

IZVANBOLNIČKI METICILIN-REZISTENTNI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* – MOLEKULARNA EVOLUCIJA, KARAKTERISTIKE I ZNAČENJE

COMMUNITY-ASSOCIATED METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
– MOLECULAR EVOLUTION, CHARACTERISTICS AND SIGNIFICANCE

ANA BUDIMIR, SMILJA KALENIĆ*

Deskriptori: *Staphylococcus aureus* – genetika, učinci lijeka, izolacija; Izvanbolničke infekcije – mikrobiologija, dijagnoza, epidemiologija; Stafilokokne infekcije – mikrobiologija, dijagnoza, epidemiologija; Rezistencija na metilicilin – genetika; Bakterijski kromosomi – genetika; Molekularna evolucija

Sažetak. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) važan je medicinski problem s kojim se bolnice suočavaju već desetljećima; njegova pojava u izvanbolničkoj sredini 90-ih godina prošlog stoljeća otvara, međutim, novo poglavlje i u izvanbolničkim infekcijama. Izvanbolnički MRSA razlikuje se od bolničkoga po genotipskim i fenotipskim osobinama. Tipično je za izvanbolničke MRSA da su osjetljivi na većinu nebetalaktamskih antibiotika. Uzrokuju infekcije u mlađih, prethodno zdravih ljudi, a najčešće su uzročnici teških infekcija kože i mekih tkiva, kao i teških, nekrotizirajućih pneumonija. Kromosomska kasetna, koja sadržava gen *mecA* odgovoran za rezistenciju na betalaktamske antibiotike (*SCCmec*), u

* Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Zagreb
(dr. sc. Ana Budimir, dr. med.; prof. dr. sc. Smilja Kalenić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. A. Budimir, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Zagreb, Šalata 2, Zagreb, e-mail: abudimir@kbc-zagreb.hr

Primljeno 23. siječnja 2007., prihvaćeno 20. lipnja 2007.

izvanbolničkih izolata je tipa IV ili V i manja je od SCCmec tipičnih za bolničke izolate (SCCmec I, II i III). Tipično je za veliki dio izvanbolničkih MRSA posjedovanje gena za Panton-Valentinov leukocidin (PVL). U dijagnostici izvanbolničkih MRSA rabe se standardne laboratorijske metode, a u ugroženoj populaciji moguće je primijeniti brze molekularne metode za ciljano liječenje i sprečavanje širenja izvanbolničkih MRSA.

Descriptors: *Staphylococcus aureus* – genetics, drug effects, isolation and purification; Community-acquired infections – microbiology, diagnosis, epidemiology; *Staphylococcus* infections – microbiology, diagnosis, epidemiology; Methicillin resistance – genetics; Chromosomes, bacterial – genetics; Evolution, molecular

Summary. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) presents a significant problem for hospitals worldwide for decades now. Appearance of MRSA strains in the community is becoming a serious public health problem. Community-associated MRSA (CA MRSA) differs from hospital-acquired MRSA (HA MRSA) genotypically and phenotypically. CA MRSA are susceptible to almost all non-beta-lactam antibiotics and they cause severe skin and soft tissue infections, life-threatening necrotizing pneumonia, in previously healthy, younger people. Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) that contains *mecA* gene responsible for resistance to beta-lactam antibiotics is type IV and V in CA MRSA, and significantly smaller than SCCmec types I, II and III, typically present in HA MRSA. Presence of Pantone Valentine leukocidin (PVL) is typical for significant proportion of CA MRSA. Standard laboratory procedures are used for detection of CA MRSA, as well as rapid molecular methods in high-risk populations. Rapid methods are essential for prevention of CA-MRSA spreading in hospitals.

