88. Guidelines on the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. Report of a combined Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and the Hospital Infection Society // *J Hosp Infect*, 1995; 31(1): 1–12.
89. Hallin M., Friedrich A. W., Struelens M. J. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus* // *Methods Mol Biol*, 2009; 551: 189–202.
90. Hamdan-Partida A., Sainz-Espuñes T., Bustos-Martínez J. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community // *J Clin Microbiol*, 2010; 48(5):1701–1705.
91. Hanaki H., Labischinski H., Inaba Y., et al. Increase in glutamine-non-amidated muropptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. // *J Antimicrob Chemother*, 1998; 42: 315–320.
92. Hawkes M., Barton M., Conly J., et al. Community-associated MRSA: superbug at our doorstep // *CMAJ*, 2007; 176(1): 54–56.
93. Hedström S. A., Christensson B. *Staphylococcus aureus* septicaemia and endocarditis at the University Hospital in Lund 1976–1980. *Scand J Infect Dis*, 1983; 41: 38–48.
94. Herold B. C., Immergluck L. C., Maranan M. C., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk // *JAMA*, 1988; 279(8): 580–593.
95. Hidron A. I., Kourbatova E. V., Halvosa J. S., et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage // *Clin Infect Dis*, 2005; 41: 159–166.
96. Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci // *Drug Resist Updat*, 1998; 1(2): 135–150.
97. Holmes A., Ganner M., McGuane S., et al. *Staphylococcus aureus* carrying Pantoin – Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease // *J. Clin. Microbiol*, 2005; 5: 2384–2390.

98. Horinouchi S., Weisblum B: Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin type B antibiotics // *J Bacteriol*, 1982; 150–804.
99. [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_aureus/http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR@/CMRHomePage.spl](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_aureus/http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR@/CMRHomePage.spl), <http://www.genome.ou.edu/staph.html>
100. <http://www.spatalepidemiology.net/SRL-Maps>
101. Hughes C, Smith M, Tunney M. Infection control strategies for preventing the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes for older people. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 1. Art. No.: CD006354. DOI: 10.1002/14651858.CD006354.pub2.
102. Humphreys H. National guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-what do they tell us? // *Clin Microbiol Infect*, 2007; 13(9):846–53.
103. Iannini P. B., Crossley K. Therapy of *Staphylococcus aureus* bacteremia associated with a removable focus of infection // *Ann Intern Med*, 1976; 84(5): 558–560.
104. Ichiyama S., Ohta M., Shimokata K. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 2092–2096.
105. Ito H., Yoshida H., Bogaki-Shonai M, et al. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38(9): 2014–2023.
106. Ito T., Okuma K., Ma X. X. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC // *Drug Resist Updat*, 2003; 6(1): 41–52.
107. Jarlier V., Trystram D., Brun-Buisson C., et al., Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program // *Arch Intern Med*, 2010; 170(6): 552–559.
108. Jeyaratnam D., Whitty C. J., Phillips K., et al. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial // *BMJ*, 2008; 26; 336(7650): 927–930.
109. Jones M. E., Karlowsky J. A., Draghi D. C., et al. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Eurpea guide to appropriate antimicrobial therapy. *Int // J Antimicrob Agents*, 2003; 22:406–419.
110. Jones R. N. Microbiological features in the 21 st century: minimum inhibitory concentration creep, bacteriacidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains // *Clin Infect Dis*, 2006; 1: 13–14.
111. Jorgensen J. H., Crawford S. A., McElmeel M. L., et al. Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in correlaion with performance of automated broth susceptibility testing // *J Clin Microb*, 2004; 42: 1800–1802.
112. Julander I. Unfavourable prognostic factors in *Staphylococcus aureus* septicemia and endocarditis. *Scand // J Infect Dis*, 1985; 17(2): 179–187.
113. Kaiser M. L., Thompson D. J., Malinoski D., et al. Epidemiology and Risk Factors for Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Among Burn Patients // *J Burn Care Res*, 2011.
114. Kaplan S. L. Treatment of comunity-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // *Pediatr Infect Dis*, 2005; 24: 457–458.
115. Kaplan S. L., Hulten K. G., Gozales B. E., et al. Tree year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children // *Clin Infect Dis*, 2005; 49: 1785–1791.
116. Karoda M., Ohta T., Uchiyama I., et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Lancet*, 2001; 357: 1225–1240.
117. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*// *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44:1549–1555.

118. Katayama Y., Takeuchi F., Ito T., et al. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J Bacteriol*, 2003; 185(9): 2711–2722.
119. Kempf V. A., Trebesius K., Autenrieth I.B. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures // *J Clin Microbiol*, 2000; 38(2): 830–838.
120. Kenneth E., Aldrie, George A. Pankey, Arne C Rodloff .Complicated skin and skin structure infections, Part four. Lectures in Hospital infections 2006, p.10
121. Khan S. A., Novick R. P. Terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specifying erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with Tn3 // *Plasmid*, 1980; 4–148.
122. Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. // *Vet Microbiol*, 2008; 128(3–4): 298–303.
123. Klein J. L., Petrovic Z., Treacher D., et al. Severe community acquired pneumunia caused by Panton-Valentin leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*; first reported case in United Kingdom // *Intensive Care Med*, 2003; 29: 1399.
124. Kloos W. E., Bannerman T., 1999. Anthony B. F., and Hill H. R., Gram- positive bacteria: an overview and summary of session // *Rev. Infect Dis*, 1988; 10: 345–350.
125. Kloos W. E., Schleifer K. H. // Genus IV. *Staphylococcus* / *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Ed by In Holt J. G., Mair N. S, Sharpe M. S. – Baltimore: Wlliams&Wilkins, 1986. – Pp1013.
126. Kloss W. E. / Taxonomy ans systemstics of staphylococi indegenous to humans // *The Staphylococci in human disease* / Ed by Crossley K. B., Archer G. L. – 1nd ed. – New York: Churchill Livingstone, 1997. – Pp117.
127. Köck R., Becker K., Cookson B., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA): burden of disease and control challenges in Europe // *Euro Surveill*, 2010; 15(41): 19688.
128. Kondo Y, Ito T, Ma X. X., et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions // *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51(1): 264–274.
129. Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit R. D., et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* // *Science*. 1993; 259(5092): 227–230.
130. Kuo C. B., Lin J. C., Peng M. Y., et al. Endocarditis: impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients andcommunity-acquired infection // *J Microbiol Immunol Infect*, 2007; 40(4): 317–324.
131. Kuwahara – Arai K., Kondo N., Hori S., et al.. Suppression of methicillin resistance in a mecA-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the mecI-mediated repression of PBP 2' production // *Antimicrob Agents Chemother*, 1996; 40:2680–2685.
132. Labischinski H.. consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant staphylococcus aureus strains // *Med. Microbiol. Immunol.(Berl)*, 2002; 181: 241–265.
133. Lacey R. W., Chopra I.: Evidence for mutations to streptomycin in clinical strains of *Staphylococcus aureus* // *J Gen Microbiol*, 1972; 7–285.
134. Lautenschlager S., Herzog C., Zimmerli W. Course and outcome of bacteremia du to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions // *Clin Infect Dis*, 1993; 16(4): 567–573.
135. Levi K., Bailey C., Bennett A., Marsh P., et al. Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient-screening swabs // *J Clin Microbiol*, 2003; 41(7): 3187–3191.
136. Liassine N., Auckenthaler R., Descombes M. C., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes // *J Clin Microbiol*, 2004; 42(2): 825–828.

137. Libman H., Arbeit RD. Complications associated with *Staphylococcus aureus* bacteremia // Arch Intern Med, 1984; 144(3): 541–545.
138. Lina G., Bohach G. A., Nair S. P., et al. International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus* // J Infect Dis, 2004; 189(12): 2334–2336.
139. Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. // Clin. Infect. Dis, 1999; 29: 1128–1132.
140. Littlejohn T. G., Paulsen I. T., Gillespie M. T., et al., Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus* // FEMS Microbiol Lett. 1992; 74(2–3): 259–265.
141. Lucet J. C., Chevret S., Durand-Zaleski I., et al. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study // Arch Intern Med, 2003; 163(2): 181–188.
142. Ludwig W., Seewaldt E., Kilpper-Balz R. The phylogenetic position of *Staphylococcus* and *Enterococcus* // J. Gen. Microbiol, 1985; 131: 543–551.
143. Lyon B. R., Skurray R. A.: antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic bases // Microbiol Rev, 1987; 51(1): 88–134
144. MacKenzie F. M., Struelens M. J., Towner K. J., Gould I. M. ARPAC Steering Group; ARPAC Consensus Conference Participants. Report of the Consensus Conference on Antibiotic Resistance; Prevention and Control (ARPAC). // Clin Microbiol Infect, 2005; 11(11): 938–954.
145. Malanoski G. J., Samore M. H., Pefanis A., et al. *Staphylococcus aureus* catheter-associated bacteremia. Minimal effective therapy and unusual infectious complications associated with arterial sheath catheters // Arch Intern Med, 1995; 12; 155(11): 1161–1166.
146. Mangram A. J., Horan T. C., Pearson M. L., Silver L. C., et al. Guideline for prevention of surgical site infection // Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999; 20(4): 250c278;
147. Mathema B., Mediavilla J. R., Chen L. Kreistwirth B. N. Evolution and Taxonomy of *Staphylococci* // *Staphylococci in human disease* / Ed by Crossley K. B., K., Fefferson K. K., Archer G. L. et al. – 2nd ed. – Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009. – Pp35.
148. Matsuda Y., Kato H., Yamada R., et al. Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor V $\beta$ 2-positive T cells // Emerg Infect Dis, 2003; 9(3): 387–389.
149. McAleese F., Wu S.W., Sieradzki K., et al. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate- *S. aureus*-type resistance to vancomycin // J Bacteriol. 2006 ; 188(3): 1120–1133.
150. McCaig L. F., McDonald L. C., Mandal S., et al. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care // Emerg Infect Dis, 2006; 12(11): 1715–1723.
151. Miller L. G., Perdreau-Remington F., Rieg G., et al. Nectotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. N Engl // J Med, 2005; 352: 1445–1453.
152. Morreillon P., Entenza J. M., Francioli P. et al., Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis // Infect Immun, 1995; 63: 4738–4743.
153. Muder R. R., Brennen C., Wagener M. M., et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility // Ann Intern Med, 1991; 114(2): 107–112.
154. Munckhof W. J., Nimmo G. R., Schooneveldt J. M., et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults // Clin Microbiol Infect, 2009; 15(2): 149–55. Erratum in: Clin Microbiol Infect, 2009; 15(3): 296.



155. Murakami K., Fujimura T., and Doi M., Nucleotide sequence of the structural gene for the penicillin binding protein 2 of *Staphylococcus aureus* and the presence of a homologous gene in other staphylococci. *FEMS // Microbiol. Lett*, 1994; 117: 131–136.
156. Murakami K., Minamide W., Wada K., et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction // *Rinsho Byori*, 1991; 39(12): 1325–1330.
157. Murchan S., Kaufmann M. E., Deplano A., et al. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains // *J Clin Microbiol*, 2003; 4: 1574–1585.
158. Mylotte J. M., McDermott C., Spooner J. A. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia // *Rev Infect Dis*, 1987; 9: 591.
159. Naber C. K. Future strategies for treating *Staphylococcus aureus* bloodstream infections // *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14(2): 26–34.
160. Naimi T. S., LeDell K. H., Como-Sabetti K., et al. Comparison of community and health care – associated methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* infection // *JAMA*, 2003; 290(80): 2976–2984.
161. Nesin M., Svec P., Lupski J. R., et al. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistant determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. // *Antimicrob Agents Chemother*, 1990; 34: 2273.
162. Nguyen H. M., Graber C. J. Limitations of antibiotic options for invasive infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: is combination therapy the answer? // *J Antimicrob Chemother*, 2010; 65(1) :24–36.
163. Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J. D., et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in community // *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 11: 4289–4294.
164. Olive D. M., Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms // *J Clin Microbiol*, 1999; 37: 1661–1669.
165. Oliveira D. C., de Lancastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002; 7: 2155–2161.
166. Oliveira D. C., Milheirico C., Lancastre H., Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, *Scmec* type VI. // *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50(10): 3457–3459.
167. Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., et al. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes // *J Clin Microbiol*, 2002; 40(3): 857–862.
168. Panlilio A. L., Culver D. H., Gaynes R. P., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991 // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1992; 13(10): 582–586.
169. Pattee P. A., and Nevelin D. S. Transformation analysis of three lineage groups in *Staphylococcus aureus* // *J Bacteriol*, 1975; 124: 201–211.
170. Paulsen I.T., Firth N., Skurray R.A. Resistance to antimicrobial agents other than  $\beta$ - lactams // *The Staphylococci in human disease / Wd by Crossley.K.B.,Archer G.L.-1 st wd.-New York:Churchill Livingstone* , 1997 – Pp.176.
171. Petti C. A., Fowler V. G. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis // *Cardiol Clin*, 2003; 21(2): 219–233.
172. Pfaller M. A., Jones R. N., Doern G. V., et al. Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group // *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 33(4): 283–297.
173. Phillips I., Shannon K: Aminoglycoside resistance // *Br Med Bull*, 1984; 4028.
174. Phonimdaeng P., O'Reilly M., Nowlan P., Bramley A. J., Forter T. J. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants // *Mol Microbiol*, 1990; 4: 393–404.

175. Pinho M. G., Ludovice A. M, Wu S., Lencastre H. Massive reduction in methicillin resistance by transposon inactivation of the normal PBP2 in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* // *Microb Drug Resist*, 1997; 3: 409–413.
176. Pofahl W. E., Ramsey K. M., Nobles D. L., Cochran M. K., Goettler C. Importance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Eradication in Carriers to Prevent Postoperative Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Surgical Site Infection. *Am Surg*. 2011 Jan;77(1):27-31. PubMed PMID: 21396301
177. Pujāte E., Perevoščikovs J., Ņikiforova R. Pret metiċilīnu rezistentā *Staphylococcus aureus*(MRSA) izplatība Latvijā(2007. gada septembris – decembris) // VA "Sabiedrības veselības aģentūra" epidemioloģiskais biļetens. 2008; 19(1046): 1.–6.
178. Pujol M., Corbella X., Peña C., et al. Clinical and epidemiological findings in mechanically-ventilated patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998 ;17(9): 622–628.
179. Raad I. I., Sabbagh M. F. Optimal duration of therapy for catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a study of 55 cases and review // *Clin Infect Dis*, 1992; 14(1): 75–82.
180. Rex J. H., Ferraro M. J., Anderson N. L., et al. Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Principles, Practices and Challenges; A report // CLSI document X07-R, 2010; 15.
181. Rebhan A.W, Edwards H.E. Staphylococcal pneumonia: a review of 329 cases // *CanMed Assoc J*. 1960;82:513-517.
182. Reynolds P. E.. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined // *FEMS Microbiology Letters*, 1986; 33: 251–254. Rogolsky M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*//*Microbiol Rev*. 1979;43(3):320-360.
183. Rogolsky M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus* // *Microbiol. Rev*. 1979;43(3): 320 – 360.
184. Rouch D. A., Byrne M. E., Kong Y. C., Skurray R. A: The *aaC-aphD* gentamycin and kanamycin resistance determininte Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. // *J Gen Microbiol*, 1987; 133–3039.
185. Rubinstein E., Cammarata S., Oliphant T, et al. Linezolid(PNU-100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study // *Clin Infect Dis*, 2001; 32(3): 402–412.
186. Rubinstein E., Kollef M. H. Staphylococcal pneumonia // *Staphylococci in human disease / Ed by Crossley K. B., K., Fefferson K. K., Archer G. L. et al. – 2nd ed. – Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009; Pp.444.*
187. Ruoff KL, Kuritzkes DR, Wolfson JS, Ferraro MJ. Vancomycin-resistant gram-positive bacteria isolated from human sources// *J Clin Microbiol*. 1988;26(10):2064-2068.
188. Rybak M. J., Hershberger .E, Moldovan T., et al. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, including vancomycin-intermediate and -resistant strains // *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(4): 1026–1062.
189. Sacchidanand S., Penn R.L, Embil J. M., et al. Efficacy and safety of tigecycline monotherapy compared with vancomycin plus aztreonam in patients with complicated skin and skin structure infections: Results from a phase 3, randomized, double-blind trial // *Int J Infect Dis*, 2005; 9(5): 251–261.
190. Sader H. S., Jones R. N., Gales A. C., et al. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1997). SENTRY Latin America Study Group // *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998; 32(4): 289–301.
191. Sader H. S., Jones R. N., Silvaa J. B. The SENTRY Participants Group(Latin America). Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn // Microbiol Infect Dis*, 2002; 44: 281–288.
192. Sakoulas G., Moellering R. C. Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains // *Clin Infect Dis*, 2008; 46(5): 360–367.

193. Saldago C. D., Farr B. M., Calfec D. P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors // *Clin Infect Dis*, 2003; 36: 131–139.
194. Sattler C. A., Mason E. O., Kaplan S. L. Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community-acquired, methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children // *Pediatr Infect Dis J*, 2002; 21(10): 910–917.
195. Scanvic S., Denic L., Gaillon S., Giry P., Andremont A., Lucet J.C. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage // *Clin Infect Dis*, 2001; 32:1292–1398.
196. Schneewind O., Fowler A., Faull K. F. Structure of the cell wall anchor of surface proteins of *Staphylococcus aureus* // *Science*, 1995; 268: 103–106.
197. Scottish Centre for Infection and Environmental Health. Community MRSA and Panton-Valentine leukocidin // *SCIEH Wkly. Rep*, 2002; 36: 298.
198. Semon D., Movva N. R., Smith T. F., et al., Plasmid – determined bleomycin resistance in *Staphylococcus aureus* // *Plasmid*, 1987; 17(1): 46–53.
199. Shaw W. V., Brenner D. G. LeGrice S. F. et al., Chloramphenicol acetyltransferase gene of staphylococcal plasmid pC221. Nucleotide sequence analysis and expression studies // *FEBS Lett*, 1985; 179(1): 101–106.
200. Shopsin B., Gomez M., Montgomery S. O., et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains // *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 11: 3556–3563.
201. Shrestha N. K., Tuohy M. J., Hall G. S., et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system // *J Clin Microbiol*, 2002; 40(7): 2659–2661.
202. Shukla S. K., Stemper M. E., Ramaswamy S. V., et al. Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin // *J Clin Microbiol*, 2004; 42(8): 3752–3757.
203. Smeltzer M. S., Lee C. Y., Haric N., Hart M. E. Molecular basis of Pathogenicity // *Staphylococci in human disease* / Ed by Crossley K. B., K., Fefferson K. K., Archer G. L. et al. – 2nd ed. – Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009 – Pp.66.
204. Smith A. J., Daniels T., Bohnen J. M. A Soft tissue infections and the diabetic foot. *Am J Surg*, 1996; 172(6): 7–12.
205. Stackenbrant E., Woese C. R. The evolution of prokaryotes. *Symp Soc Gen Microbiol*, 1981; 32: 1.
206. Stamm A. M., Long M. N., Belcher B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J Infect Control*, 1993; 21(2): 70–74.
207. Stefani S., Varaldo P. E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe // *Clin Microbiol Infect*, 2003; 9(12): 1179–1186.
208. Stevens D. L., Herr D., Lampiris H, et al. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // *Clin Infect Dis*, 2002; 34(11): 1481–1490.
209. Stewart P. R., Dubin D. T., Chikramane S. G., et al. SM. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus* // *Plasmid*, 1994(1): 12–20.
210. Struelens M. J., Hawkey P. M., French G. L, et al. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs // *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15(2): 112–119.
211. Stutzmann M. P., Entenz J. M., Vaudaux P. et al., Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism *Streptococcus gordonii* // *Infect Immun*, 2001; 69: 657–664.
212. Styers D. Sheehan D. J. Hogan O. Sahn D. E. F. Laboratory based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States // *Ann Clin Microbiol Antimicrobial*, 2006; 5: 2.