Liječ Vjesn 2007;129:355–363

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) jedan je od najvažnijih i najprilagodljivijih ljudskih patogena. Kolonizira nosni vestibulum u oko 30% zdravih ljudi, do 50% nekih skupina bolesnika (npr. bolesnici na kroničnoj hemodijalizi), a najčešće izaziva infekcije kože, potkožnog tkiva, ali i bakteriemiju, pneumoniju, endokarditis, infekcije kosti i zglobova, infekcije središnjega živčanog sustava i druge infekcije. *S. aureus* postao je rezistentan na sve antibiotike koji su se rabili u liječenju stafilokoknih infekcija. Sredinom pedesetih godina prošlog stoljeća ubrzano se povećao udio izolata rezistentnih na penicilin¹ mehanizmom izlučivanja beta-laktamaze. Penicilin se terapijski primjenjuje od 40-ih godina, a danas je praktički napušten kao lijek izbora za empirijsku terapiju. Kod izolata s poznatim antibiogramom penicilin je još uvijek najbolji izbor za sojeve osjetljive na penicilin.

Rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramin B razvila se putem klasičnih mehanizama: ribosomskom modifikacijom, posredovanom *erm*-genom, i aktivnim efluksom makrolida, posredovanim genima *msrA*.²

Rezistencija na kinolone temelji se na postojanju efluksne pumpe NorA i strukturnim mutacijama na ciljnome mjestu djelovanja kinolona, topoizomerazi IV i DNA girazi.³

Godine 1997. opisani su i izolati koji pokazuju smanjenu osjetljivost,⁴ a 2002. godine i rezistenciju na vankomicin, posredovanu *vanA*-genom.⁵ Do danas su opisana četiri sporadična izolata vankomicin-rezistentnog *S. aureus* (VRSA). Djelotvornost izoksazolilpenicilina (penicilini otporni na djelovanje stafilokokne beta-laktamaze) ugrozio je razvoj meticilinske rezistencije koja uvjetuje rezistenciju *S. aureus* rezistentnih na sve betalaktamske antibiotike.⁶

Meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA)

Stafilokokna kromosomska mec-regija

Gensku podlogu meticilinske rezistencije čini prisutnost *mecA*-gena⁷ koji se nalazi na mobilnom genskom elementu na kromosomu (engl. staphylococcal chromosomal cassette mec, SCCmec).⁷

mecA-gen kodira protein koji veže penicilin (engl. penicillin binding protein, PBP) 2a, veličine 78 kDa, koji je strukturno promijenjen u odnosu na PBP 2 u meticilin-osjetljivih sojeva, zbog čega se na njega ne vežu betalaktamski antibiotici, a posljedica toga je neprekinuta sinteza bakterij-

ske stijenke i rezistencija na betalaktamske antibiotike. Postojanje *mecA*-gena na kromosomu *S. aureus* poznato je već od 1975. godine,⁸ a kasnije su određene i sekvencije regulatornih gena *mecI* i *mecRI*, kao i ostatka SCCmec-elementa. SCCmec se nalazi na fiksnome mjestu na kromosomu unutar *orfX*, nepoznate funkcije, ali u neposrednoj blizini područja na kojem prepisivanje počinje, što objašnjava njegovu brzu ekspresiju, vrlo kratko vrijeme nakon prepisivanja.⁹

Prepisivanje *mecA*-gena regulirano je djelovanjem represora, *MecI* i transmembranske signalne molekule, *MecRI*.¹⁰

Gen *mecA*, kao i regulatorni geni *mecI* i *mecRI* nalaze se na mobilnome genskom elementu koji nazivamo stafilokokna kromosomska kasetta *mec* (SCCmec) veličine 2,1 kb. SCCmec u sebi nosi gene za antibiotsku rezistenciju i nema, koliko je poznato, gena za čimbenike virulencije.¹¹ Do sada je poznato pet SCCmec-tipova veličine od 20,9 do 66,9 kb i nekoliko podtipova.^{11,12} SCCmec-tip definiraju različite kombinacije *mecA*-kompleksa i gena *ccr* (Cassette Chromosome Recombinase).