213. Sussman M. *Molecular Medical Microbiology* // London UK: Academic Press, 200; 2845.
214. Tacconelli E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk assessment and infection control policies // *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14(5): 407–410.
215. Tennet J. M. Lyon B. R., Midgley M. Et al., Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus* // *J Gen Microbiol*, 1989; 135(1): 1 – 10.
216. Tenover F. C., McDougal L. K., Goering R. V., et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States // *J Clin Microbiol*, 2006; 44(1): 108–118.
217. Tenover F. C., Lancaster M. V., Hill B. C., et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides // *J Clin Microbiol*, 1998; 36(4): 1020–1027.
218. Tenover F. C., Weigel L. M., Appelbaum P. C., et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania // *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48(1): 275–80.
219. Tenover F., Arbeit R., Goering R. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain 296. typing // *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 2233–2239.
220. Teruyo I. and International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements // *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(12): 4961–4967.
221. Thwaites G. E., Edgeworth J. D., Gkrania-Klotsas E, et al. Clinical Infection Research Group. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia // *Lancet Infect Dis*, 2011; 11(3): 208–222.
222. Udo E. E., Grubb W. B. Genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a Nigerian hospital // *J Med Microbiol*. 2008; 38(3): 203–208.
223. Uttley A.H, George R.C, Naidoo J, et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections // *Epidemiol Infect*. 1989; 103(1): 173–81.
224. Van Rijen M. M., Van Keulen P. H., Kluytmans J. A. Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming // *Clin Infect Dis*, 2008; 15; 46(2): 261–263.
225. Van Wely K. H., Swaving J., Freudl R., and et al. Translocation of proteins across the cell envelope of gram - positive bacteria. *FEMS // Microbiol. Rev*, 2001; 25: 437–454.
226. Vannuffel P., Laterre P. F., Bouyer M., et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients // *J Clin Microbiol*, 1998; 36(8): 2366–2368.
227. Voss A., Milatovic D., Wallrauch-Schwarz C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1994; 13(1): 50–55.
228. Wada A., Ohta H., Kulthanan K., Hiramatsu K. Molecular cloning and mapping of 16S-23S rRNA gene complexes of *Staphylococcus aureus* // *J. Bacteriol*, 1993; 175: 7483–7487. Wang D, Chen H, Li H, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* Carrying the Gene for Toxic Shock Syndrome Toxin 1 by Quantum-Dot-Probe Complexes. *J Fluoresc*. 2011; [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21274603.
229. Wang D, Chen H, Li H et al. Detection of *Staphylococcus aureus* carrying the Gene for Toxic Shock Syndrome Toxin 1 by Quantum-Dot-Probe Complex. *J Fluoresc*. 2011; [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21274603.
230. Wang J. T., Liao C. H., Fang C. T., Chie W. C., Lai M. S., Lauderdale T. L., Chang S. C. Incidence of and risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquired infection or colonization in intensive-care-unit patients // *J Clin Microbiol*, 2010; 48(12): 4439–444.
231. Wannet W. Virulent MRSA strains containing the Panton Valentine leukocidin gene in the Netherlands // *Eurosurveillance Wkly*. 2003; 7:1.
232. Wassenberg M.W, Hopmans T.E, Troelstra A., et al. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of livestock origin in Dutch hospitals: high-risk patients need only to be investigated if admitted to hospital // *Ned Tijdschr Geneesk*. 2008; 152(49): 2681–2688.

233. Waxman D. J., and Stromminger J. L., Penicillin binding proteins and the mechanism of action of beta lactam antibiotics // *Annu Rev Biochem*, 1983; 52: 825–869.
234. Weaver J. R., Pattee P. A. Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus* // *J Bacteriol*, 1964; 88: 574–580.
235. Weigel L. M., Clewell D. B., Gill S. R., et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus* // *Science*, 2003; 302(5650): 1569–1571.
236. Weisblum B: Inducible resistance to macrolides, lincosamids and strptogrammin type B antibiotics; the resistance phenotype, its biological diversity and structural elements that regulate expression-a review // *J Antimicrob Chemother*, 1985; 63: 16.
237. Weller T. M. A.. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? // *Journal of Hospital Infection*, 2000; 44: 160–172.
238. Wenzel RP. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century// *Clin Infect Dis*. 2007;45 Suppl 1:S85-S888.
239. Werthei H. F., Vos M. C., Boelens H. A., et al. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use // *J Hosp Infect*, 2004; 56: 321–325.
240. West H., Hougaard D. M., Vuust J., Rosdahl V.T.: *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci // *APMIS*, 1995; 103–225.
241. Woodford N., Johnson A. P., Morrison D., Speller D. C. Current perspectives on glycopeptide resistance. // *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(4):585-615.
242. Wu S., Pisticelli C., de Lencastre H., and Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin-susceptible strain of *Staphylococcus sciuri* // *Microb. Drug Resist*, 1996; 2: 435–441.
243. <http://www.rivm.nl>
244. <http://www.seqnet.org>
245. Wyllie D. H., Crock D. W., Peto T. E. Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteremia in two hospitals in Oxfordshire 1997-2003 // *BMJ*, 2006; 333–381.
246. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., et al. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones // *J Bacteriol*, 1990; 172(12): 6942–6949.
247. Young H. K. Skurray R. A. Amyes S. G. Plasmid – mediated trimethoprim-resistance in *Staphylococcus aureus*. Characterization of the first gram – positive plasmid dihydrofolate reductase ( type SI) // *Biochem J*, 1987; 243(1): 309 – 312.
248. Zetola N., Francis J. S., Nuermberger E. L., Bishai W. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat // *Lancet Infect Dis*, 2005; 5(5): 275–286.
249. Zhang K., McClure J. A., Conly J. M. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designed type VIII, harboring *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(2): 531–540.

### 13. PATEICĪBAS

*Autore pateicas promocija darba vadītājiem: profesorei Dacei Gardovskai un asociētajam profesoram Edvīnam Miklaševicam par padomiem, izcilu vadītprasmi un nepārtrauktu atbalstu.*

*Paldies RSU zinātņu prorektorei profesorei Ivetai Ozolantei un zinātniskajai sekretārei Ingrīdai Kreilei par konsultācijām un atbalstu doktorantūras laikā.*

*Paldies asociētajam profesoram Ugam Dumpim par vērtīgiem padomiem un uzmuntrinājumu darba veikšanas laikā.*

*Sirsnīgs paldies Elīnai Dimiņai, Dacei Bērziņai, Karīnai Aksenokai par palīdzību.*

*Paldies maniem kolēģiem mikrobiologiem: Dacei Rudzītei, Ņinai Pugačovai, Sarmūtei Ivuškānei, Tatjanai Djundikai, Rutai Pabērzai, Ģirtam Šķenderam, Ludmilai Goldšteinei, Annai Afanasjevai, Antoņinai Muižinikai, Lindai Klūgai, kuri bija iesaistīti dažādos mana darba tapšanas posmos.*

*Nenovērtējams atbalsts un stimul darbā bija un būs mans Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Centrālās laboratorijas Mikrobioloģijas un seroloģijas nodaļas un Molekulārās bioloģijas un ģenētikas nodaļas kolektīvs.*

*Darbs tapis ar ESF Nacionālās programmas „Atbalsts doktorantūras programmu īstenošanai un pēcdoktorantūras pētījumiem” projekta „Atbalsts doktorantūras un pēcdoktorantūras pētījumiem medicīnas zinātnēs” atbalstu.*

## 14. PIELIKUMI

*1.pielikums*

### Laboratory Questionnaire

#### General characteristics

EARSS Laboratory code

City

Postal code of the laboratory

Number of hospitals served by  
your laboratory

EARSS hospital codes for these  
hospitals

#### Service characteristics 2005

If available, please provide us with:

1.a The total number of blood culture requests (sets) in 2005  
(If not available, please answer questions 1b and 1c)

**OR**

1.b The total number of blood culture bottles in 2005  
**AND**

1.c The total number of bottles per blood culture request (set)

(number)

(number)

(number)

2. The total number of blood culture requests (sets) reported  
positive for all bacterial pathogens (*Try to exclude  
contamination if possible*)

Contamination  
excluded?

Yes

No

Unknown

3. How many sets per patient do you collect during a  
normal diagnostic investigation?

(number)

4. Which system/test-kit is used in your laboratory to  
identify *Klebsiella pneumoniae* at the species level?

(name of test)

#### Internet access

5. With respect to the new internet based information system EARSS-*ibis* that we are offering to you, please provide us with the type of internet connection of the laboratory:

- Dial-up modem
- Non-dial-up connection like ISDN or cable
- Other, please specify: \_\_\_\_\_
- None



**Hospital Questionnaire**

**General characteristics**

EARSS Hospital code

EARSS Laboratory code

(for example NL001A)

(for example NL001)

Postal code of the hospital

City of the hospital

**Care level**

1. **The level of care of the hospital (IMPORTANT: check the changed definitions!)**

(tick appropriate box)

**Primary level, often referred to as a district hospital or first-level referral. Has few specialities, mainly internal medicine, obstetrics-gynecology, pediatrics, and general surgery, or only general practice; limited laboratory services are available for general, but not for specialized pathological analysis; bed capacity ranges from 30 to 200 beds.**

Secondary level, often referred to as provincial hospital. Highly differentiated by function with five to ten clinical specialities; bed capacity ranging from 200-800 beds.

Tertiary level, often referred to as central, regional or tertiary-level hospital. Highly specialized staff and technical equipment, e.g., cardiology, ICU and specialized imaging units; clinical services are highly differentiated by function; may have teaching activities; bed capacity ranges from 300 to 1,500 beds.

Other, please specify: \_\_\_\_\_ (any single specialty)

If you have any remarks regarding your answer to this question, please type here

.....

.....

.....

.....

### Hospital size

2. Best estimate of catchment population your hospital in 2007\*  (number)  
(contact hospital administration)  
*\*We realise that university/teaching hospitals may also serve as district hospitals, thereby actually serving two different populations. If this is true for your hospital, please provide the catchment population for the university/tertiary care level.*
3. Hospital size in beds in 2007  (number of beds)
4. Number of intensive care beds in 2007  (number of beds, including paediatric/neonatal beds)
- 5.a Total number of patient days\* in 2007  (number of patient days)  
**OR (if not available at all)**
- 5.b The average occupancy rate in 2007  (%)
6. Total number of patient admissions in 2007  (number of admissions)

**Annex 3. Isolate Record Form *S. aureus***



To be filled out by laboratory

Instructions: please send data of the first blood-isolate of every patient with a *S. aureus* infection, confirmed by a coagulase test. Please send data on resistant and on susceptible isolates; use 1 form per isolate.

<b>Laboratory Data</b>				
Current date	dd/mm/yyyy		___ / ___ / ____	
Laboratory Code *	CC000		-----	
<b>Isolate Data</b>				
Isolate sample number (lab)	max. 12 characters		-----	
Date of sample collection	dd/mm/yyyy		___ / ___ / ____	
<b>Patient Data</b>				
Patient ID / Code	max. 12 characters		-----	
Sex	tick box	<input type="checkbox"/> Male	<input type="checkbox"/> Female	<input type="checkbox"/> Unknown
Month + Year of birth	mm/yyyy		___ / ____	
Clinical diagnosis	free text		-----	
<b>Hospital Data</b>				
Name/code of hospital**	000X		-----	
Origin of patient	tick box	<input type="checkbox"/> Admitted	<input type="checkbox"/> Outpatient	<input type="checkbox"/> Unknown
Date of admission	dd/mm/yyyy		___ / ___ / ____	
Hospital Department	tick box	<input type="checkbox"/> Surgery	<input type="checkbox"/> (Internal) Medicine	<input type="checkbox"/> Infectious diseases
		<input type="checkbox"/> Ob/Gyn	<input type="checkbox"/> ICU	<input type="checkbox"/> Emergency
		<input type="checkbox"/> Urology	<input type="checkbox"/> Haematology/oncology	<input type="checkbox"/> Pediatrics/neonatal
		<input type="checkbox"/> Pediatric/neonatal ICU		<input type="checkbox"/> Other: -----
<b>Antibiotic susceptibility testing</b>				
S/I/R, zone and/or MIC		S / I / R (fill in S, I or R)	Zone diameter (mm)	MIC (in mg/l)
<input type="checkbox"/> Cefoxitin Disk read.....AND/OR		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
<input type="checkbox"/> Oxacillin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Linezolid		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Rifampin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Vancomycin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
PCR <i>mecA</i> -gene		<input type="checkbox"/> positive	<input type="checkbox"/> negative	<input type="checkbox"/> unknown (incl. not done)
PBP2a agglutination		<input type="checkbox"/> positive	<input type="checkbox"/> negative	<input type="checkbox"/> unknown (incl. not done)
<b>Optional</b>				
Ciprofloxacin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Erythromycin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Fusidic acid		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Gentamicin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Tetracycline		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Clindamycin		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Other: .....		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----
Other: .....		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----

\* The national co-ordinators provide the laboratory code, consisting of a Country Code (CC) followed by 3 numbers.

\*\* Consists of three numbers of the laboratory code, followed by a letter identifying the hospital.

Send this form to: .....	(name/Institute)
Address: .....	Tel: ..... Fax: ..... E-mail: .....





## 4.pielikuma turpinājums

Nr. p.k.	Reģistrācijas nr.	Gads	Izmeklējamo materiāls	OXA		GEN		CIP		ERY		CC		TET		VAN		STX		RIF	
				R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
29	m-2956	2007	Materialis no brūces	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1		≥320	≤0,5						
30	m-3782	2007	Iztriepe no deguna	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	1		≥320	≤0,5						
31	s-4825	2007	Traheja s aspirāts	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1		≥320	≤0,5						
32	a-294	2008	Asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1		≥320	≤0,5						
33	m-339	2008	Iztriepe no deguns	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1	20		≤0,5						
34	m-1765	2008	Iztriepe no paduses	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1		≥320	≤0,5						
35	s-3863	2008	Pleiras punktiāts	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	≤0,5	≤10		≤0,5						
36	s-8549	2008	Iztriepe no brūces	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	ind.rez.	≥16	1	20		≤0,5						
37	a-544	2009	Asinis	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	4	≥16	1	≤10		1						
38	a-576	2009	Asinis	≥4	≤0,5	≥16	≥8	≥8	≥8	4	≥16	1	40		1						
39	a-860	2009	Asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	4	≥16	1		80	1						
40	a-1808	2009	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	4	≥16	1		80	1						
41	a-2610	2009	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	4	≥16	1		80	1						
42	a-397	2010	asinis	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	1	≤10		1						
43	a-1090	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	1	20		≤0,5						

4.pielikuma turpinājums

Nr. p.k.	Reģistrācijas nr.	Gads	Izmeklējamais materiāls	OXA		GEN		CIP		ERY		CC		TET		VAN		STX		RIF	
				R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R
44	a-1273	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
45	a-1369	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
46	a-1863	2010	asinis	≥4	≤0,5	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	≤10	≤10	≤0,5	≤0,5
47	a-2087	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
48	a-2226	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	<0,5	<0,5
49	a-2315	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
50	a-2337	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
51	a-2711	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≤0,25	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
52	a-2890	2010	asinis	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	40	40	≤0,5	≤0,5
53	s-8353	2010	Bronhu skalojums	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16	≥16	1	1	≤10	≤10	≥	≥32

## HA - MRSA ģenētiskais raksturojums

Nr. p.k.	Izolāti		ST	SCC <i>mec</i> kasetes tips	<i>spa</i> tips	<i>spa</i> atkārtojumi (sekvences)
	Reģistrācijas Nr	Gads				
			-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
1	a-241	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
2	a-2150	2004	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
3	s-2254	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
4	s-4143	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
5	s-5505	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
6	s-5570	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
7	s-8387	2004	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
8	s-8628	2004	-	III	t 425	15-12-16-02-25-17-25
9	s-8843	2004	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
10	s-1053	2005	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
11	s-8788	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
12	s-9954	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
13	s-10380	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
14	s-9058	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
15	s-9747	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
16	s-10092	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
17	s-10409	2005	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
18	a-73	2006	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
19	a-474	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
20	s-1672	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
21	s-2091	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
22	s-6088	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
23	s-7572	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
24	s-8322	2006	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
25	s-9153	2006	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
26	m-78-07	2007	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
27	s-932	2007	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
28	s-2492	2007	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
29	m-2956	2007	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
30	m-3782	2007	-	III	t 425	15-12-16-02-25-17-25



## 5. pielikuma turpinājums

Nr. p.k.	Izolāti		ST	SCC <i>mec</i> kasetes tips	<i>spa</i> tips	<i>spa</i> atkārtojumi (sekvences)
	Reģistrācijas Nr	Gads				
			-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
31	s-4825	2007	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
32	a-294	2008	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
33	m-339	2008	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
34	m-1765	2008	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
35	s-3863	2008	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
36	s-8549	2008	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
37	a-544	2009	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
38	a-576	2009	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
39	a-860	2009	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
40	a-1808	2009	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
41	a-2610	2009	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
42	a-397	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
43	a-1090	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
44	a 1273	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
45	a-1369	2010	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
46	a-1863	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
47	a-2087	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
48	a-2226	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
49	a-2315	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
50	a-2337	2010	-	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
51	a-2711	2010	-	III	t 425	15-12-16-02-25-17-25
52	a-2890	2010	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25
53	s-8353	2010	368	III	t425	15-12-16-02-25-17-25

**Overview**

- Home
- Background
- Policy
- Submit

**Database**

- Frequencies
- Spa-types
- Repeats
- MLST Mapping

**Contact**

- Inprint
- Contact us

Ridom SpaServer: spa-t1497

<b>Spa-type:</b>	t1497
<b>Repeat succession:</b>	07-23-21-22-16-34-33-13
<b>Frequency:</b>	0.00 %
<b>Total strains:</b>	8
<b>Strain records:</b>	5

**Strain Records**

Isolate ID	Isolation date	Submission date	Country	MRSA / MSSA	MLST Association	Reliability	Submitter
61010343	29-Oct-2009	07-Jan-2010	Norway	MSSA		excellent	
DN01865_08	03-Apr-2008	23-Apr-2008	Germany	MSSA	colonization	excellent	
07-01844	13-Jul-2007	13-Jul-2007	Germany	MSSA		excellent	
DN979_07	18-May-2007	24-May-2007	Germany	MSSA	unknown	excellent	
20050511-676	11-May-2005	11-Jul-2006	Latvia	MSSA		excellent	

last modified: 02-Mar-2011

**Overview**

- Home
- Background
- Policy
- Submit

**Database**

- Frequencies
- Spa-types
- Repeats
- MLST Mapping

**Contact**

- Imprint
- Contact us

Ridom SpaServer: spa-t1496

Spa-type:	t1496
Repeat succession:	08-12-02-43-34-16-02-16
Frequency:	0.00 %
Total strains:	1
Strain records:	1

**Strain Records**

Isolate ID	Isolation date	Submission date	Country	MRSA / MSSA	MLST Association	Reliability	Submitter
A-2185-04	17-Nov-2004	11-Jul-2006	Latvia	MRSA		excellent	

*last modified: 30-Oct-2009*

## S. aureus dominējošs spa tipi Latvijā (2006. -2007.g.)

No p.k.	EARSS laboratorijas kods	EARSS slimnīcas kods	Parauga No	Izolēšanas datums	Vecums	Dzimums	plh	ec	S. aureus izolāti	Spa tips
1	LV001	LV001A	A-1904	20060903	64	1	DC	HA	MSSA	t084
2	LV001	LV001A	A-1939	20060906	23	2	OP	CA	MSSA	t189
3	LV001	LV001A	A-1973	20060913	73	2	DC	CA	MSSA	t002
4	LV001	LV001A	A-1992	20060918	1	1	ICU	HA	MSSA	t015
5	LV001	LV001A	A-2061	20060926	56	2	DC	CA	MSSA	t1877
6	LV002	LV002A	9338-11	20060905	7	1	DC		MSSA	t435
7	LV002	LV002A	10425-22	20061009	1	1	DC	HA	MSSA	t435
8	LV002	LV002A	10608-33	20061011	1	2	DC	CA	MSSA	t435
9	LV002	LV002A	10972-71	20061018	1	1	DC	CA	MSSA	t164
10	LV002	LV002A	13059-98	20061130	1	2	DC	CA	MSSA	t435
11	LV003	LV003A	9-1031-1501	20060904	31	1	DC	HA	MSSA	t700
12	LV003	LV003A	9-1052-1507	20060904	56	1	DC	HA	MSSA	t015
13	LV003	LV003A	9-2113-1549	20060907	41	1	DC	CA	MSSA	t331
14	LV003	LV003A	9-781P-1635	20060912	57	1	DC	HA	MSSA	t267
15	LV003	LV003A	9-11262-1902	20060928	58	1	DC	CA	MSSA	t164
16	LV004	LV004A	200609250329	20060923	74	2	ICU	CA	MSSA	t2928
17	LV004	LV004A	200609270358	20060926	71	2	ICU	CA	MSSA	t127
18	LV004	LV004A	200610130443	20061013	58	2	ICU	CA	MSSA	t015
19	LV004	LV004A	200610230308	20061023	63	1	ICU	CA	MSSA	t1255
20	LV004	LV004A	200610300364	20061028	64	2	DC	HA	MSSA	t779
21	LV004	LV004A	200609190484	20060919	57	2	ICU	HA	MRSA	t425
22	LV004	LV004A	200702150404	20070214	63	1	DC	HA	MRSA	t425
23	LV005	LV005A	M5576	20061211	83	2	DC	CA	MSSA	t331
24	LV005	LV005A	M285	20070118	39	1	DC	CA	MSSA	t693
25	LV005	LV005A	M629	20070215	16	2	DC	HA	MSSA	t2497
26	LV006	LV006A	3619-A795	20061107	46	1	ICU	CA	MSSA	t091

## 8. pielikuma turpinājums

No p.k.	EARSS laboratorijas kods	EARSS slimnīcas kods	Parauga No	Izolēšanas datums	Vecums	Dzimums	plh	ec	S.aureus izolāti	Spa tips
27	LV007	LV007A	05-09-06-114	20060905	83	2	DC	HA	MSSA	t693
28	LV007	LV007A	16-10-06-415	20061016	25	1	ICU	CA	MSSA	t1255
29	LV007	LV007A	14-11-06-363	20061114	17	2	DC	HA	MSSA	t015
30	LV007	LV007A	26-10-06-758	20061026	54	1	ICU	HA	MRSA	t425
31	LV008	LV008A	3016-06	20060927	1	1	DC	CA	MSSA	t1877
32	LV008	LV008A	516/07	20070216	1	1	ICU	HA	MSSA	t435
33	LV008	LV008A	517/07	20070216	1	1	ICU	HA	MSSA	t435
34	LV011	LV011A	St-12	20070201	38	2	ICU	CA	MSSA	t435
35	LV012	LV012A	P-09-06-422	20060905	51	1	DC	CA	MSSA	t331
36	LV012	LV012A	P-09-06-1286	20060911	80	2	DC	CA	MSSA	t2934
37	LV012	LV012A	P-10-06-3665	20061024	42	1	DC	HA	MSSA	t693
38	LV012	LV012A	P-11-06-4389	20061130	1	2	DC	ND	MSSA	t015
39	LV012	LV012A	P-12-06-1875	20061212	45	2	DC	ND	MSSA	t435
40	LV013	LV013B	508	20061011	45	2	DC	ND	MSSA	t160
41	LV013	LV013A	613	20061206	64	1	OP	ND	MSSA	t056
42	LV013	LV013A	452	20060919	15	1	DC	ND	MRSA	t425
43	LV013	LV013A	673	20061223	41	2	DC	ND	MRSA	t425

plh – pacienta lokalizācija slimnīcā:

OP – ambulatorais pacients

DC – slimnīcas nodaļas pacients

ICU – intensīvās terapijas/reanimācijas nodaļas pacients

ec – epidemioloģiskie dati:

CA – =sadzīvē iegūts celms = infekcijas simptomi parādījās pirmās 2 diennakts laikā pēc iestāšanās slimnīcā

HA – =intrahospitalais celms= infekcijas simptomi parādījās > kā pēc 2 hospitalizācijas dienām

ND – nav datu

20 – 2 dzimums ,

23 – 1 dzimums

## Ridom SpaServer: spa-t425

Spa-type:	t425
Repeat succession:	15-12-16-02-25-17-25
Frequency:	0.02 %
Total strains:	35
Strain records:	27

## Strain Records

Isolate ID	Isolation date	Submission date	Country	MRSA / MSSA	MLST	Association	Reliability	Submitter
007_spa_id_3970_2010	24-Jan-2010	19-Feb-2010	Germany	MRSA		infection	excellent	
93-364664_SPA-UNI-	07-Feb-2008	16-Oct-2008	Germany				excellent	
08-54084	22-May-2008	22-May-2008	Norway	MRSA			excellent	
08-23637	12-Mar-2008	12-Mar-2008	Norway	MRSA			excellent	
040_01640	20-Sep-2007	05-Oct-2007	Germany	MRSA		colonization	excellent	
ccug 53385	29-Aug-2006	11-Apr-2007	Sweden	MRSA			good	
NA32	14-Sep-2006	05-Oct-2006	Denmark	MRSA			excellent	Westh, Hvidovre Hospital
165-1	30-Aug-2006	31-Aug-2006	United States				excellent	
166-1	30-Aug-2006	31-Aug-2006	United States				excellent	
S-5530-03	01-Nov-2003	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
20051011-717	11-Oct-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
S-8281-05	01-Nov-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
20051028-328	28-Oct-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
S-3042-05	26-Apr-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
20051004-636	04-Oct-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
20051004-638	04-Oct-2005	11-Jul-2006	Latvia	MRSA			excellent	
23094/04	02-Jun-2004	30-Jun-2006	Norway	MRSA	ST-239		excellent	
S-3259-03	10-Oct-2003	27-Jun-2006	Latvia	MRSA			excellent	
A-2125-05	01-Nov-2005	27-Jun-2006	Latvia	MRSA			excellent	
S-3019-05	26-Apr-2005	27-Jun-2006	Latvia	MRSA			excellent	
S43	10-Mar-2006	10-May-2006	Denmark	MRSA			good	Westh, Hvidovre Hospital
NA21	07-Mar-2006	07-Apr-2006	Denmark	MRSA			excellent	Westh, Hvidovre Hospital
1457	02-May-2005	16-Mar-2006	Norway	MRSA	ST-368		excellent	
1455	28-Apr-2005	16-Mar-2006	Norway	MRSA	ST-368		excellent	
BAP05-014	12-Jan-2005	11-Feb-2005	Sweden	MRSA			excellent	
VA19303_04	21-Dec-2004	17-Jan-2005	Germany	MRSA		infection	excellent	Vogel, University of Würzburg
BAP04-232	02-Aug-2003	10-Aug-2004	Sweden	MRSA			excellent	

last modified: 27-Oct-2010

## 15. PUBLIKĀCIJAS

Eurosurveillance, Volume 8, Issue 3, 01 March 2003

Surveillance report

### PREVALENCE OF NOSOCOMIAL INFECTIONS IN TWO LATVIAN HOSPITALS.

---

Citation style for this article: Dumpis U, Balode A, Vīgante D, Narbutė I, Valinteliene R, Pīrags V, Martinsons A, Vingre I. Prevalence of nosocomial infections in two Latvian hospitals.. Euro Surveill. 2003;8(3):pii=405. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=405>

---

U. Dumpis<sup>1</sup>, A. Balode<sup>1</sup>, D. Vīgante<sup>3</sup>, I. Narbutė<sup>1</sup>, R. Valinteliene<sup>4</sup>, V. Pīrags<sup>1</sup>, A. Martinsons<sup>1</sup>, I. Vingre<sup>2</sup>

1 Stradins University Hospital, Riga, Latvia

2 State Hospital of Traumatology and Orthopaedics, Riga, Latvia

3 National Environment Centre, Riga, Latvia

4 Institute of Hygiene, Vilnius, Lithuania

---

The first point prevalence survey of the nosocomial infection (NI) rate was conducted in two Latvian hospitals. At the time of the survey 17.5% (226/1291) patients had symptoms or were being treated for infection. The overall prevalence rate was 5.6% (72/1291) for NI and 12.7% for community acquired infections (164/1291). Surgical site infection (SSI) was the most common NI (62%) followed by respiratory tract infection (RTI) (7.5%), and urinary tract infection (UTI) (6.4%). NI rate was higher with increasing age of patients, in intensive care units and surgical wards, and among those who had an intravenous device or urinary catheter. Microbiological investigation yielded positive results in 29% (21/72) of patients with NIs. Antibacterial treatment was given to 22.3% (288/1291) of hospitalised patients and in 62% (182/288) of these, cefazolin was prescribed. Results from this study will be used to plan a national prevalence survey.

#### Introduction

Nosocomial infections (NIs) are an important cause of preventable morbidity and mortality; they also result in significant socioeconomic cost. Surveillance of NI is an essential part of the infection control programme (1). Despite their limitations, point prevalence surveys are usually preferred to determine the magnitude of NI when resources are limited. These studies are inexpensive, easy to perform, and do not require major human or technical resources. National prevalence surveys of NI have been performed in many European and developing countries (2-12) and were used as a tool to define NI control priorities. Despite national regulations requiring the reporting of all NI cases, no reliable data are available at this time due to lack of coordination of measures between national and hospital authorities. During the past few years, however, there has been an increase of interest in the control of hospital acquired infections, and some hospitals have developed individual programmes.

This paper presents data on prevalence of infection obtained during a point prevalence survey conducted in two Latvian hospitals. This is the first time that this type of survey has been conducted in Latvia. The hospitals were chosen because they had an infectious diseases

consultant and a hospital epidemiologist who were involved in infection control activities.

### **Materials and methods**

A point prevalence study design was used. Methods, infection criteria, and definitions with minor modifications were those used by Meers in the national survey of infections in the United Kingdom (7) and also in Lithuania (12). Length of hospital stay was not a definition criterion. No significant outbreaks of influenza or other acute respiratory infections were reported in Latvia at the time of the survey. The survey was carried out in Stradins University Hospital, which has 1263 beds, and in the State Hospital of Traumatology and Orthopaedics, which has 320 beds. The University hospital had most types of medical unit, but no psychiatric or paediatric department. The neonatal unit was closed during the time of the survey due to renovation. The Orthopaedics hospital had surgical wards only.

We sought to collect data on all inpatients hospitalised before 8 am on the first day of the survey. The sampling units were wards. A coordinator was responsible for managing an investigation team in each hospital. Trained medical doctors collected data from clinical records, temperature charts, laboratory reports, and information provided by physicians and nurses in each ward. Infections of more than one site in the same patient were counted as separate infections. Antibiotics prescribed at the time of the survey were recorded. Preoperative and perioperative doses of antibiotics were registered separately as prophylactic. Approximately 90% of the questionnaires were completed during the first day of the survey. Records were computer analysed using the WHO/CDC EpiInfo 2000 software. The data were entered in duplicate to minimise transcription errors.

### **Results**

All hospitalised patients from both hospitals were included in the survey. A total of 1291 patients was investigated. The median age of the patients was 56 years (range 1-98), 57 years for women (range 1-90), and 55 years for men (range 4-98), and the median length of hospitalisation prior to the study was six days (range 1-99). In 226 (17%) patients, signs of infection were detected, or these patients were receiving treatment for already diagnosed infection.

A total of 5.1 percent (66/1291) patients were reported to have NI. The overall prevalence of NI was 5.7% (72/1291) because in 6 patients, 2 infections were detected simultaneously (table 1). Surgical site infection (SSI) was the most frequent site of NI, with an overall prevalence 3.5% (45/1291) (table 2) accounting for 62% of all NI, followed by respiratory tract infection (RTI) (7.5%) and urinary tract infection (UTI) (6.4%). Hospital acquired UTI was reported in 12% (11/90) of patients with urinary catheters. Evidence of nosocomial pneumonia was found in 50% (4/8) of mechanically ventilated patients. In 53 (19.7%) patients with intravenous devices a least one NI was registered. Microbiological examination in 29% (21/72) of the patients with NI yielded positive results.



**Tableau 1 / Table 1**  
**Caractéristiques des patients et prévalence des IN / Characteristics of patients and prevalence of NI**

	Nombre total de patients Total number of patients	Patients avec IN Patients with NI n (%)	Patients avec IAC Patients with CAI N (%)
<b>Age (année / years)</b>			
15-29	177	9 (5.0)	33 (18.6)
30-45	222	16 (4.5)	38 (17.0)
46-60	260	14 (5.4)	41 (15.3)
>60	521	43 (8.3)	58 (9.4)
<b>Sexe / Sex</b>			
Hommes / Male	653	37 (5.7)	69 (10.5)
Femmes / Female	621	40 (6.3)	77 (12.2)
<b>Service / Hospital department</b>			
médecine / medicine	515	10 (1.9)	79 (15.3)
chirurgie / surgery	640	55 (8.6)	39 (6.1)
soins intensifs / intensive care unit	18	9 (44)	5 (28)
obstétrique et gynécologie / Obstetrics and Gynecology	88	1 (1.4)	11 (16)
Opérations chirurgicales / Surgical operations	495	55 (11.2)	51 (19.6)
Cathéters intraveineux / Intravenous devices	268	53 (19.7)	58 (21.6)
Ventilation mécanique / Mechanical ventilation	8	6 (75)	1 (12.5)
Sonde urinaire / Urinary catheter	90	26 (28.8)	19 (21.0)
Diabète / Diabetes	51	3 (5.8)	7 (13.7)
Durée médiane d'hospitalisation / Median hospital stay	6 (range 1-99)	14 (2.99)	6 (1.54)

**Tableau 2 / Table 2**  
**Répartition des infections nosocomiales selon le site et l'hôpital /  
 Distribution of nosocomial infections according to site and hospital**

Site d'infection Infection site	Hôpital universitaire University hospital (N=44)		Hôpital orthopédique Orthopaedics hospital (N=28)	
	N	Répartition par site Distribution by site %	N	Répartition par site Distribution by site %
Site chirurgical d'infection Surgical site infection	26	59	19	67.9
Infections urinaires Urinary tract infection	4	9	7	25
Infections de l'appareil circulatoire Bloodstream infection	2	4.5		
Infections des voies respiratoires basses Lower respiratory tract infection	11	25	2	7.1
Autres / Other	3	6.8		
<b>Total / Total</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

The prevalence of NI increased with the increasing age of the patients ( $p=0.02$ ; c 2 test for the trend) and was higher in intensive care ( $p<0.001$ ; c 2 test) and surgical departments ( $p<0.001$ ; c 2 test) (table 1). Higher prevalence was also associated with mechanical ventilation ( $p<0.001$ ; c 2 test), the presence of urinary catheters ( $p<0.001$ ; c 2 test) and intravenous devices ( $p<0.001$ ; c 2 test), with previous surgical intervention ( $p<0.001$ ; c 2 test) and longer hospital stay. In comparison with other patients, the prevalence of NI did not increase in patients with diabetes.

Community acquired infection (CAI) was detected in 164 (12.7%) patients (table 3). RTIs

accounted for 50.6% of all CAIs followed by gastrointestinal tract infections (GTIs) and UTIs (9.8% and 7.3% respectively).

**Tableau 3 / Table 3**  
Répartition des infections acquises en communauté selon le site d'infection et l'hôpital /  
Distribution of community acquired infections according to infection site and hospital

	Hôpital universitaire University Hospital (N=1031)		Hôpital orthopédique Orthopaedics hospital (N=20)	
	N	taux de prévalence prevalence rate %	N	taux de prévalence prevalence rate %
Infections des voies respiratoires Respiratory tract infection	82	7.9	1	0.5
Infections urinaires Urinary tract infection	11	1.0	1	0.5
Infections oculaires Eye infection	7	0.7		
Otitis Ear infection	6	0.6		
Infections de l'appareil locomoteur Bone and joint infection	0		2	0.9
Infections de l'appareil génital Genital infection	6	0.6		
Infections des teguments Skin and subcutaneous tissue infection	5	0.5		
Infections de l'appareil digestif* Gastrointestinal tract infection*	15	1.5		
Autre infection Other infection	27	2.6		
Nombre total d'infections Total number of infections	160	14.9	4	1.8

Antibiotics were given to 288 patients (22%) on the day of the survey, among whom 66 received antibiotics without having any signs of infection. Cefazolin was administered to 182 patients, accounting for 50% percent of all antibiotics used. Other most commonly used antibiotics were aminoglycosides (64 patients), metronidazole (46), ampicillin/amoxicillin (46), ciprofloxacin (38), ceftriaxone (14), cefuroxime (13), doxycycline (8), amoxicillin/clavulanate (6), and trimethoprim/sulfamethoxazole (6). Combination therapy with two drugs were given to 69 patients, and 3 patients were treated with three drugs. The three most common antibiotic combinations were: cefazolin with metronidazole (25 patients), cefazolin with gentamicin (10), and ciprofloxacin with metronidazole (8).

## Discussion

This pilot study on NI is the first of its kind reported in Latvia. The two hospitals surveyed are national referral centres in which highly specialised or risky medical manipulations are required. Thus the results of this survey cannot be extrapolated to other Latvian hospitals. The definitions of the first UK National Prevalence Survey (6) were used, as opposed to CDC or the second National Prevalence Survey, because we found them to be simpler and more relevant to our clinical setting. More advanced definitions sometimes require clinical and laboratory information which is not available in our hospitals on a regular basis. The methodology of the first UK National Prevalence Survey also provided a better opportunity to analyse the prevalence of community acquired infections and antibiotic use. Our main objective was to recognise the problem of NIs in Latvia by using a simple survey approach.

The prevalence of NIs was found to be 5.6%, which is within the range reported by investigators from other European and developing countries (2-12). This result should be interpreted with caution because it is difficult to compare studies with different NI definitions used.

We do not think that information bias could significantly affect the outcome of the study

because the hospital staff were not fully aware of the aims of the study. Detection bias could be taken into account because certain essential laboratory investigations were not available for the team of investigators.

In Latvian hospitals it is quite common for patients to stay hospitalised for some time after their clinical symptoms have improved, so they may finish the initiated course of treatment, or wait for some specific investigation. This is partially due to limited primary care or to specific socioeconomic situation.

Laboratory and radiological investigations may also take more time than recommended due to a lack of financial and personnel resources. It is likely that the NI rate would be higher if patients who were present in the wards but who had already recovered at the time of the survey had been excluded. Thus, the actual burden of the hospital acquired infection among very sick individuals may be higher than these results show.

RTI and SSI were the two principal types of infection found in this study. SSI accounted for the majority of hospital acquired infections, and RTI were most commonly community acquired. The low prevalence of hospital acquired UTI found in catheterised patients in the University hospital differs from the data published so far (2-12). This may be due to insufficiencies in our methodology. It is very likely that the data collection methods used that were based on doctors' diagnosis were not sensitive enough to record all UTIs.

Symptoms of UTI in patients with a serious major disease of other organs may have been ignored. As a result, urine analysis and microbiological investigation were not ordered, and therefore the surveillance team was not able to identify these patients.

With patients' increasing age, previous surgical intervention, mechanical ventilation, and the presence of intravenous devices and urinary catheters were significantly associated with the rate of NI. Surprisingly, diabetes was not found to be associated with increased prevalence of NI, probably due to the small number of patients surveyed.

Only 29% of infections were microbiologically documented. The study design did not allow us to analyse the actual number of specimens cultured. Therefore it is difficult to comment whether this low rate was due to insufficient laboratory capacity. We can only speculate that a large proportion of patients with infection were not cultured before initiation of antibiotic therapy.

Data on antibiotic use clearly indicated the lack of antibiotic prescribing policy in the hospitals selected. On the day of the survey, 22% of hospitalised patients were receiving antimicrobial treatment. This could mean that approximately 4% of the patients received antibiotics without a previously documented infection. The questionnaire did not include questions regarding the reason for the use of antibiotics.

There may be various explanations for the alarming rate of cefazolin use. First, this drug is relatively inexpensive and its dosing interval is convenient for nurses who are often overloaded with work. Furthermore, the use of cephalosporins has recently been encouraged by active marketing by pharmaceutical companies, and doctors' positive experience of their clinical efficiency. The problem of cephalosporin resistance has also only recently appeared. Second and third generation cephalosporins are more expensive, and there are frequent financial restrictions. For all the above reasons, cefazolin is considered to be an acceptable substitute to guarantee a positive clinical outcome. Secondly, in surgical departments the administered course of prophylactic antibiotics is sometimes prolonged for up to five days without clear clinical indications. And finally, the increased use of cefazolin might be due to the decline in penicillin use, which, in turn, has been caused by concerns about resistance as well as the view that this group of antibacterials may be outdated. An apparent lack of marketing by pharmaceutical companies due to the low cost of cefazolin adds to the

problem. Furthermore, their dosing interval is an additional strain for nurses. Our major concern was the wide use of cefazolin for the treatment of respiratory tract infections. Other antibiotics that have been used extensively in treatment of various patients are metronidazole and gentamicin, probably because of their low cost and presumed excellent clinical efficacy, and physicians' personal experience of prescribing them.

In conclusion, the results of our survey show that the techniques used were practical, and that it was possible to obtain the information required for the purposes of the study. This pilot study clearly showed that nosocomial infections are more prevalent in Latvian hospitals than can be seen from the official reporting system, and that a national prevalence survey is necessary to obtain information on the level of the whole country. Our study also identified problems related to the excessive use of antibiotics. Importantly, we identified high risk departments that should be targeted by infection control measures. The following studies should be focused on prevalence of NI only. CDC definitions should be used in the national survey to make data comparable to other countries and geographical areas.

### Acknowledgements

We thank the administrative, medical, and nursing staff of Stradins University Hospital and the State Hospital of Traumatology and Orthopaedics, Latvia.

We particularly acknowledge the important contributions of :

Jolanta Bārbale, Anda Jēca, Ivars Geldners, Līga Liepina, Vita Manjakova, Viktorija Mihailova, Linda Micule, Evija Rudzīte, Tatjana Saveljeva, Kalvis Straupmanis, Dins Sumerags, Natālija Vinogradova, Indra Vi\_umsone, and Ieva Ziediea to this study. The study was supported by a grant from the Latvian Science Council.