SCCmec tip I, (34,3 kb), IV (20,9 do 24,3 kb) i V (28 kb) nose u sebi isključivo gene za kodiranje rezistencije na betalaktamske antibiotike, iako su MRSA-izolati SCCmec tipa I gotovo uvijek multirezistentni. Pretpostavlja se da su geni rezistencije na druge antibiotike smješteni drugdje na kromosomu. SCCmec-tipovi II i III (53,0 kb i 66,9 kb) kodiraju i gene rezistencije na druge antibiotike, koji se nalaze na integriranim plazmidima (pUB110, pL258 i pT181) i transpozonom (Tn554).

Plazmid pUB110 ima gen *ant(4')* koji kodira rezistenciju na kanamicin, tobramicin i bleomicin, na pL258 se nalaze geni koji kodiraju beta-laktamaze i rezistenciju na teške metale. Plazmid pT181 kodira tetraciklinsku rezistenciju, dok transpozon Tn554 sadržava *ermA*-gen zbog kojeg nastaje inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramin (MLS).^{9,11,12} SCCmec također sadržava u sebi insercijske sekvencije, kao što je IS431.¹³

U ekspresiji rezistencije na meticilin sudjeluju i geni *fem* (engl. factor essential for the expression of methicillin resistance) i *aux* (engl. auxilliary). Najvažnije mjesto među njima zauzima *fem AB* čija inaktivacija djeluje na smanjenje ekspresije *mecA*-gena.¹⁴

Osim MRSA-sojeva, koji su definirani prisutnošću *mecA*-gena, postoje izolati koji pokazuju smanjenu osjetlji-

vost na semisintetske penicilinske antibiotike zbog hiperprodukcije β -laktamaza.¹⁵ Testom disk-difuzije ti se sojevi ne mogu razlikovati od MRSA. Minimalne inhibitorne koncentracije oksacilina za takve sojeve nikad nisu veće od 12,5 mg/L, stoga se nazivaju granično rezistentnima (engl. borderline oxacillin resistant *S. aureus*, skraćeno BORSA).¹⁶

Podrijetlo *mecA* i *SCCmec*-gena

Osim *S. aureus*, i koagulaza-negativni¹⁷ stafilokoki mogu sadržavati *SCCmec*. Spekulira se da je *SCCmec* dospio u *S. aureus* horizontalnim transferom iz koagulaza-negativnih stafilokoka.¹⁸ Najveću homolognost s *mecA*-genom nalazimo u genskom elementu životinjske komenzalne bakterije *Staphylococcus sciuri*¹⁹ koja posjeduje genski element što kodira PBP koji ima 87,8% homologije s PBP 2a. Izolati *S. sciuri* uglavnom su osjetljivi na meticilin, ali rastom u mediju u kojem se nalazi meticilin postaju rezistentni na meticilin, bilo da je riječ o povećanoj transkripciji *mecA*-homologa ili točkastoj mutaciji promotora.²⁰

Postoje izvještaji koji govore u prilog *in vivo* transferu *SCCmec* kromosomskog dijela između izogenih MSSA i MRSA-izolata.²¹

Zabilježen je i *in vivo* transfer *SCCmec* u novorođenčeta u Nizozemskoj. Nakon izolacije MSSA u istog je djeteta nađen izogeni MRSA čiji je *mecA*-gen bio identičan *mecA*-genu iz *Staphylococcus epidermidis* izoliranog od istog bolesnika.²²

Epidemiologija *Staphylococcus aureus* rezistentnih na meticilin (MRSA)

Staphylococcus aureus rezistentan na meticilin prvi put se pojavio među bolničkim izolatima 1961. godine²³ kao izolat iz krvi. Prvi MRSA-izolat, podrijetlom iz 1961. godine iz Velike Britanije imao je *SCCmec* I i tipični je predstavnik arhaičnog klona koji se proširio svijetom u šezdesetim godinama. Meticilin, izvornog naziva celbenin, uveden je u terapiju u Europi 1959.–1960. godine. Iako se meticilin više ne upotrebljava u terapiji stafilokoknih infekcija, akronim MRSA je ostao, a odnosi se na *Staphylococcus aureus* koji je rezistentan na sve beta-laktamske antibiotike, uključujući cefalosporine i karbapeneme. Prva epidemija MRSA opisana je 1963. godine.²⁴