---

### References

1. Haley RW, Culver DR, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP, et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol* 1985; 121: 182-205.
2. EPINE Working Group. Prevalence of hospital-acquired infections in Spain. *J Hosp Infect* 1992; 20: 1-13.
3. Gastmeier P, Kampf G, Wischnewski N, Hauer T, Schulgen G, Schumacher M, et al. Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. *J Hosp Infect* 1998; 38: 37-49.
4. Gikas A, Pediaditis I, Roubelaki M, Troulakis G, Romanos J, Tselentis Y. Repeated multi-centre prevalence surveys of hospital-acquired infection in Greek hospitals. CICNet. Cretan Infection Control Network. *J Hosp Infect* 1999, 41: 8-11.
5. Huskins WC, O'Rourke EJ, Rhinehart E, Goldmann DA. Infection control in countries with limited resources. In: Mayhall CG, editor. *Hospital Epidemiology and Infection Control*, 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p. 1176-200.
6. Jepsen OP, Mortensen N. Prevalence of nosocomial infections and infection control in Denmark. *J Hosp Infect* 1980; 1: 237-44.
7. Meers PD, Ayliffe GAJ, Emmerson AM, Leigh DA, Mayon-White RT, Mackintosh CA, Stronge JL. Report on the national survey of infections in hospitals, 1980. *J Hosp Infect* 1981; 2 (Suppl.) 1-53.
8. Moro ML, Stazi MA, Marasca G, Greco D, Zampieri A. National prevalence survey of hospital-acquired infections in Italy, 1983. *J Hosp Infect* 1986; 8: 72-85.
9. Pavia M, Bianco A, Viggiani NM, Angelillo IF. Prevalence of hospital-acquired infections in Italy. *J Hosp Infect* 2000; 44: 135-9.
10. Ponce-de-Leon R, Rangel-Frausto MS. Infection control in developing countries. In: Bennett JV, Brachman S, editors. *Hospital Infections*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 291-6.
11. Scheel O, Stormark M. National prevalence survey on hospital infections in Norway. *J Hosp Infect* 1999; 41: 331-5.
12. Valinteliene R, Jurkuvenas V, Jepsen OB. Prevalence of hospital-acquired infection in a Lithuanian hospital. *J Hosp Infect* 1996; 34: 321-9.

**REPORT ON THE FIRST PVL-POSITIVE COMMUNITY ACQUIRED MRSA STRAIN IN LATVIA**

---

Citation style for this article: Miklaševics E, Hæggman S, Balode A, Sanchez B, Martinsons A, Olsson-Liljequist B, Dumpis U. Report on the first PVL-positive community acquired MRSA strain in Latvia. Euro Surveill. 2004;9(11):pii=485. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=485>

---

E Miklaševics<sup>1</sup>, S Hæggman<sup>2</sup>, A Balode<sup>1</sup>, B Sanchez<sup>2</sup>, A Martinsons<sup>1</sup>, B Olsson-Liljequist<sup>2</sup>, U Dumpis<sup>1</sup>

1. P. Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia

2. Swedish Institute for Infectious Disease Control, Solna, Sweden

---

**Infections by community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) have been reported worldwide. Here we present characterisation of the first CA-MRSA isolated in Latvia. A PVL-positive ST30-MRSA-IV strain was isolated from a nasal swab and the central venous catheter of a patient with fever and multiple organ failure. The PFGE pattern of this strain was identical to pattern SE00-3 of MRSA isolated in Sweden from 29 patients during 2000-2003. This strain is related to the South Pacific area, and its appearance in Sweden and Latvia demonstrates its global spread.**

### Introduction

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has recently been reported as an established cause of community acquired (CA) infections [1,2]. The majority of strains have been isolated from patients with deep skin infections and necrotising pneumonia [3,4,7]. CA-MRSA are usually described as (i) being susceptible to majority of antimicrobials and resistant only to low levels of  $\beta$ -lactam antibiotics, (ii) having a different chromosomal background compared to hospital-acquired isolates, (iii) carrying SCCmec type IV cassette, and (iv) producing the Pantone-Valentine leucocidin (PVL) [5,6].

### Methods

MRSA isolates (n=156) from 142 patients were collected in five Latvian hospitals in Riga and Liepaja from April 2003 to February 2004. Antimicrobial susceptibility testing on these strains was performed according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standards by the disc-diffusion method and the presence of the *mecA* gene was verified by PCR [7]. Presence of PVL genes (*lukS-lukF*) and SCCmec type were tested by PCR as described earlier [8,9] in all strains. PVL-positive MRSA isolates (S-5408 and S-5690) were genotyped by multilocus restriction fragment (MLRF) [10]. In addition, the S-5408 strain was typed by PFGE [11] and multilocus sequence typing (MLST) [12]. Information about the clinical features of the disease in the patient was obtained retrospectively.

### Results

Screening of 156 MRSA strains revealed two isolates harbouring genes required for the synthesis of PVL. These two isolates, S-5408 and S-5690, were cultured from catheter and nasal swab, respectively, of the same patient.

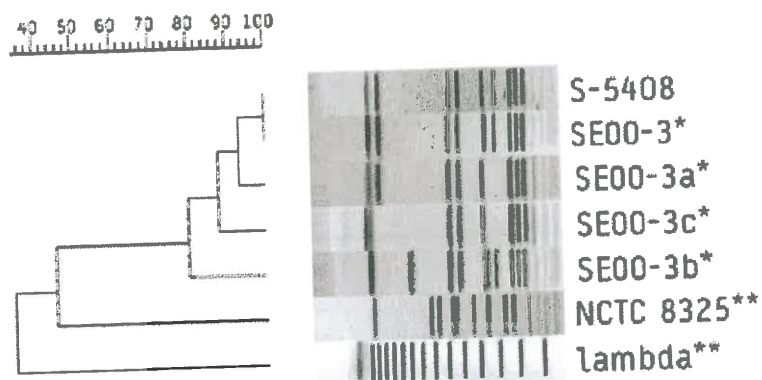
This patient, a forty six year old male with no previous clinical predisposition (immunosuppression, chronic illness, previous hospital admission), had a traumatic injury of the upper limb during construction works. Three days later he developed fatigue, swelling of the

limb and fever. On the next day he was admitted to the ICU with bullous eruptions around the lips, necrotising pneumonia with pleuritic effusion, hypotension and renal failure. He reported some possible inhalation of industrial disinfectant and poisoning was suspected. Elevated WBC count and CRP levels were recorded at the time of admission. Edematous swelling of the limbs persisted during the whole treatment period within the hospital. Blood cultures were not taken but treatment with ciprofloxacin was initiated on admission. The patient gradually improved in ICU and was transferred to the nephrology unit where cultures from the tip of the central venous catheter and nasal swab were taken as a routine MRSA screening procedure. MRSA was isolated from both cultures and treatment was changed to vancomycin. The patient was discharged from hospital in a stable condition.

S-5408 and S-5690 were resistant only to oxacillin and susceptible to all other antibiotics tested (erythromycin, gentamicin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, fusidic acid, kanamycin, vancomycin and rifampicin). It should be noted that both isolates showed low level resistance to oxacillin (MIC = 2 mg/L). In addition to the *lukS-lukF* genes encoding the PVL these strains carried SCCmec of type IV. Molecular analysis showed that MLRF pattern was identical in both strains but markedly different from the pattern of other MRSA isolated at the same time. The PFGE pattern of S-5408 was identical to pattern SE00-3 of MRSA isolated in Sweden from 29 patients during 2000 -2003 [13] [FIGURE]. The allelic profile (2-2-2-2-6-3-2) of two Swedish isolates typed so far and of Latvian strain S-5408 defined them as ST30 (<http://www.mlst.net>). This was in agreement with our analysis of the PFGE pattern (related to the pattern of strain UK EMRSA-16).

#### FIGURE

PFGE patterns of *Sma*I digested genomic DNA from the Latvian MRSA isolate (S-5408) compared with MRSA isolates from Sweden, 2000-2003



\* MRSA and its variant isolated in Sweden with the same PFGE patterns as S-5408

\*\* DNA used as controls

Note: The scale represents percent similarity after UPGMA clustering of similarity values calculated by using the Dice coefficient

#### Discussion

A PVL-positive ST30-MRSA-IV was isolated from a nasal swab and the central venous catheter of a patient with fever and multiple organ failure three days after admission into ICU. This is the

first MRSA with features of a community acquired strain to be isolated in Latvia.

Only nasal swab and central venous catheter cultures were available. Therefore causal relationship between the clinical symptoms and isolated bacteria has not been proven. Due to the clinical presentation the patient was suspected to have some kind of industrial poisoning and blood cultures were not taken. Retrospective analysis of the patient's clinical history and improvement on treatment with ciprofloxacin made *S. aureus* sepsis the most likely explanation. Colonisation of the patient by this particular MRSA strain during his brief stay in ICU seemed unlikely because the PFGE and MLRF patterns of other strains isolated from ICU patients at this time were different.

The PVL -positive CA-MRSA strain was isolated soon after the first hospital acquired MRSA strains were detected in early 2003 in Latvia. Although no country-wide surveillance existed, several hospitals had been actively testing for MRSA in previous years, with no MRSA isolate reported. This was a rather different scenario compared with what has been observed in other European countries, where hospital acquired strains appeared much earlier. There is no clear explanation as to why MRSA has emerged in Latvian hospitals so late. Most likely, epidemic strains were not imported from abroad earlier because transfer of hospitalised patients between countries was uncommon. In addition, the use of third generation cephalosporins and fluoroquinolones increased significantly only after 2001, when cheaper generic drugs became available on the market. The use of these broad-spectrum antibiotics could have facilitated the spread of MRSA strains as was suggested by other investigators [14,15].

Multilocus sequence typing attributed S-5408 and Swedish isolates with the same PFGE pattern to ST30. This is in agreement with our interpretation of the PFGE pattern as being related to that of strain UK EMRSA-16 [10,13]. Even though in the MLST database EMRSA-16 isolates are of a different sequence type, ST36, they belong to the same clonal cluster, CC30, as ST30 strains. In Europe many CA-MRSA are of ST80 [6,14] while ST30 strains are believed to be related to the South Pacific area [6]. The epidemiology of the Swedish cases is under investigation and preliminary information links at least some of them to this area. The Latvian patient had not travelled abroad but epidemiological investigation of his household contacts was not performed.

In conclusion, the PVL-positive ST30-MRSA-IV strain in Latvia is an important finding which strengthens the hypothesis of global spread of this pathogen.

---

## References

1. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*. 2002 Oct 1;35(7):819-24.
2. Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2002 Jun;8(6):602-7.
3. Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, Bruden D, Reasonover A, Parkinson A, Sparks R, Donlan RM, Martinez P, Mongkolrattanothai K, Butler JC. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Pantone-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*. 2004 May 1;189(9):1565-73.
4. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002; 359(9308):753-9.
5. Fey PD, Saïd-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:196-203.

6. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(8): 978-84.
7. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 1821-23.
8. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V et al. Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *CID.* 1999; 29:1128-32.
9. Oliveira D, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:2155-61.
10. Diep BA, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF. Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus Restriction Fragment Typing, a Rapid Screening Approach for Molecular Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4559-64.
11. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE et al. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:1574-85.
12. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:1008-15.
13. Hæggman S., Lindmark A., Stenheim M., Ekdahl K., Olsson-Liljequist B. Molecular epidemiology of PVL-positive MRSA in Sweden 2000-2003, monitored in a national database. The 11th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI), Charleston, USA, 2004; Abstract #CA-11.
14. Washio M, Mizoue T, Kajioka T, Yoshimitsu T, Okayama M, Hamada T et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in a Japanese geriatric hospital. *Public Health.* 1997; 111:187-90.
15. Landman D, Chockalingam M, Quale JM. Reduction in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* following changes in a hospital antibiotic formulary. *Clin Infect Dis.* 1999; 28:1062-6.



## ESCHERICHIA COLI AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS: BAD NEWS AND GOOD NEWS FROM THE EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE NETWORK (EARS-NET, FORMERLY EARSS), 2002 TO 2009

C Gagliotti<sup>1</sup>, A Balode<sup>2</sup>, F Baquero<sup>3</sup>, J Degener<sup>4</sup>, H Grundmann<sup>5</sup>, D Gür<sup>6</sup>, V Jarlier<sup>7</sup>, G Kahlmeter<sup>8</sup>, J Monen<sup>5</sup>, D L Monnet<sup>1</sup>, G M Rossolini<sup>9</sup>, C Suetens<sup>1</sup>, K Weist<sup>1</sup>, O Heuer ( [ole.heuer@ecdc.europa.eu](mailto:ole.heuer@ecdc.europa.eu) )<sup>1</sup>, the EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR)<sup>10</sup>

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden
2. Paul Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia
3. University Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain
4. University Medical Centre Groningen, Groningen, the Netherlands
5. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands
6. Hacettepe University School of Medicine, Ankara, Turkey
7. Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris Cedex 13, France
8. Central Hospital Växjö, Växjö, Sweden
9. University of Siena, Siena, Italy
10. EARS-Net participant are listed at the end of the article

---

Citation style for this article: Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gür D, Jarlier V, Kahlmeter G, Monen J, Monnet DL, Rossolini GM, Suetens C, Weist K, Heuer O, the EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveill.* 2011;16(11):pii=19819. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19819>  
Date of submission: 13 October 2010

---

Based on data collected by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) and the former EARSS, the present study describes the trends in antimicrobial susceptibility patterns and occurrence of invasive infections caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in the period from 2002 to 2009. Antimicrobial susceptibility results from 198 laboratories in 22 European countries reporting continuously on these two microorganisms during the entire study period were included in the analysis. The number of bloodstream infections caused by *E. coli* increased remarkably by 71% during the study period, while bloodstream infections caused by *S. aureus* increased by 34%. At the same time, an alarming increase of antimicrobial resistance in *E. coli* was observed, whereas for *S. aureus* the proportion of meticillin resistant isolates decreased. The observed trend suggests an increasing burden of disease caused by *E. coli*. The reduction in the proportion of meticillin-resistant *S. aureus* and the lesser increase in *S. aureus* infections, compared with *E. coli*, may reflect the success of infection control measures at hospital level in several European countries.

---

### Introduction

*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are the main causes of bloodstream infections (BSIs) in humans. The antimicrobial resistance of *E. coli* causing BSI is increasing alarmingly across Europe, while meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is decreasing in several countries [1]. The antimicrobial susceptibility of these microorganisms and other selected bacterial pathogens causing invasive infections has been monitored for a decade by the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) [1]. Coordination and administration of the EARSS project, previously conducted by the Dutch National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), was transferred to the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) on 1 January 2010, and the network was renamed European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). The first data collection by EARS-Net (antimicrobial susceptibility data referring to 2009) took place during June and July 2010.

Whereas detailed analysis and trends at the national level are available in the EARSS and EARS-Net reports [1,2], the present study describes the trends in susceptibility patterns and number of invasive infections caused by *E. coli* and *S. aureus* in Europe from 2002 to 2009, based on data from laboratories reporting continuously during this period.

## Methods

Data for *E. coli* and *S. aureus* BSIs were extracted from the EARSS/EARS-Net database for a convenience sample of laboratories reporting susceptibility results continuously during the period from 2002 to 2009 for aminopenicillin, fluoroquinolones, third generation cephalosporins and aminoglycosides in *E. coli* and for oxacillin in *S. aureus* [3]. Countries in which no laboratory participated for the entire period or that had only a small data set (less than 20 isolates per microorganism per year) were not included in the analysis. Only the first isolate per patient, microorganism and year was included as a representative sample. Sampling and processing of isolates was done in agreement with the EARSS manual 2005 [3]. Resistance (R category of S, I, R) was defined by the guidelines in use in the reporting countries.

The number of BSIs caused by *E. coli* and *S. aureus* and the proportions of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* and of MRSA were recorded for each year from 2002 to 2009. To assess the patterns of combined resistance of *E. coli*, the following antimicrobial classes were analysed: aminopenicillins (ampicillin and amoxicillin), aminoglycosides (gentamicin, tobramycin and amikacin), third-generation cephalosporins (ceftriaxone, cefotaxime and ceftazidime) and fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin). Resistance to a class was defined as resistance (R category) to at least one agent in the class. The significance of the temporal linear trends for resistance proportions was evaluated by the Cochran–Armitage test for trend.

## Results

A total of 198 laboratories in 22 countries continuously reported data from 2002 to 2009. The number of laboratories per country ranged between one (Iceland and Malta) and 33 (Czech Republic), while the mean number of *E. coli* and *S. aureus* isolates reported yearly per country ranged from 96 to 1,973 and from 56 to 1,290, respectively (Table).

**Table.** Mean annual number of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolates per country reported by laboratories (n=198) reporting continuously to EARSS/EARS-Net, 2002–09

**TABLE**  
Mean annual number of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolates per country reported by laboratories (n=198) reporting continuously to EARSS/EARS-Net, 2002–09

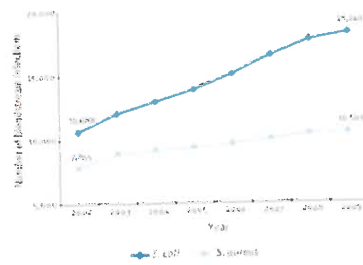
Country	Number of laboratories	Number of <i>Escherichia coli</i> isolates Mean per year (2002–09)	Number of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates Mean per year (2002–09)
Austria	40	892	530
Belgium	9	860	343
Bulgaria	7	86	84
Czech Republic	33	2,932	1,080
Denmark	5	167	171
Finland	5	569	184
France	11	1,030	1,058
Germany	7	160	171
Greece	17	839	677
Hungary	18	400	576
Ireland	1	97	55
Iceland	1	1,056	584
Italy	3	232	168
Luxembourg	1	116	164
Malta	1	106	95
Netherlands	4	231	232
Norway	2	225	167
Poland	8	537	574
Portugal	6	177	171
Spain	19	1,874	825
Sweden	1	528	753
United Kingdom	5	683	774

EARSS: European Antibiogram Resistance Surveillance System; EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

Considering the whole group of selected laboratories, the reported number of *E. coli* BSIs increased by 71% from 10,688 in 2002 to 18,240 in 2009 (Figure 1); most of the rise (38% of 71%) in *E. coli* BSIs was due to isolates resistant to two or more antimicrobials. During the same period, *S. aureus* BSIs showed a 34% increase from 7,855 to 10,503 (Figure 1). In the period from 2002 to 2009, if only *E. coli* susceptible to aminopenicillins, third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides are considered, the number of BSIs increased by 39%. Similarly, the BSIs caused by methicillin-susceptible *S. aureus* showed an increase of 37%.

**Figure 1.** Annual number of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, EARSS/EARS-Net, 2002–09 (22 countries/198 laboratories)

**FIGURE 1**  
Annual number of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, EARSS/EARS-Net, 2002-09 (22 countries/198 laboratories)

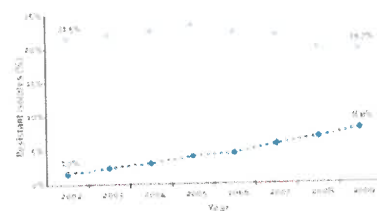


EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System  
EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

In the period from 2002 to 2009, the proportion among all *E. coli* of *E. coli* resistant to third-generation cephalosporins increased significantly from 1.7% to 8% ( $p < 0.001$ ) and the proportion of MRSA decreased from 21.5% to 19.7% ( $p < 0.001$ ) (Figure 2). Similar trends of resistance proportions as observed for aggregated data of all 198 laboratories were also observed at country level in 18 of 22 countries for *E. coli*, and in seven of 22 countries for *S. aureus*.

**Figure 2.** Proportion of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, EARSS/EARS-Net, 2002-09 (22 countries/198 laboratories)

**FIGURE 2**  
Proportion of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, EARSS/EARS-Net, 2002-09 (22 countries/198 laboratories)

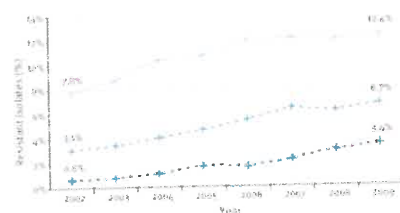


EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

Combined resistance in *E. coli* (defined as resistance to two, three or four antimicrobial classes reported to EARS-Net) showed a significant increase ( $p < 0.001$ ) (Figure 3) whereas single resistance diminished from 37.1% in 2002 to 35.8% in 2009 ( $p < 0.001$ ). The proportion of *E. coli* isolates susceptible to all four antimicrobial classes decreased from 51.4% in 2002 to 41.7% in 2009 ( $p < 0.001$ ).

**Figure 3.** Combined resistance of *Escherichia coli* to aminopenicillins, third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides, EARSS/EARS-Net, 2002-09 (22 countries/198 laboratories)

**FIGURE 3**  
Combined resistance of *Escherichia coli* to aminopenicillins, third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides, EARSS/EARS-Net, 2002-09 (22 countries/198 laboratories)



EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

## Discussion

The increase in antimicrobial resistance in *E. coli* between 2002 and 2009 was evident both in the observed increase of combined resistance and in the reduction of full susceptibility to the antimicrobials included in the analysis. In the same time period and considering the same data source, a significant decrease of methicillin resistance was observed for *S. aureus*. For this species, the number of BSIs increased less (+34%) than for *E. coli* BSI (+71%). Consistently, increasing resistance in *E. coli* and combined resistance of invasive and non-invasive isolates was reported by several European countries [4-8]. At the same time, the proportion of MRSA showed a significant decrease in many European countries [1,2]. The numbers of BSIs caused by MRSA, as reported by the mandatory surveillance system in England, decreased by 56% between 2004 and 2008 [9], and in France a significant decrease in the occurrence of MRSA was reported in 2008 [10]. A similar reduction in the rate of healthcare-associated invasive MRSA infections was observed in the general population in the United States [11].

The sampling approach selected for this study is likely to eliminate a large part of the possible temporal variation in the size of the catchment population behind the numbers. Based on the available surveillance data, it provides the best possible evidence of the increasing burden of disease caused by *E. coli* and *S. aureus* bacteraemia in the European Union. Nevertheless, if the population covered by the participating laboratories became larger during the study period, this may have contributed to the observed increase. Likewise, the sample approach includes laboratories without taking into account the size of the country, and therefore does not allow detailed analysis at national level. The disparity in the BSI trends for *E. coli* and *S. aureus* could partly be explained by ascertainment bias leading to higher reporting of *E. coli* infections. This could be caused by an increase of empirical treatment failures triggering delayed diagnostic procedures (blood culture). A similar upward trend in the number of reported cases of *E. coli* BSIs has been observed by the national voluntary surveillance scheme in England, Wales, and Northern Ireland between 2005 and 2009. The increase (37%) in BSIs caused by *E. coli* observed by this surveillance system is larger than the increase in all BSIs reported during that time period [12].

Despite the study limitations, the observed trends regarding resistance to third-generation cephalosporins and combined resistance in *E. coli* deserve further consideration. According to the results, it appears that the emergence and spread of combined resistance during the study period was the main factor that influences the decline in antimicrobial susceptibility in *E. coli*. From 2002 to 2009, a relative increase of combined resistance with a concurrent reduction of the proportion of single resistance was observed. The resistance pattern with the largest relative growth in the period from 2002 to 2009 was resistance to all four antimicrobial classes under surveillance: the frequency of this pattern increased more than fivefold from 0.6% to 3.4%. This trend suggests that within the subpopulation of resistant isolates, there was a continuous relative growth of combined resistance, possibly caused by the addition of resistance traits to strains that were already resistant to at least one of the considered antimicrobial classes. This trend may be explained by the spread of multidrug-resistant plasmids which also contain genes for the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production [13-16].

Resistance trends were monitored using interpretations: susceptible, intermediate or resistant (SIR) [3], since the actual minimum inhibitory concentrations (MIC) were not systematically available from participating laboratories. Reporting MICs rather than SIR interpretations based on clinical breakpoints would improve the dynamic monitoring of subtle, incremental changes in antimicrobial susceptibility. Moreover, the interpretation using SIR categories reported to EARS-Net is based on breakpoints defined in the participating countries' guidelines over time. Nevertheless, for the combinations of microorganisms and antimicrobials included in this study, the variation in the proportion of resistance caused by using different guidelines is very limited (unpublished data).

## Conclusion

This article reports a significant increase of antimicrobial resistance in *E. coli* invasive isolates and an overall increase in BSIs caused by this microorganism. This is a serious concern since, if the increasing trend of antimicrobial resistance and the spread of ESBL are not contained, the use of carbapenems will increase favouring the emergence of carbapenemase-producing enterobacteria. This has already been observed for *Klebsiella pneumoniae* in Greece, Israel and Cyprus [1,2].

At the same time, *S. aureus* showed a relatively smaller increase in the number of reported BSIs, but a significant decrease in the proportion of MRSA overall in the countries participating in EARSS/EARS-Net. This could be the result of public health efforts targeted at the containment of MRSA in several European countries.\* Although an overall decreasing trend for MRSA is evident in Europe, not all countries contribute to this result. Efforts to reduce the occurrence of MRSA should remain a priority irrespective of decreasing trends.

In this context, coordinated international surveillance is particularly important in order to obtain accurate knowledge of the occurrence and spread of antimicrobial resistance and to plan public health interventions.

#### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the work performed by the staff at the national laboratories providing data for EARSS/EARS-Net, and Dr John Stelling for guiding and supporting the WHONET users among the data managers at country level.

#### **EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR):**

**Austria:** P Apfalter, G El Belazi, G Fluch, C Hain, H Hrabcik, W Koller, S Metz-Gercek, R Muchl, R Strauss; **Belgium:** B Catry, M Fauville Dufaux, H Goossens, M Goossens, L Meulenbergs, S Vaerenberg; **Bulgaria:** T Kantardjiev, B Markova, J Stoyanova Marteva-Proevska; **Cyprus:** P Maikanti Charalambous, D Pieridou Bagatzouni; **Czech Republic:** V Jakubu, P Urbaskova, H Zemlickova; **Denmark:** M Galle, A Hammerum, S Olsen, K Schultz Nielsen, R Skov; **Estonia:** T Aro, I Dontsenko, M Ivanova, K Kermes, A Lemetsar; **Finland:** A Hakanen, O Lyytikäinen, T Möttönen; **France:** B Coignard, H De Valk, S Maugat, D Trystram; **Germany:** D Altmann, A Gilsdorf, I Noll, A Tille, W Witte; **Greece:** V Miriagou, M Polemis, A Tsakris, A Vatopoulos; **Hungary:** K Böröcz, M Melles, Á Tóth, Z Vegh; **Iceland:** H Briem, L Helgadóttir, K Kristinsson; **Ireland:** J Brazil, R Cunney, M Fitzgerald, P Hanrahan, S Murchan, O Murphy, B O'Connell; **Italy:** F D'Ancona, S Iannazzo, A Pantosti; **Latvia:** R Nikiforova; **Lithuania:** A Berzanskyte, L Dagyte-Sileikiene, J Miciuleviciene; **Luxembourg:** D Hansen-Koenig, M Perrin-Weniger; **Malta:** M Borg, E Scicluna, R Zammit Cassar; **Netherlands:** A De Neeling, N Van De Sande; **Norway:** K Konsmo, GS Simonsen, M Steinbakk, K Wathne, F Width Gran; **Poland:** W Hryniewicz, M Sitkiewicz, M Sulik, D Zabicka; **Portugal:** M Caniça, C Costa, V Manageiro; **Romania:** I Codita, R Serban; **Slovenia:** N Bergant, J Kolman, M Mueller-Premru; **Spain:** J Campos Marques, J Oteo Iglesias, M Perez-Vazquez; **Sweden:** I Alefjord, A Linde, B Olsson-Liljequist, J Struwe; **United Kingdom:** R Blackburn, K Eastick, G Edwards, I Fisher, R Hill, A Johnson, F Johnston, G McIlvenny, A Mullings, N Nirmal, L Patterson, J Wilson.

---

#### **\* Authors' correction:**

At the request of the authors, the following correction was made on 18 March 2011: The sentence 'This could be the result of public health efforts targeted at the containment of MRSA in several European countries and in the United States.' was changed to 'This could be the result of public health efforts targeted at the containment of MRSA in several European countries.'

---

#### **References**

1. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). EARSS annual report 2008: Bilthoven; RIVM; 2009. Available from: [http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008\\_EARSS\\_Annual\\_Report.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf)
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSS-Net): Stockholm: ECDC; 2010. Available from: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011\\_SUR\\_annual\\_EARS\\_Net\\_2009.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf)
3. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). EARSS manual 2005: Bilthoven: RIVM; 2005. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/EARS-Net-Microbiological-manual.pdf>
4. DANMAP 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark: Copenhagen: Danish Veterinary Institute, Danish Veterinary and Food Administration, Statens Serum Institut, Danish Medicines Agency, National Food Institute, Technical University of Denmark; Sep 2010. ISSN: 1600-2032. Available from: [http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap\\_2009.pdf](http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2009.pdf)
5. Health Protection Agency (HPA). Antimicrobial Resistance and Prescribing in England, Wales and Northern Ireland, 2008: London: HPA; Jul 2008. Available from: [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1216798080469](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1216798080469)
6. NORM/NORM-VET 2009. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo: NORM-VET; 2010. ISSN: 1502-2307. Available from: [http://www.unn.no/getfile.php/UNN-Internett/Faqfolk/www.antibiotikaresistens.no/NORM-09/NORM\\_VET\\_2009.pdf](http://www.unn.no/getfile.php/UNN-Internett/Faqfolk/www.antibiotikaresistens.no/NORM-09/NORM_VET_2009.pdf)

7. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). NethMap 2009. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands: Amsterdam: Dutch Foundation of the Working Party on Antibiotic Policy (SWAB); 2009. Available from: [http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/1D61A8F6E60555F3C125763900414B7B/\\$FILE/nethmap2009\\_21-9-2009.pdf](http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/1D61A8F6E60555F3C125763900414B7B/$FILE/nethmap2009_21-9-2009.pdf)
8. SWEDRES 2009. A Report on Swedish Antimicrobial Utilisation and Resistance in Human Medicine. Swedish Strategic Programme against Antibiotic Resistance (STRAMA). Swedish Institute for Infectious Disease Control: Stockholm; 2010. Available from: <http://www.strama.se/uploads/docs/Swedres%202009%20final%20version.pdf>
9. Pearson A, Chronias A, Murray M. Voluntary and mandatory surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bacteraemia in England. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64 Suppl 1:i11-7.
10. Anonymous. Recent trends in antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* isolates: the French experience. *Euro Surveill.* 2008;13(46): pii=19035. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19035>
11. Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Petit S, Gershman K, et al. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008. *JAMA.* 2010;304(6):641-8.
12. Health Protection Agency (HPA). *Escherichia coli* bacteraemia in England, Wales, and Northern Ireland, 2005 to 2009: London: HPA; 14 Apr 2010. Available from: [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1274087560639](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1274087560639)
13. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1205-14.
14. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008 Nov 20;13(47):pii=19044. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>
15. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):165-74.
16. Potz NA, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM; London & South East ESBL Project Group. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East England. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):320-6.

# Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis

Hajo Grundmann<sup>1,2\*</sup>, David M. Aanensen<sup>3</sup>, Cees C. van den Wijngaard<sup>1</sup>, Brian G. Spratt<sup>3</sup>, Dag Harmsen<sup>4</sup>, Alexander W. Friedrich<sup>5</sup>, the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group<sup>†</sup>

**1** National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, **2** Department of Medical Microbiology, University Medical Centre, Groningen, The Netherlands, **3** Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London, United Kingdom, **4** Department of Periodontology, University Hospital Münster, Germany, **5** Institute of Hygiene, University Hospital Münster, Germany

## Abstract

**Background:** *Staphylococcus aureus* is one of the most important human pathogens and methicillin-resistant variants (MRSA) are a major cause of hospital and community-acquired infection. We aimed to map the geographic distribution of the dominant clones that cause invasive infections in Europe.

**Methods and Findings:** In each country, staphylococcal reference laboratories secured the participation of a sufficient number of hospital laboratories to achieve national geo-demographic representation. Participating laboratories collected successive methicillin-susceptible (MSSA) and MRSA isolates from patients with invasive *S. aureus* infection using an agreed protocol. All isolates were sent to the respective national reference laboratories and characterised by quality-controlled sequence typing of the variable region of the staphylococcal *spa* gene (*spa* typing), and data were uploaded to a central database. Relevant genetic and phenotypic information was assembled for interactive interrogation by a purpose-built Web-based mapping application. Between September 2006 and February 2007, 357 laboratories serving 450 hospitals in 26 countries collected 2,890 MSSA and MRSA isolates from patients with invasive *S. aureus* infection. A wide geographical distribution of *spa* types was found with some prevalent in all European countries. MSSA were more diverse than MRSA. Genetic diversity of MRSA differed considerably between countries with dominant MRSA *spa* types forming distinctive geographical clusters. We provide evidence that a network approach consisting of decentralised typing and visualisation of aggregated data using an interactive mapping tool can provide important information on the dynamics of MRSA populations such as early signalling of emerging strains, cross border spread, and importation by travel.

**Conclusions:** In contrast to MSSA, MRSA *spa* types have a predominantly regional distribution in Europe. This finding is indicative of the selection and spread of a limited number of clones within health care networks, suggesting that control efforts aimed at interrupting the spread within and between health care institutions may not only be feasible but ultimately successful and should therefore be strongly encouraged.

Please see later in the article for the Editors' Summary.

**Citation:** Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, et al. (2010) Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. PLoS Med 7(1): e1000215. doi:10.1371/journal.pmed.1000215

**Academic Editor:** Henry F. Chambers, University of California San Francisco and San Francisco General Hospital, United States of America

**Received:** July 2, 2009; **Accepted:** December 4, 2009; **Published:** January 12, 2010

**Copyright:** © 2010 Grundmann et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** All contributions from the staphylococcal reference laboratories were funded by national sources. Data collection, management, and analysis were funded by the Dutch Ministry of Welfare and Sports and the Directorate General for Health, Consumer Protection of the European Commission under the Agreement Number -2003212 and the Wellcome Trust under grant number 030662. SeqNet.org was partially funded by the Interregio Program of the European Union IIIA fund 2-EUR-V-1-96. The funders had no role in the design of the project, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** DH is one of the developers of the Ridom StaphType software and the SpaServer mentioned in the manuscript. The client software is distributed and sold by the company Ridom GmbH, which is partially owned by him. All other authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** CA-MRSA, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CI, confidence interval; CO-MRSA, community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System; MLST, multilocus sequence typing; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; PVL, Panton-Valentine Leukocidin; SRL, *S. aureus* Reference Laboratories; ST, sequence type

\* E-mail: Hajo.Grundmann@rivm.nl

† Membership of the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group is provided in the Acknowledgments.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is the main cause of purulent infection in humans [1]. *S. aureus* has the potential for local as well as disseminated infection and can cause lesions in all tissues and anatomical sites. Infections can be either acquired in the community or in association with health care. The position of *S. aureus* as one of the most important human pathogens is largely due to its virulence potential and ubiquitous occurrence as a coloniser in humans, domestic animals, and livestock [2]. Between 25% and 35% of healthy human individuals carry *S. aureus* on the skin or mucous membranes [3]. Any injury that compromises epithelial integrity, trauma, medical or surgical interventions, as well as viral infections, can lead to tissue invasion [4–6]. It is assumed that severity and outcome depend largely on the virulence of the introduced strain and the immune repertoire of the host [7,8]. Occasionally, *S. aureus* acquires enhanced virulence and antimicrobial resistance through horizontal DNA transfer and maintains these mobile genetic elements in a predominantly clonal genomic background. Thus, clones of *S. aureus* are relatively stable and mainly diversify by the accumulation of single nucleotide substitutions in the absence of frequent interstrain recombination. It is therefore possible to discern different clones and clonal lineages by molecular typing [9]. This method allows several important observations to be made regarding the evolution, epidemiology, and spread of clones with particular public health importance, such as hospital-, community-, and livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). For MRSA, this surveillance is particularly important because it appears that certain clones have disseminated over wide geographical regions and are threatening major improvements in curative and public health medicine [10]. A geographically detailed description of this expansion on a continent-wide scale has been inadequate, however, due to the lack of appropriate surveys and agreement on a consistent application of standardized molecular typing approaches. At the same time, little is known about the population structure and geographical abundance of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), which provides the genetic reservoir from which MRSA emerge.

The present study was designed to fill these knowledge gaps and to provide (i) the first representative and contemporaneous snapshot of the genetic population structure of *S. aureus* (based on *spa* typing) that cause invasive infection in the European region; (ii) insights into the geographic distribution of different clones among MSSA and MRSA on a continent-wide scale; and (iii) a public Web-based mapping tool supplying interactive access and an intuitive illustration of the results generated by this large-scale typing initiative. The current study was also set up to establish the logistics for future collaborative studies that will continue to improve crucial knowledge for clinicians and diagnostic laboratories about the geographic and temporal dynamics of the MSSA/MRSA clones and their epidemic patterns in neighbouring geographical areas. Lastly, the study is intended to additionally strengthen the role of the *S. aureus* Reference Laboratories (SRLs) by exposing and communicating potentially important public health threats to health professionals and the general public.

## Methods

### *spa* Typing

Epidemiological typing uses highly discriminatory genetic markers that characterize human pathogens allowing the identification of isolates that are closely related due to recent common ancestry. The *spa* locus of *S. aureus* codes for protein A, a species-

specific gene product known for its IgG binding capacity. This locus is highly polymorphic due to an internal variable region of short tandem repeats, which vary not only in numbers but also because of nucleotide substitutions within individual repeat units [11]. DNA sequences of the *spa* gene therefore provide portable, unambiguous, and biologically meaningful molecular typing data, which have demonstrated their utility for epidemiological purposes such as transmission and outbreak investigations at various geographical levels [12,13].

### Capacity Building

During three workshops organised for technical personnel from 28 European SRLs, participants received hands-on training in *spa* sequence typing and *spa* sequence analysis according to a standard protocol using a purpose-designed software tool, StaphType, developed by Ridom GmbH [13]. Proficiency testing was carried out by mailing each SRL five well-characterized *S. aureus* isolates and five sequence chromatograms (trace files) of known *spa* types as described previously [14,15]. All laboratories participating in the structured survey described here fulfilled quantifiable quality criteria, which consisted of an unambiguous base-calling of all sequenced nucleotides for both forward and reverse sequencing runs of the test panel.

### Structured Survey

A protocol was drawn up and circulated for comment to all SRLs and agreed upon in April 2006. Following this protocol, European SRLs were asked to identify approximately 20 laboratories that serve hospitals and that are geographically and demographically representative of their country, and secure their participation. These laboratories were chosen from those that regularly participate in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). For 6 mo, from September 2006 until February 2007, these participants were asked to submit the first five successive MSSA isolates and the first five successive MRSA isolates from individual patients with invasive infection. An invasive infection was defined as a localised or systemic inflammatory response to the presence of *S. aureus* at otherwise sterile anatomical sites. Isolates were dispatched by the participating laboratories to the SRLs accompanied by additional information, including the EARSS laboratory identifier, the sample number, the date of isolation, origin of clinical specimen, demographic detail (such as age and gender), epidemiological context (hospital-acquired when symptoms developed more than 48 h after admission or as community-onset otherwise), isoxazolympenicillin- (i.e., oxacillin) or cefoxitin-resistance, and all-cause mortality 14 d after isolation of the first invasive isolate. SRLs confirmed MRSA by *mecA* PCR or determination of minimum inhibitory concentration for oxacillin together with PBP2a agglutination. Additional data were uploaded to the database and Web application if available. These consisted of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, and identification of *luk-PV* genes, indicative of Panton-Valentine Leukocidin (PVL). All SRLs preserved the isolates in strain collections and performed *spa* sequence typing according to the standard protocol, uploaded the sequence information, and made this available by synchronisation with the central Ridom SpaServer ([www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)) curated by SeqNet.org at the Institute of Hygiene, University Hospital Münster, Germany [15,16]. Submitted sequences were quality controlled by comparison with accompanying chromatograms (trace files) and excluded if stringent quality criteria for excellent sequencing data were not fulfilled. *spa* types were grouped into *spa* complexes if a single genetic event such as single insertions, single deletions, or single nucleotide polymorphism



could account for the observed sequence divergence. In the following the designation of *spa* types indicated by lower case "t" follow the nomenclature used by the *spa* server and multilocus sequence types are reported as sequence type (ST) according to convention [17]. Finally, the SCCmec type is also added to a string consisting of *spa* type/ST/SCCmec all in parenthesis, e.g., (t032/ST22/SCCmecIV).

Epidemiological and typing data were communicated in parallel to a central SQL database at the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) of the Netherlands. For each participating laboratory, SRLs also provided the postal address and indicated their administrative region (such as region, province, state, department, or NUTS-2 level) if the location of laboratories were to be aggregated on a higher administrative geographical level for display on the interactive mapping tool (which was done only for Austria, Belgium, Czech Republic, and Poland). All data were anonymous and collected in accordance with the European Parliament and Council decision for the epidemiological surveillance and control of communicable disease in the European community [18,19]. Ethical approval and informed consent were thus not required.

### Data Analysis, Geographical Illustration, and Cluster Identification

All data were inspected for inconsistencies and analysed on a country-by-country basis and returned to SRLs for feedback, clarification of inconsistencies and final approval in February 2008. After final approval, data were analysed using Stata version 10 and SAS version 9.1 (SAS Institute Inc.) using chi-square test for proportions and Student's *t*-test for continuous variables. The index of diversity is an unbiased measure of the probability of drawing two different *spa* types given the distribution of *spa* types in the sample. The 95% confidence intervals (CIs) were calculated as described previously [20]. Postal address and location of all sampling laboratories were converted into decimal cartesian coordinates using the geocoding facility at [www.spatialepidemiology.net](http://www.spatialepidemiology.net) [21]. Pairwise distances of laboratories that isolated MSSA and MRSA with identical *spa* types were calculated and distance matrices

were summarised and compared by nonparametric tests. The Web application SRL-Maps (<http://www.spatialepidemiology.net/srl-maps>) was developed to interrogate the data on the basis of mapping of laboratory locations and on centroids of administrative regions (when laboratory results were aggregated at the level of administrative region).

A spatial scan statistic was used to identify the geographic distribution of specific *spa* types at two levels: (i) country-specific frequencies that take into account all *spa* types within national boundaries and (ii) regional clusters of varying size independent of national boundaries. To identify *spa* types with higher than expected occurrence in any of the participating countries, the observed number of all *spa* types isolated within each country was compared with the number expected under the assumption of a European-wide random distribution. For the identification of regional clusters, circular windows around all laboratory locations were projected. For each location, the radius of the window was varied from 0 to 1,000 km. In this way, a finite number of distinct windows was created. For each window, the observed number of isolates with a specific *spa* type was compared with the expected number under the assumption of a random distribution. 10,000 random distributions were obtained by varying the composition of local *spa* types at all laboratory locations consistent with cumulative *spa*-specific frequencies using Monte Carlo Simulations. The test statistic was calculated by log-likelihood ratio test, whereby countries or windows where the observed *spa* type frequencies differed from those obtained by simulation were considered to contain significant clusters with an alpha error of  $p < 0.0001$ . The scan-statistic was executed with SaTScan software using SAS macros [22,23].

## Results

### Summary Statistics

26 SRLs from 26 countries satisfactorily fulfilled the proficiency criteria for *spa* sequence typing and contributed data for final analysis. Between September 2006 and February 2007, 357 laboratories serving 450 hospitals (Figure 1) collected 2,890 successive MSSA and MRSA isolates from patients with invasive



**Figure 1. Locations of participating laboratories.**  
doi:10.1371/journal.pmed.1000215.g001

*S. aureus* infection (2,603 from blood cultures, 90.1%; 17 from cerebrospinal fluid, 0.6%; and 270 from puncture fluids of other normally sterile anatomical sites, 9.3%). Final inspection of data revealed missing information for gender (28 isolates, 1%), age (54 isolates, 1.9%), sampling dates (74 isolates, 2.6%), epidemiological context (community onset or hospital acquisition, 568 isolates 19.7%), all-cause mortality 14 d after *S. aureus* isolation (1052 isolates, 36.4%), and *spa* type (40 isolates, 1.4%). Table 1 gives a summary overview of the number of participating laboratories, isolates, and *spa* types submitted by country. Many laboratories were unable to collect five invasive MRSA isolates within the sampling period because of a low MRSA incidence in the hospitals they serve. Therefore, the combined collection consisted of two-thirds MSSA (1,923; 66.5%) and one-third MRSA (967; 33.5%, Table 2). Patients with invasive MRSA infections were older (Figure 2) with a median age of 69 y compared to a median age of 63 y in MSSA patients ( $p < 0.001$ ). Moreover, MRSA patients had higher all-cause mortality (20.8%) 14 d after the first isolation of *S. aureus* than MSSA patients (13.2%,  $p < 0.0001$ ). More males (1,765/2,862; 61.7%) than females had invasive *S. aureus* infections. The proportion of MRSA compared to MSSA did not differ between the sexes ( $p = 0.2$ ). Of the 231 MRSA that were

reported as community-onset (CO-MRSA), 226 (97.8%) were tested for the presence of PVL-associated genes *luk-PV* and *ten* (4.4%) were positive. Of the 585 hospital-acquired MRSA (HA-MRSA), 551 (94.2%) were tested for PVL and six (1.1%) were positive. The difference was significant ( $p = 0.009$ ).

### *spa* Typing

A total of 660 *spa* types were reported (Table 2). Among all *spa* types, 565 and 155 were assigned to MSSA and MRSA, respectively, of which, 505 were exclusively identified as MSSA and 95 for MRSA alone. 60 *spa* types contained both MSSA and MRSA. 27 of the MSSA (1.4%) and 13 of the MRSA (1.3%) isolates were nontypeable. Table 3 shows the rank order of the most frequent *spa* types isolated during the survey and Table 4 the three most frequent *spa* types by country. MRSA was less diverse than MSSA. Only five *spa* types accounted for almost half (48.1%) of all MRSA isolates, whereas the same proportion of MSSA isolates comprised the 26 most frequent MSSA *spa* types. Estimates of the genetic diversity differed significantly with an index of diversity for MSSA of 0.985 (95% CI 0.983–0.987) and 0.940 (95% CI 0.933–0.947) for MRSA. While MSSA diversity ranged between 0.934 in Latvia and 1.0 in Iceland (unpublished data),

**Table 1.** Summary overview of participating laboratories, hospitals, number of invasive isolates of MSSA and MRSA, and *spa* types by country.

Country	n Labs	n Hospitals	n Isolates	MSSA	MRSA <sup>a</sup>	n <i>spa</i> Types MSSA	n <i>spa</i> Types MRSA	n Not Typeable	Percent Not Typed
Austria	18	48	174	120	54	70	19	1	0.6
Belgium	22	22	195	107	88	65	25	1	0.5
Bulgaria	8	8	54	29	25	23	11	0	0.0
Croatia	11	11	88	50	38	27	13	6	6.8
Cyprus	1	1	16	9	7	8	5	0	0.0
Czech Republic	20	20	145	94	51	64	9	0	0.0
Denmark	14	30	112	108	4	72	2	0	0.0
Finland	5	5	22	15	7	14	7	0	0.0
France	23	23	225	114	111	75	27	0	0.0
Germany	27	27	180	98	82	56	20	1	0.6
Greece	3	3	35	20	15	12	6	6	17.1
Hungary	10	13	110	66	44	35	9	2	1.8
Iceland	1	1	5	5	0	5	0	0	0.0
Ireland	22	22	169	85	84	55	26	0	0.0
Italy	19	19	147	80	67	53	15	0	0.0
Latvia	11	12	43	38	5	20	1	0	0.0
Malta	1	1	15	3	12	2	5	3	20.0
Netherlands	18	21	204	195	9	98	9	6	2.9
Norway	11	20	55	55	0	38	0	1	1.8
Poland	23	23	179	132	47	42	14	0	0.0
Portugal	12	12	88	48	40	36	13	0	0.0
Romania	10	10	36	25	11	18	3	0	0.0
Slovenia	11	12	58	48	10	29	3	2	3.4
Spain	21	21	204	113	91	58	19	1	0.9
Sweden	20	47	200	195	5	90	5	3	1.5
UK	15	18	131	71	60	51	18	7	5.3
Total	357	450	2,890	1,923	967	565	155	40	1.4

<sup>a</sup>The number of MRSA isolates does not reflect a prevalence or occurrence in particular countries as the protocol requested submission of the first five MSSA and MRSA isolates.

**Table 2.** Summary statistics of *S. aureus* isolated in 26 European countries.

Statistics	n <sup>a</sup>	MSSA	MRSA	Total/Overall	p-Value*
Frequency (%)	2,890	1,923 (66.5)	967 (33.5)	2,890 (100%)	—
Median age (IQR)	2,836	63 (46–75)	69 (55–78)	66 (49–76)	<0.0001
Male gender (%)	2,862	1,159 (60.8)	606 (63.3)	1,765 (61.7)	0.2
All-cause mortality after 14 d (%)	1,838	153 (13.2)	141 (20.8)	294 (16.0)	<0.0001
Hospital acquisition (%)	2,322	777 (51.6)	585 (71.7)	1,362 (58.7)	<0.0001
N <i>spa</i> types	2,850	565	155	660 <sup>b</sup>	—
N not typeable	2,850	27 (1.4)	13 (1.3)	40 (1.4)	0.9
Index of diversity (95% CI)	2,850	0.985 (0.983–0.987)	0.940 (0.933–0.947)	0.983 (0.982–0.984)	<0.05 <sup>c</sup>
Mean distance in kilometres between laboratories that isolated identical <i>spa</i> types (95% CI)	1,614 <sup>d</sup>	1,046.2 (1109.5–983.0)	786.8 (975.7–597.9)	—	0.03 <sup>d</sup>

\*p-Value for the comparison of MSSA versus MRSA.

<sup>a</sup>Number of isolates for which data were available.

<sup>b</sup>Total number of *spa* types includes 60 *spa* types that contain both MSSA and MRSA.

<sup>c</sup>Deduced from non-overlapping 95% confidence intervals.

<sup>d</sup>Includes only MRSA and MSSA with more than ten isolates per *spa* type.

IQR, interquartile range.

doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t002

MRSA diversity between countries was more heterogeneous ranging from 0.62 in Romania to 0.91 in Austria (Figure 3), indicating the presence of few dominant MRSA *spa* types in several countries. Accordingly, MRSA showed a higher degree of geographic clustering as the average distance between laboratories that isolated the same *spa* type was significantly smaller than for MSSA (Table 2). No correlation between genetic diversity of MRSA and overall proportion of MRSA among *S. aureus* blood stream infections at country level as reported to the EARSS database for 2007 was found ( $r = -0.09$ ,  $p = 0.75$ ) [24], indicating that single successful *spa* types cannot explain the variance in the proportion of MRSA causing *S. aureus* blood stream infections observed in Europe.

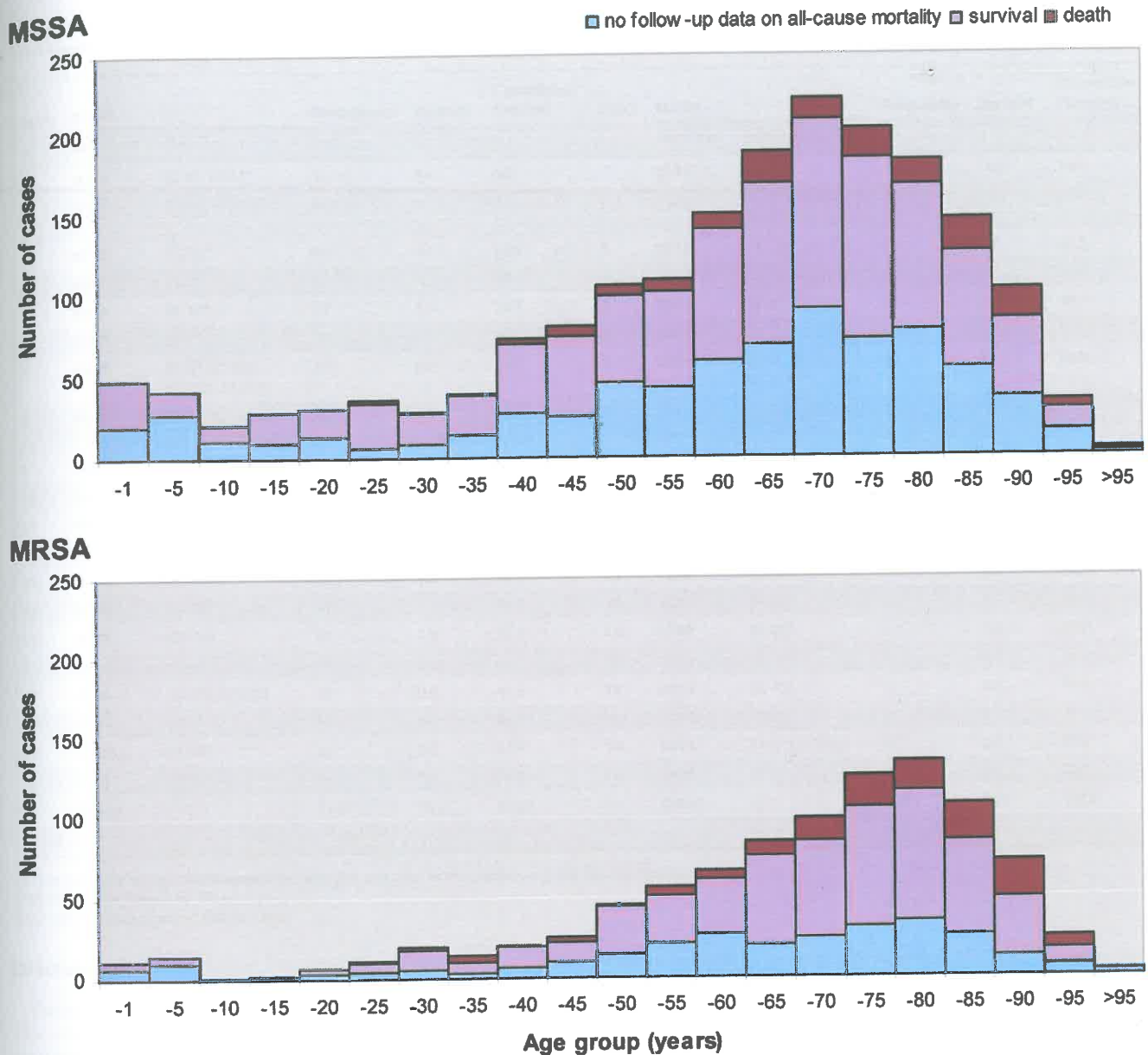
### Clustering of *spa* Types at Country and Regional Level

In 17 countries, 22 *spa* types were found with frequencies that were unexpected when applying the hypothesis of a random distribution, indicative of local epidemics (Table 5). Most (86.9%) of these were MRSA. In ten countries two *spa* types coexisted with unexpected frequencies. In four of them, these two *spa* types showed a close genetic relationship and belonged to the same *spa* complex whereby a single genetic event could account for the sequence divergence between the types. There was also a frequent regional coincidence with neighbouring countries sharing identical epidemic *spa* types. The Czech Republic and Germany shared *spa* type t003 (t003/ST225/SCCmecII), Bulgaria and Romania shared t030 (t030/ST239/SCCmecIII), the UK and Ireland t032 (t032/ST22/SCCmecIV), Italy and Croatia shared t041 (t041/ST228/SCCmecI), and strain t067 (t067/ST5125/SCCmecIV) whose dominance in Spain was first identified through this initiative [25], was also found in southern France. The notion of regional spread was supported by the cluster statistic that projected windows beyond national boundaries for this dataset (Table 6). The degree of unexpectedness, which is an indication of the significance of each cluster, is expressed by the log likelihood ratio (LLR). The majority of regional clusters extended beyond national boundaries and 74% of all isolates that occurred in these clusters were MRSA. The most significant cluster was identified in Spain and consisted of *spa* type t067 (t067/ST5&125/SCCmecIV). A northern Balkan/Adriatic cluster consisting of *spa* type t041 (t041/

ST228/SCCmecI) was found in Austria, Hungary, Slovenia, Croatia, and northern and central Italy. In Britain and Ireland, t032 (t032/ST22/SCCmecIV), known as epidemic MRSA 15 (EMRSA-15), was the dominant type and represented the third most significant cluster. An additional cluster of *spa* type t032, albeit less significant and much smaller, was located in the Brandenburg area of Germany. Central Germany, the Czech Republic, and western Poland were included in a large regional cluster of *spa* type t003 (t003/ST225/SCCmecII), which was geographically centred in Saxony and had a radius of approximately 400 km corresponding to the German hospitals participating in the study. Figure 4 provides a geographical illustration of these clusters. The largest cluster in size as well as in numbers (radius 930 km, 119 isolates) consisted of *spa* type t008 and was centred in southern France. This cluster consisted of ST8 and contained different subclones as it included both MSSA and MRSA, and MRSA isolates exhibited two different SCCmec elements (SCCmecI and IV). A smaller cluster, ranking in sixth position in terms of significance, was located in Flanders on the Belgian-Dutch border and consisted of *spa* type t740 (t740/ST45/SCCmecIV). Interestingly, regional *spa* clusters with overlapping geographical range were frequently made up of *spa* types that belonged to the same *spa* complex, a clear indication that local spread is accompanied by local evolution of the rapidly evolving *spa* locus. Clusters with the smallest size (0 km) included those submitted by single laboratories most likely reflecting single hospital outbreaks. Three regional clusters consisted of MSSA alone. They were located in Latvia (t435/ST425), Poland (t127/ST1), and Denmark (t230/ST45), indicating that regional spread of *S. aureus* is not limited to MRSA alone.

### SRL-Maps

The Web application SRL-Maps (<http://www.spatial-epidemiology.net/srl-maps>) provides a community tool for the interrogation of the geographic distribution of different *spa* types. All laboratory and regional locations across Europe are represented as placemarks on a Google map. Clicking on a placemark displays, below the map, all *spa* types identified at that location (and their frequency) along with the number of isolates (and number of geographic locations) found elsewhere (if any) for each of these



**Figure 2. Age distribution and all-cause mortality of patients 14 d after diagnosis of invasive *S. aureus* infections in Europe.** Age divided in bands of 5 y, except for infants under 1 y (-1). doi:10.1371/journal.pmed.1000215.g002

*spa* types (Figure 5). The European distribution of any *spa* type can then be displayed and placemarks on the map are colour-coded on the basis of whether the isolates at each location are all MSSA (green), all MRSA (red), or are a mix of MSSA and MRSA (yellow), with the number of isolates inside the placemark. Graphical charts are displayed showing *spa* type-specific proportion of MRSA/MSSA, all-cause mortality at 14 d, and the age distribution among cases (Figure 5). This method allows the identification and mapping of strains with particular public health importance and further exploration by the scientific community is encouraged.

#### Observations on Specific *spa* Types

For both MSSA and MRSA isolates, there was no association between specific *spa* types and all-cause mortality after 14 d,

indicating that no *spa* type was associated with hyper-virulence. Of the ten CO-MRSA isolates that were found to be PVL-positive, three were assigned to *spa* type t044 (t044/ST80/SCC*mecIV*), the so-called European community-acquired (CA)-MRSA, and another three had *spa* type t008 (t008/ST8/SCC*mecIV*) and are indistinguishable from USA300 CA-MRSA. Of the four other PVL-positive CO-MRSA, two belonged to t622 (*spa* complex 8/ST8/SCC*mecIV*), one to t529 (ST1043/SCC*mecV*), and one to t437 (not further characterised). MRSA belonging to ST398 have recently emerged in several European countries and are regarded as being livestock-associated (LA-MRSA). Of all *spa* types typically associated with this clone, *spa* types t011, t034, t571, t1255, and t2383 were identified on 12 occasions (1.3%) in eight countries during this survey. None of these isolates, however, displayed an MRSA phenotype or harboured the *mecA* gene.

**Table 3.** 20 most frequent *spa* types and their STs among MSSA and MRSA isolated in 26 European countries.

Rank	MSSA		Frequency	Percent	Cumulative Percent	Rank	MRSA		Frequency	Percent	Cumulative Percent
	<i>spa</i> Type	MLST					<i>spa</i> Type	MLST			
1	t002	ST-5 <sup>a</sup> , S-231 <sup>a</sup>	93	4.8	4.8	1	t032	ST-22 <sup>a</sup>	140	14.5	14.4
2	t084	ST-15 <sup>a</sup> (ST-18)	89	4.6	9.5	2	t008	ST-8 <sup>a</sup> (ST-247, ST-250, ST-254)	120	12.4	26.8
3	t015	ST-45 <sup>a</sup>	84	4.4	13.8	3	t041	ST-111 <sup>a</sup> , ST-228 <sup>a</sup>	72	7.4	34.2
4	t091	ST-7 <sup>a</sup>	82	4.3	18.1	4	t003	(ST-5) ST-225 <sup>a</sup>	71	7.3	41.6
5	t012	ST-30 <sup>a</sup>	77	4.0	22.1	5	t002	ST-5 <sup>a</sup> , ST-231 <sup>a</sup>	62	6.4	48.1
6	t127	ST-1 <sup>a</sup>	57	3.0	25.1	6	t067	ST-5 <sup>a</sup> , ST-125 <sup>a</sup>	50	5.2	53.3
7	t008	ST-8 <sup>a</sup> (ST-247, ST-250, ST-254)	55	2.9	27.9	7	t001	(ST-5, ST-222) ST-228 <sup>a</sup>	30	3.1	56.4
8	t021	ST-30 <sup>a</sup> (ST-33, ST-55)	49	2.5	30.5	8	t037	ST-239 <sup>a</sup> (ST-240), ST-241 <sup>a</sup>	27	2.8	59.2
9	t005	ST-22 <sup>a</sup> (ST-23, ST-60)	42	2.2	32.7	9	t030	ST-239 <sup>a</sup> (ST-246)	20	2.1	61.2
10	t026	(ST-45, ST-47)	27	1.4	34.1	10	t024	ST-8 <sup>a</sup>	14	1.4	62.7
11	t065	(ST-45, ST-46)	26	1.4	35.4	11	t190	ST-8 <sup>a</sup>	14	1.4	64.1
12	t160	(ST-12, ST-13)	26	1.4	36.8	12	t515	ST-22 <sup>a</sup>	12	1.3	65.5
13	t056	(ST-101)	25	1.3	38.1	13	t038	ST-45 <sup>a</sup>	12	1.2	66.7
14	t050	ST-45 <sup>a</sup>	21	1.1	39.2	14	t022	ST-22 <sup>a</sup>	11	1.1	67.8
15	t078	(ST-26)	21	1.1	40.2	15	t740	ST-45 <sup>a</sup>	11	1.1	69.0
16	t164	(ST-20)	19	1.0	41.2	16	t012	ST-30 <sup>a</sup>	9	0.9	69.9
17	t346	(ST-15, ST-620)	18	0.9	42.2	17	t015	ST-45 <sup>a</sup>	9	0.9	70.8
18	t024	ST-8 <sup>a</sup>	17	0.9	43.1	18	t044	ST-80 <sup>a</sup>	9	0.9	71.8
19	t230	ST-45 <sup>a</sup>	17	0.9	43.9	19	t045	ST-5 <sup>a</sup> (ST-225)	8	0.8	72.6
20	t166	(ST-34)	16	0.8	44.8	20	t127	ST-1 <sup>a</sup>	8	0.8	73.4
—	Other	—	1,062	55.2	100.0	—	Other	—	258	26.6	100.0
<b>Total</b>	—	—	1,923	100	—	—	—	—	967	100	—

STs in parentheses are those associated with the *spa* type in the SeqNet.org Spa typing data base.

<sup>a</sup>MLST as determined by SRLs.

doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t003

## Discussion

Predominant *spa* types showed a wide geographic distribution. The average distance between the locations from which the same *spa* types were sampled was smaller for MRSA isolates than MSSA isolates, suggesting a higher degree of geographical clustering of MRSA. Moreover, genetic diversity was much lower for invasive MRSA than MSSA and differed considerably between countries. Spatial-scan statistics corroborated a fundamental difference between MRSA and MSSA with respect to regional dissemination. The majority of isolates that formed regional clusters were MRSA, and 13 of the 15 major MRSA *spa* types (defined as more than ten isolates in the database) occurred in geographical clusters. They were typically hospital acquired and no more than three clusters overlapped in the same region. Conversely, of the 27 major MSSA *spa* types, only five showed significant geographical clustering and only three consisted of MSSA alone. Thus, invasive MRSA clones in Europe display a typical epidemic behaviour and have a predominantly regional distribution. To unravel the dynamics of spread of these epidemic MRSA requires the present type of survey to be repeated every few years.

The emergence of MRSA occurs by the acquisition of the methicillin resistance determinant (SSC*mec*) by MSSA strains. MRSA strains typically emerge from the most prevalent MSSA strains and it is a rare event, although new findings suggest that it

is more frequent than originally suggested [26,27]. There are thus fewer MRSA clones compared to MSSA clones and they are very young on evolutionary time scales (less than 50 y old) and have had little time to diversify since they arose, whereas MSSA are much older and thus more diverse. MRSA clones also expand because of the selective forces exerted by heavy antibiotic use in hospitals and conditions that favour transmission within and between hospitals, which constrains their diversity. In contrast, MSSA will be subject to much weaker selection leading to neutral genetic drift that maintains their diversity. Geographic spread of MRSA clones will be facilitated by repeated hospital admissions and referrals of MRSA carriers [28] who typically belong to an older and thus less mobile segment of the population. The broader distribution of MSSA clones may reflect dissemination by hosts with different travel patterns than MRSA carriers as well as the longer time that MSSA clones have had to spread.

The present survey set several precedents in the field of molecular epidemiology of *S. aureus*. First, it brought together reference laboratories from 26 European countries adopting a standardised quality-controlled DNA sequence-based typing method; second, it provided a contemporaneous and comprehensive population snapshot of *S. aureus* isolates from invasive disease using an agreed sampling frame; third, it utilised modern spatial scan statistics to identify geographical clustering; fourth, it provided the first public domain Web-based interactive mapping

**Table 4.** First, second, and third most frequent MSSA and MRSA *spa* types per country and their relative proportions.

Country	MSSA <i>spa</i> Type				MRSA <i>spa</i> Type			
	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)
Austria	120	t091 (8.3)	t002 (6.7)	t012 (5.0)	54	t190 (18.5)	t041 (16.7)	t001 (14.8)
Belgium	107	t002 (9.4)	t209 (4.7)	t012, t091, t740 (3.7)	88	t008 (29.6)	t002, t038 (13.7)	t740 (12.5)
Bulgaria	29	t056 (10.3)	t078, t148, t156, t1346 (6.9)	a	25	t030 (36.0)	t037 (16.0)	t010 (12.0)
Croatia	50	t050 (10.0)	t005, t015, t1361 (8.0)	t164 (6.4)	38	t041 (36.8)	t091 (10.5)	t026, t1003 (8.3)
Cyprus	9	t002 (22.2)	a	—	7	t012, t30 (28.6)	a	—
Czech Republic	94	t015, t130 (5.3)	t024, t122, t1081 (4.3)	t056, t156, t491, t1231 (3.2)	51	t003 (66.7)	t032 (13.7)	t002 (7.8)
Denmark	108	t230 (7.4)	t002, t127 (4.6)	t065, t084 (3.7)	4	t024, t037 (50.0)	—	—
Finland	15	t026 (13.3)	a	—	7	b	—	—
France	114	t002 (11.4)	t008 (6.1)	t012 (4.4)	111	t008 (48.6)	t777 (7.2)	t024 (5.4)
Germany	98	t008 (11.2)	t084 (7.1)	t015, t091 (6.1)	82	t032 (35.4)	t003 (28.1)	t001 (8.6)
Greece	20	t267 (15.0)	t012 (10.0)	a	15	t002, t044 (26.7)	t037 (20.0)	a
Hungary	66	t091, t216 (10.6)	t012, t084 (7.60)	t002, t015, t2115 (4.7)	44	t032 (38.6)	t041 (25.0)	t062 (13.6)
Iceland	5	b	—	—	0	—	—	—
Ireland	85	t021 (7.1)	t012 (4.7)	t078, t127, t166, t382, t548 (3.6)	84	t032 (45.2)	t515 (9.5)	t022 (4.8)
Italy	80	t091 (10.04)	t084 (8.8)	t012 (7.5)	67	t041 (34.3)	t008 (28.4)	t001 (13.4)
Latvia	38	t435 (21.1)	t015 (13.2)	t313, t698 (7.9)	5	b	—	—
Malta	3	b	—	—	12	t001, t032 (30.0)	t012 (20.0)	t002, t022 (10.0)
Netherlands	195	t091 (7.7)	t127 (6.2)	t002, t012, t084 (4.2)	9	b	—	—
Norway	55	t065 (9.1)	t084 (9.1)	t002, t015, t095 (3.7)	0	—	—	—
Poland	132	t127 (12.9)	t084 (9.9)	t015 (7.6)	47	t037 (29.81)	t003, t015 (14.9)	t002, t041, t1574 (6.4)
Portugal	48	t008 (8.3)	t002, t645 (6.3)	t021, t127, t148, t148, t179, t189 (4.2)	40	t032 (32.5)	t002 (20.0)	t535, t747, t2357 (7.5)
Romania	25	t021, t284 (12.0)	t005, t008, t450 (8.0)	a	11	t030 (54.6)	t127 (36.4)	t015 (9.1)
Slovenia	48	t091 (20.8)	t015 (10.4)	t005 (8.5)	10	t041 (70.0)	a	—
Spain	113	t002 (12.4)	t012, t067 (8.0)	t015 (4.5)	91	t067 (47.3)	t002 (15.4)	t008 (7.7)
Sweden	195	t015 (9.2)	t084 (8.2)	t012 (5.7)	5	b	—	—
UK	71	t012, t127 (5.6)	t021 (4.2)	nine different types	60	t032 (61.7)	t788, t1516 (3.3)	a

<sup>a</sup>All remaining *spa* types equally distributed.

<sup>b</sup>No ranking, all *spa* types equally distributed.

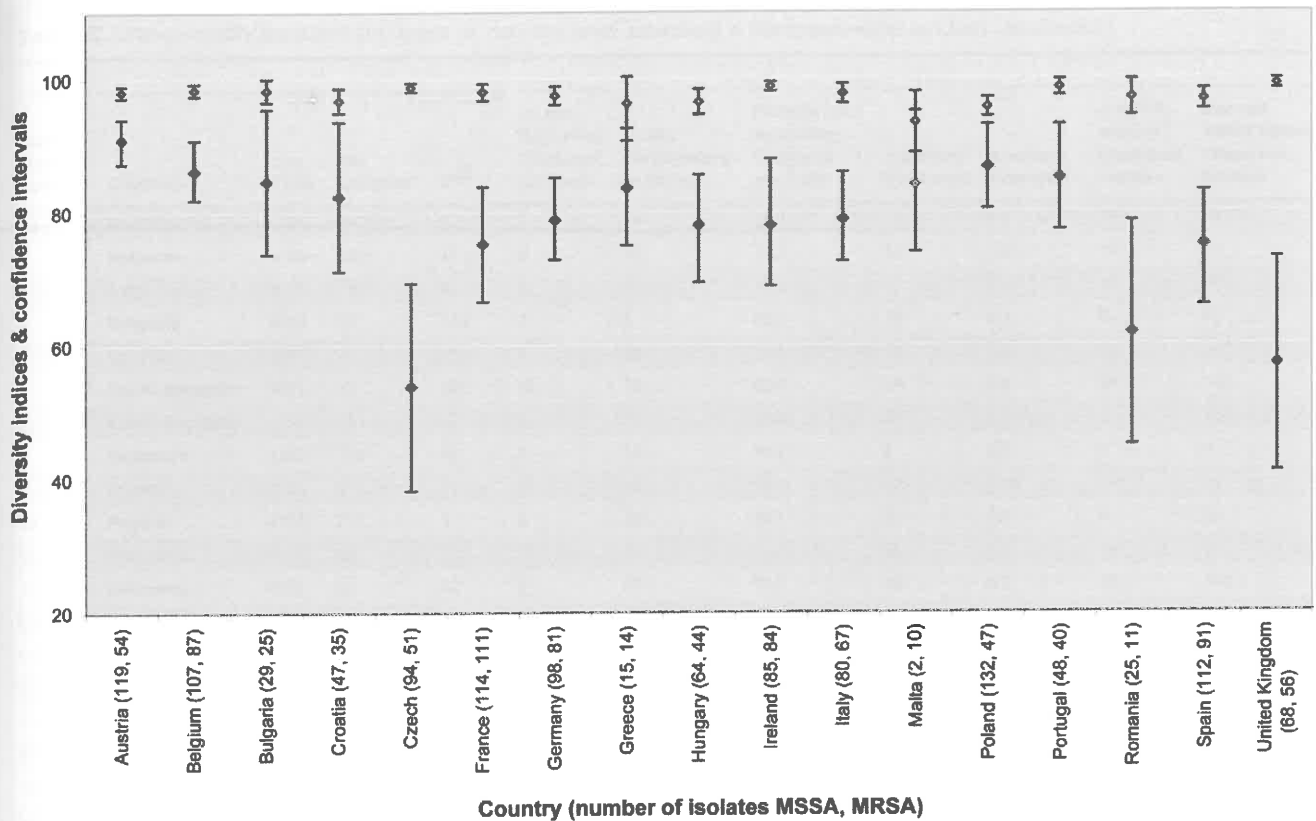
doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t004

tool for future public health research; and finally, it consolidated a collaborative framework for the continuation of this important European surveillance initiative.

All Member States of the European Union except Estonia, Lithuania, Luxemburg, and Slovakia participated and variously achieved a country-wide enrolment of diagnostic laboratories. In the run-up to this study, a successful effort was undertaken to agree on a single molecular typing approach to scale up the typing capacity, and improve quality assessment, by introducing proficiency testing for SRLs that intended to participate in advanced *S. aureus* surveillance. This effort provided the basis for the execution of a mutually agreed protocol using a standardized sampling frame and a quality-controlled genetic typing approach [12,15], based on the sequencing of the variable region of the *S. aureus spa* gene (*spa* typing) [11]. Multilocus sequence typing (MLST) was also carried out on many strains allowing most of the prevalent *spa* types to be related to MLST sequence types.

However, given the scope and ambition of this investigation, it is not surprising that the study still suffered from several operational shortcomings.

In order to keep the amount of work manageable for the participating SRLs, it was decided to include about 20 laboratories that were demographically and geographically representative of each of the participating countries. This number is arbitrary and cannot equally represent small and large countries alike. Thus the precision of spatial scan statistics is reduced in areas where the density of laboratories is low. Laboratory enrolment based on population size would provide a more appropriate sampling strategy but would also impose a proportional and frequently unacceptable amount of work on SRLs in large countries if the sample size from small countries should remain meaningful. Even medium-sized countries such as Bulgaria, Finland, Greece, and Romania were unable to enrol the intended number of laboratories mainly for technical and logistic reasons. Naturally,



**Figure 3. Estimates of country-specific genetic diversity expressed as Simpson's index of diversity of *spa* types (as a percentage) for MSSA (light blue diamonds) and MRSA (dark blue diamonds) and 95% CIs (bars).** Only countries for which *spa* type information for more than ten MRSA isolates were available were included in this figure.  
doi:10.1371/journal.pmed.1000215.g003

the number of laboratories and isolates varied between countries and geo-demographic representation could be improved in future investigations. The original intention was to collect equal numbers of successive MSSA and MRSA in all laboratories during the 6-mo sampling interval; this proved to be unrealistic, especially in countries where MRSA levels are low. As a result, Norway and Iceland could not provide any MRSA, whereas Sweden, Denmark, and the Netherlands each provided fewer than ten isolates. Cyprus and Malta had only one participating laboratory but since both provide the microbiological service for the whole of the respective island population (for Cyprus, only the Republic of Cyprus), they were entitled to submit up to 20 isolates. Nevertheless, even taking these potential problems into account, the simultaneous collection of 2,890 isolates from patients with invasive *S. aureus* infection treated in 450 hospitals during a 6-mo study interval is unparalleled and remains unmatched by previous investigations, which have drawn their conclusions from convenience samples of predominantly MRSA collected by laboratories for different clinical or biological reasons. The current collection includes one-third MRSA and thus over-represents the natural population of MRSA causing invasive disease, which was 22% in the European Union in 2007 [24]. All isolates were collected from laboratories and hospitals participating in EARSS for which estimates of the overall catchment population are known. Thus, the present sample of hospitals catered for approximately 22 million people, totalling 4.4% of the citizens living in the European Union.

Despite the above limitations, the sample provides a realistic insight into the epidemiology of *S. aureus* currently causing invasive

infection in Europe. The age distribution and all-cause mortality was consistent with the expected range [29,30]. High frequencies of invasive infections were ascertained in the very young (infants and under 5-y-olds) and older age groups with males clearly more at risk than females. Patients with MRSA were older than patients with MSSA and were 2.4 times more likely to have their infection attributed to hospital acquisition ( $p < 0.0001$ ). Invasive MRSA carried a higher all-cause mortality after 14 d. This finding is most likely confounded by a host of variables that distinguish MRSA patients from MSSA patients in fundamental ways. All-cause mortality was independent of *spa* type, indicating that this study did not identify any single *spa* type that stands out with respect to hyper-virulence or other factors that would increase the risk of fatal outcome after 14 d. While a laboratory-based cross-sectional study is limited in its ability to control for many of the crucial confounders such as comorbidity and disease severity scores and thus may not detect subtle differences in virulence properties between different clonal lineages at the patient level, this sample provides an unbiased estimate of the frequencies of specific *spa* types that have previously been reported to cause outbreaks and have attracted considerable public health attention. Few MRSA isolates carried the PVL-toxin genes and this could be an indication that many CO-MRSA were originally hospital-acquired. Only six of the PVL-positive CO-MRSA isolates, which made up 0.5% of the overall sample, had *spa* types consistent with the CA-MRSA clones most frequently reported in Europe (t008/ST8/SCC<sub>mecIV</sub> and t044/ST80/SCC<sub>mecIV</sub>) [31]. These values when compared to the overall numbers of MRSA are small but still warrant attention since PVL-positive CA-MRSA are more

**Table 5.** Unexpectedly frequent *spa* types at country level assuming a European-wide random distribution.

Country Cluster Number	Country	<i>spa</i> Type	<i>spa</i> Complex <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>	<i>n</i> Labs Reporting Clustered <i>spa</i> Type	<i>n</i> Labs Participating in Survey	Percent Labs Reporting Clustered <i>spa</i> Type	<i>n</i> Isolates Observed	<i>n</i> Isolates Expected <sup>c</sup>	<i>n</i> MRSA among Observed Isolates	Percent MRSA among Observed Isolates
1	Austria	t190	190	8	7	18	38.9	11	0.9	10	91
2	Belgium	t740	740	45	6	22	27.3	15	1.0	11	73
3	Belgium	t038	740	45	8	22	36.4	12	0.8	12	100
4	Bulgaria	t030	12	239	4	8	50.0	10	0.4	9	90
5	Croatia	t041	1	228	7	11	63.6	14	2.2	14	100
6	Czech Republic	t003	45	225	16	20	80.0	34	3.8	34	100
7	Czech Republic	t130	130	—	3	20	15.0	5	0.4	5	100
8	Denmark	t230	728	45	7	14	50.0	8	0.7	0	0
9	France	t008	8	8	22	23	95.7	61	13.6	54	89
10	France	t777	777	5	6	23	26.1	9	0.7	8	89
11	Germany	t003	45	225	10	27	37.0	24	4.7	23	96
12	Germany	t032	32	22	9	27	33.3	29	9.5	29	100
13	Greece	t044	44	80	3	3	100.0	5	0.1	4	80
14	Hungary	t062	Singleton	5	2	10	20.0	6	0.3	6	100
15	Hungary	t216	Singleton	59	7	10	70.0	7	0.5	7	100
16	Ireland	t032	32	22	18	22	81.8	38	8.9	38	100
17	Ireland	t515	32	22	7	22	31.8	8	0.7	8	100
18	Italy	t041	1	228	13	19	68.4	23	3.7	23	100
19	Italy	t001	1	228	8	19	42.1	9	1.5	9	100
20	Latvia	t435	435	427	4	11	36.4	8	0.2	8	100
21	Latvia	t425	425	368	3	11	27.3	5	0.1	5	100
22	Poland	t037	12	239	11	23	47.8	21	2.2	14	67
23	Poland	t127	127	1	6	23	26.1	17	4.0	17	100
24	Romania	t030	12	239	3	10	30.0	6	0.3	6	100
25	Spain	t067	2	5 & 125	18	21	85.7	52	4.4	43	81
26	Spain	t002	2	5	15	21	71.4	28	10.9	14	50
27	United Kingdom	t032	32	22	12	15	80.0	39	6.9	27	96
Total	—	—	—	—	235	—	—	504	83.4	438	87

<sup>a</sup>*spa* complexes group *spa* types that differ by only a single evolutionary event (single indel or nucleotide polymorphism) into the same complex.

<sup>b</sup>As determined by SRLs.

<sup>c</sup>Average number of isolates with this *spa* type expected in country after 10,000 simulations on the basis of European-wide cumulative frequency.

doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t005

commonly associated with skin and soft tissue infections and are rarely found in blood stream infections [31] from which the majority of the sample isolates were drawn. Livestock-associated *spa* types belonging to MLST sequence type ST398 [32] made up 0.4% of the overall sample. However, none were methicillin-resistant indicating a low rate of human systemic infections induced by MRSA variants of this clone despite the increasing interest and concern about such isolates by health authorities.

With the decision to utilize *spa* typing as a common platform to address the geographic abundance of *S. aureus* clones, various potential problems that might affect observations need to be taken into account. First, a single sequence of approximately 280 base-pairs under potential immune selection may be a relatively weak indicator for the genetic background of a genome that is approximately 10,000-times larger, even in a species such as *S. aureus* that is evolving in a predominantly clonal manner. Furthermore, convergent evolution could occur as a result of the high mutability of the repeat region of the *spa* gene used in *spa*

typing [26,33]. Finally, *spa* typing on its own it may not be sufficiently discriminatory to distinguish between MRSA isolates given that only five *spa* types accounted for almost half (48.1%) of all 967 MRSA isolates examined in this survey. The regional clusters found in this study provide a good indication that homoplasmy is not a major problem that hinders the recognition of clonal dissemination on a geographic scale. Moreover, when comparing *agr* type, SCC*mec* type, toxin gene, and antibiotic susceptibility profiles within and between different *spa* types, a significant within-*spa*-type consistency and between-*spa*-type discordance supports the notion that in most cases *spa* typing provides a convenient and valid marker for the major clones and clonal lineages [34].

In order to explore the geographic distribution of different *spa* types, and the genetic and phenotypic detail of isolates in the European sample, the reader is encouraged to explore the purpose-built interactive Web application, SRL-Maps, at <http://www.spatalepidemiology.net/srl-maps/>. This application contains



**Table 6.** Regional clusters of *spa* types.

Regional Cluster Number	<i>spa</i> Type	<i>spa</i> Complex <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>	Window Centre	Window Radius (km)	Countries reporting <i>spa</i> Type within Window	<i>n</i> Isolates Observed	<i>n</i> Isolates Expected <sup>c</sup>	Log Likelihood Ratio	<i>n</i> MRSA among Observed Isolates	Percent MRSA among Observed Isolates
1	t067	2	5 & 125	Alicante, Spain	716	ES, FR	55	4.7	126.9	46	84
2	t041	1	228	Split, Croatia	522	AT, HR, HU, SI, IT	59	10.6	84.76	59	100
3	t032	32	22	Belfast, Northern Ireland (UK)	596	IE, UK	77	15.9	84.74	75	97
4	t003	45	225	Leipzig, Germany	386	CZ, DE, PL	58	10.0	82.26	54	93
5	t008	8	8	Perpignan, France	931	AT, BE, DE, ES, FR, HR, PT, SI	119	45.5	72.96	105	88
6	t740	740	45	Goes, Netherlands	81	BE, NL	15	0.6	50.36	11	73
7	t030	12	239	Pleven, Bulgaria	331	BG, RO	16	0.7	45.24	15	94
8	t037	12	239	Plock, Poland	330	PL	21	2.2	36.02	18	86
9	t038	740	45	Wilrijk, Belgium	92	BE	12	0.8	32.71	12	100
10	t190	190	8	St Pölten, Austria	56	AT	10	0.3	29.63	9	90
11	t001	1	228	Sibenik, Croatia	885	AT, DE, HU, IT, MT	29	10.2	27.55	29	100
12	t435	435	427	Daugavpils, Latvia	189	LV	8	0.2	25.82	0	0
13	t425	239	368	Riga, Latvia	0	LV	5	0.1	22.76	5	100
14	t127	127	1	Inowroclaw, Poland	131	PL	12	0.9	22.65	0	0
15	t032	32	22	Berlin, Germany	128	DE	19	3.2	22.2	19	100
16	t015	15	45	Lomza, Poland	581	CZ, LV, PL	35	11	20.72	7	20
17	t091	91	7	Ried, Austria	771	AT, BE, CZ, DE, FR, HR, HU, IT, NL, PL, SI	71	42.8	20.68	4	6
18	t777	777	5	Laval, France	277	FR	7	0.3	20.61	7	100
19	t081	78	25	Maków Mazowiecki, Poland	0	PL	4	0.0	19.37	3	75
20	t515	32	22	Mullingar, Ireland	196	IE, Northern Ireland (UK)	9	0.7	18.94	9	100
21	t002	2	5, 231	Coimbra, Portugal	484	ES, PT	33	10.6	18.37	20	61
22	t230	728	45	Hilleroed, Denmark	235	DE, DK, SE	11	1.4	17.19	0	0
23	t044	44	80	Nicosia, Cyprus	916	GR, CY	6	0.2	17.09	6	100
24	t2054	8	8	St Mandé, France	226	BE, FR4	5	0.2	16.64	3	60
25	t062	singleton	5	Szolnok, Hungary	145	HU	6	0.3	15.24	6	100
<b>Total</b>	—	—	—	—	368 (mean)	339	702	173.1	—	522	74

Analyses were performed for *spa* types with five or more isolates during the study period.

<sup>a</sup>*spa* complexes group *spa* types that differ by only a single evolutionary event (single indel or nucleotide polymorphism) into the same complex.

<sup>b</sup>As determined by SRLs.

<sup>c</sup>Average number of isolates with this *spa* type expected in window after 10,000 simulations on the basis of European-wide cumulative frequency.

AT, Austria; BE, Belgium; BG, Bulgaria; CY, Cyprus; CZ, Czech Republic; DE, Germany; DK, Denmark; ES, Spain; FI, Finland; FR, France; GR, Greece; HR, Croatia; HU, Hungary; IE, Ireland; IT, Italy; LV, Latvia; MT, Malta; NL, Netherlands; PL, Poland; PT, Portugal; RO, Romania; SE, Sweden; SI, Slovenia; UK, United Kingdom.

doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t006

the public domain data made available to the scientific and public health community by all SRLs that participated in the study. It also illustrates the potential of such a communication platform. The underlying database is fully searchable and the map-based application is a template for the future addition of further epidemiological and biological information. We believe that this approach to spatial epidemiology will become a rich resource for future enquiry into the population dynamics of infectious agents and their evolution.

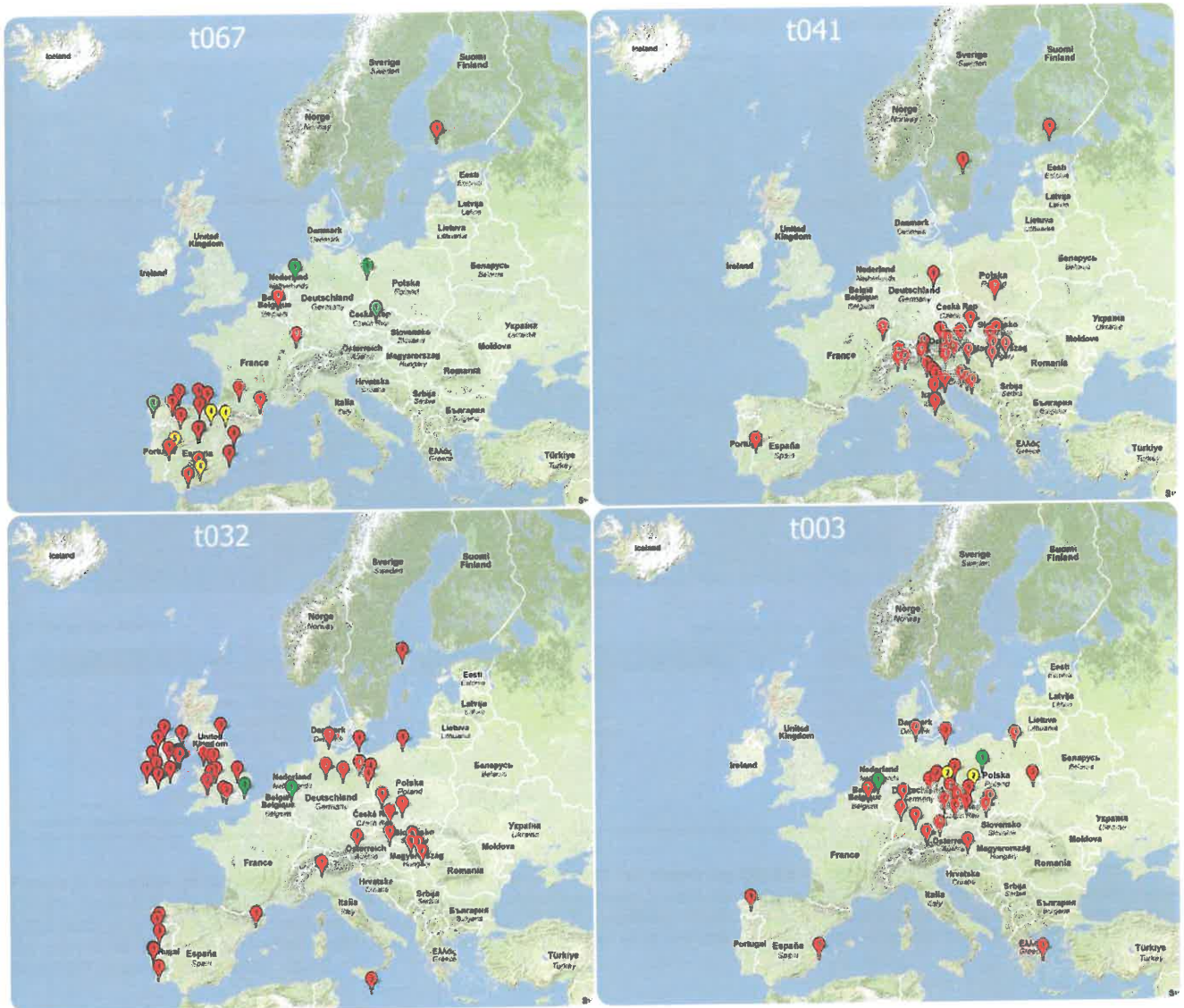
In conclusion we provide evidence that the major MRSA clones in Europe occur predominantly in geographical clusters. This also indicates that MRSA, rather than spreading freely in the community, diffuses through regional health care networks. This important finding suggests that control efforts aimed at interrupting the spread within and between health care institutions may not only

be feasible but ultimately successful and should therefore be strongly encouraged. We also showed that an international surveillance network sharing decentralised typing results on a Web-based platform can provide crucial information for clinicians, diagnostic microbiologists, and infection control teams on the dynamics of *S. aureus* spread, and especially the spread of MRSA isolates, to provide early warning of emerging strains, cross-border spread, and importation by travel.

### Supporting Information

**Text S1** Affiliations and contact information of the *Staphylococcus aureus* Reference Laboratory Working Group members.

Found at: doi:10.1371/journal.pmed.1000215.s001 (0.16 MB DOC)



**Figure 4. Location of laboratories isolating *S. aureus* of *spa* types t067, t041, t032, and t003, which are the four most significant regional clusters on SRL-Maps.** The numbers within each placemark represent the number of isolates and the colours represent resistance phenotypes: red, MRSA; green, MSSA; yellow, a mixture of MRSA and MSSA.  
doi:10.1371/journal.pmed.1000215.g004

**Text S2** Author contributions of the *Staphylococcus aureus* Reference Laboratory Working Group members.  
Found at: doi:10.1371/journal.pmed.1000215.s002 (0.13 MB DOC)

### Acknowledgments

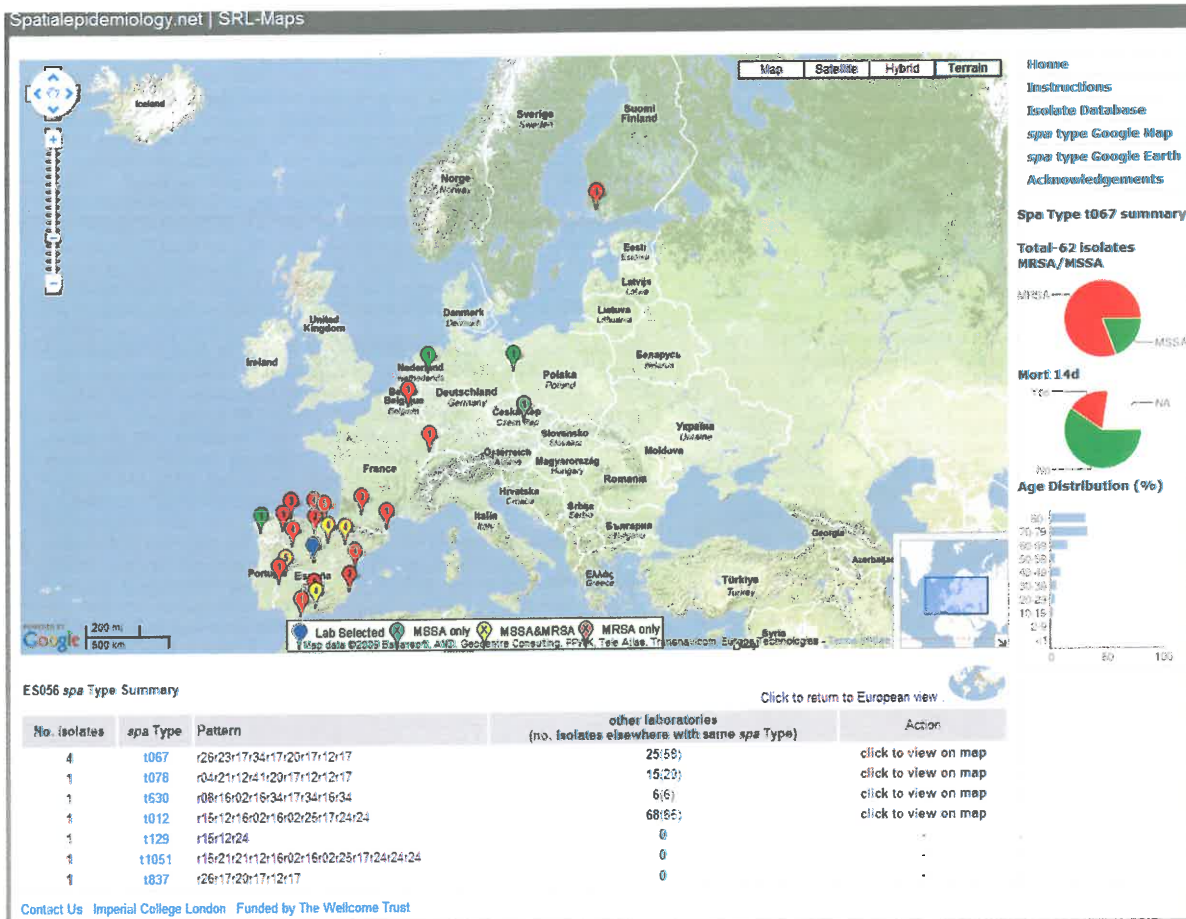
The authors would like to thank Carola Schinkel of RIVM and Tomorrow's Events for the organization of the annual training and planning workshops; and Roel Coutinho, Director of the Center for Infection Control at RIVM, for his encouragement and support of the organizational effort of this initiative.

**The members of the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group are:** Hajo Grundmann, David M Aanensen, Cees C. van den Wijngaard, Artur J. Sabat, Jan Mulwijk, Jos Monen, Adriana Tami, Tjibbe Donker, Helmut Mittermayer, Karina Krziwanek, Sabine Stumvoll, Walter Koller, Olivier Denis, Marc Struelens, Dimitr Nashev, Ana Budimir, Smilja Kalenic, Despo Pieridou-Bagatzouni, Vladislav Jakubu, Helena Zemlickova, Henrik Westh, Marit Sorum, Robert Skov, Frederic Laurent, Jerome Etienne, Birgit Strom-

menger, Wolfgang Witte, Sofia Vourli, Alkis Vatopoulos, Anni Vainio, Jaana Vuopio-Varkila, Miklos Fuzi, Erika Ungvári, Stephan Murchan, Angela Rossney, Edvins Miklasevics, Arta Balode, Gunnsteinn Haraldsson, Karl G. Kristinsson, Monica Monaco, Analisa Pantosti, Michael Borg, Marga van Santen-Verheuevel, Xander Huijsdens, Lillian Marstein, Trond Jacobsen, Gunnar Skov Simonsen, Marta Aires-de-Sousa, Herminia de Lencastre, Agnieszka Luczak-Kadlubowska, Waleria Hryniewicz, Monica Straut, Irina Codita, Maria Perez-Vazquez, Oscar Cuevas, Vesna Cvitkovic Spik, Manica Mueller-Premru, Sara Haegman, Barbro Olsen-Liljequist, Matthew Ellington, Angela Kearns, Robin Köck, Alexander Mellmann, Karsten Becker, Ulrich Vogel, Brian G. Spratt, Dag Harmsen, and Alexander W. Friedrich. The affiliations and contact information for these members are listed in Text S1. The author contributions of these members are listed in Text S2.

### Author Contributions

ICMJE criteria for authorship read and met: HG DMA CCvdW BGS DH AWF. Agree with the manuscript's results and conclusions: HG DMA CCvdW BGS DH AWF. Designed the experiments/the study: HG DH. Analyzed the data: HG CCvdW BGS AWF. Collected data/did



**Figure 5. Location of laboratories isolating *S. aureus* spa type t067 (as shown in Figure 4) viewed using SRL-Maps.** Isolates from LAB ES056 in Madrid, Spain, and the distribution of all other t067 isolates are shown ( $n = 62$ ). Each placemark indicates whether isolates are MSSA (green), MRSA (red), or a mixture (yellow), and the selected laboratory is blue. The numbers of isolates are indicated inside the placemark. The pie charts on the right show the proportion of MRSA/MSSA and all-cause mortality after 14 d, and the bar chart displays patient age distribution. doi:10.1371/journal.pmed.1000215.g005

experiments for the study: HG. Wrote the first draft of the paper: HG. Contributed to the writing of the paper: HG CCvdW BGS DH AWF. Developed the public domain Web-based interactive mapping tool: DMA. Carried out spatial scan statistics: CCvdW. Provided scientific advice, co-developed mapping tools, co-edited manuscript: BGS. Developed the

SpaTyper software, co-organised the capacity building workshops, maintained and serviced the SpaServer: DH. Maintained the SeqNet.org database, co-organised the capacity building workshops, responsible for proficiency testing, performed BURP-clustering: AWF.

**References**

- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520–532.
- Morgan M (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother* 62: 1181–1187.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, et al. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5: 751–762.
- Trilla A, Miro JM (1995) Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections. *J Chemother* 7: S37–S43.
- Gold LC, Barbour SD, Guerrero-Tiro LM, Koopot R, Lewis K, et al. (1996) *Staphylococcus aureus* endocarditis associated with varicella infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 15: 377–379.
- Burgess AM, Gromley CF (1930) Pneumonia in relation to an epidemic of mild influenza with the report of three fulminating cases apparently due to *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 202: 261–264.
- Croze M, Dauwalder O, Dumitrescu O, Badiou C, Gillet Y, et al. (2009) Serum antibodies against Panton-Valentine leukocidin in a normal population and during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Microbiol Infect* 15: 144–8.
- Tacconelli E, Pop-Vicas AE, D'Agata EM (2006) Increased mortality among elderly patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Hosp Infect* 64: 251–256.
- Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, et al. (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185: 3307–3316.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2: 180–189.
- Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandembroucke-Grauls CM, et al. (1996) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 60–64.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, et al. (2003) 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* 41: 5442–5448.
- Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkötter N, Rothgänger J, Karch H, et al. (2006) Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Med* 3: e33. doi:10.1371/journal.pmed.0030033.
- Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, et al. (2006) High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 44: 619–621.
- Friedrich AW, Witte W, Harmsen D, de Lencastre H, Hryniewicz W, et al. (2006) SeqNet.org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. *Euro Surveill* 11(2): pii = 2874. Available: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2874>. Accessed 28 September 2009.

16. Friedrich AW, Mellman A, Harmsen D (2004) *Spa* sequence typing home page. Available: <http://www.seqnet.org/>. Accessed 28 September 2009.
17. Multilocus sequence typing home page. Available: <http://www.mlst.net>. Accessed 28 September 2009.
18. The European Parliament and the Council of the EU (1998) Decision number 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council of 24 September 1998: setting up a network for the epidemiological surveillance and control of communicable diseases in the community. Official J Eur Communities L268/1: Available: [http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/1998/L\\_268/L\\_26819981003en00010006.pdf](http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/1998/L_268/L_26819981003en00010006.pdf). Accessed 28 September 2009.
19. The European Commission of the European Communities (2000) Commission decision of 22 December 1999 on the communicable diseases to be progressively covered by the community network under decision number 2119/98/EC of the Parliament and of the Council. Official J Eur Communities L 28/50: Available: [http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2000/L\\_028/L\\_02820000203en00500053.pdf](http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2000/L_028/L_02820000203en00500053.pdf). Accessed 28 September 2009.
20. Grundmann H, Hori S, Tanner G (2001) Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol* 39: 4190–4192.
21. Aanensen DM, Spratt BG (2007) Spatialepidemiology.net. Web mapping application for Infectious Disease Epidemiology. Available: <http://www.spatialepidemiology.net>. Accessed 28 September 2009.
22. Kulldorff MA (1997) Spatial scan statistic. *Commun Stat Theory Methods* 26: 1481–96. Available: <http://www.satscan.org/papers/k-cstm1997.pdf>. Accessed 28 September 2009.
23. Abrams AM, Kleinman KP (2007) A SaTScan macro accessory for cartography (SMAC) package implemented with SAS software. *Int J Health Geogr* 6: 6.
24. European Antimicrobial Surveillance System (EARSS) Annual report 2007. Available: [http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007\\_FINAL\\_tcm61-55933.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf). Accessed 28 September 2009.
25. Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, et al. (2009) Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus spa*-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4)-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* 63: 21–31.
26. Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, et al. (2008) Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14130–14135.
27. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7687–7692.
28. Robotham JV, Scarff CA, Jenkins DR, Medley GF (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and the community: model predictions based on the UK situation. *J Hosp Infect* 65(S2): 93–99.
29. Jessen O, Rosendal K, Bülow P, Faber V, Eriksen KR (1969) Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med* 281: 627–635.
30. Lyytikäinen O, Ruotsalainen E, Järvinen A, Valtonen V, Ruutu P (2005) Trends and outcome of nosocomial and community-acquired bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus* in Finland, 1995–2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 399–404.
31. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nübel U (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 60: 1258–1263.
32. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheul MG, Heck ME, et al. (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 26.
33. Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonça R, De Ryck R, et al. (2007) Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol* 45: 127–133.
34. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, et al. (2006) Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44: 2533–2540.