Od šezdesetih godina MRSA-sojevi su se postupno proširili po većini bolnica diljem svijeta. Sedamdesetih godina zabilježena je pojava MRSA-izolata u SAD-u, kao i u Japanu i Australiji. Godine 1982. MRSA *SCCmec* tipa II otkriven je u Japanu. I njujorško/japanski klon, kojemu pripada, također se proširio, nakon čega slijedi izolacija MRSA-soja *SCCmec* tipa III na Novom Zelandu. Prvi MRSA-izolati *SCCmec* tipa IV pojavili su se u devedesetim godinama prošlog stoljeća u SAD-u. U Australiji je 2000. pronađen prvi izolat *SCCmec* tipa V.²⁵

Danas je MRSA jedan od najčešćih uzročnika bakterijskih nozokomijalnih infekcija, uzrokujući 40–70% infekcija *Staphylococcus aureus* u jedinicama intenzivne njege.²⁶ U Hrvatskoj je prvo izvješće o značenju MRSA-sojeva objavljeno 1997. godine.²⁷

Podaci o prevalenciji MRSA-izolata razlikuju se u raznim dijelovima svijeta, kao i među bolnicama i iznose od 0,6% u Norveškoj do 66,8% u Japanu, što je prikazano na tablici 1.

U Hrvatskoj je 2005. godine postotak MRSA među izolatima *S. aureus* iznosio 19,98%.²⁸

Tablica 1. Prevalencija MRSA među stafilokoknim izolatima iz hemokultura

Table 1. Prevalence of MRSA in blood culture staphylococcal isolates

Država Country	Norveška Norway	Hrvatska Croatia	Rumunjska Romania	SAD USA	Japan
% MRSA iz krvi	0,61	37,61	61,41	25,32	66,82

Legenda/Legend:

¹ podaci dobiveni iz EARSSS interaktivne baze na www.earss.com

/data from EARSSS interactive base at www.earss.com

² podaci dobiveni iz SENTRY studije²⁶

/data from sentry study

Staphylococcus aureus rezistentan na meticilin već se dugi niz godina povezuje s boravkom u bolnici, domovima za starije i nemoćne i sličnim institucijama i tek se od 90-ih godina pojavljuje pojam »izvanbolnički MRSA«, s nizom osobina koje ga razlikuju od već otprije poznatih, bolničkih MRSA. Bolnički MRSA su uglavnom multirezistentni, pa je izbor antibiotika za liječenje infekcija izazvanih bolničkim MRSA sužen na vankomicin i linezolid, nadalje, bolnički MRSA uglavnom izazivaju teže infekcije u bolesnika koji su na neki način predisponirani: oslabljen imunostni sustav, dugotrajna hospitalizacija, dugotrajna primjena antimikrobnih lijekova, progresija osnovne bolesti i slično. Infekciji MRSA-sojevima u bolničkim uvjetima obično prethodi kolonizacija različita trajanja. Svega nekoliko epidemijskih MRSA-klonova odgovorno je za veliki postotak infekcija izazvanih ovim uzročnikom.²⁹

Klonska distribucija MRSA

Većina svjetskih izolata *Staphylococcus aureus*, osjetljivih i rezistentnih na meticilin može se svrstati u pet glavnih klonskih kompleksa (engl. Clonal complex ili skraćeno CC): CC5, CC8, CC22, CC36 i CC45.²⁹ Klonski kompleksi su se razvili kao epidemijske linije neovisno jedna o drugoj,³⁰ a zatim, također neovisno, prihvatili *SCCmec*-gen.

Klonski kompleksi predstavljaju izolate koji se višelokusnom sekvencijskom tipizacijom (engl. multilocus sequence typing, MLST) ne razlikuju u više od dva genska lokusa. Svih pet klonskih kompleksa potječe od po jednog izolata određenoga sekvencijskog tipa prema kojemu je kompleks dobio ime, u odnosu na koji se bilježe varijacije u lokusima.

Analiza MRSA-sojeva iz raznih dijelova svijeta pokazala je dominaciju nekoliko klonova: iberijski, arhaični, njujorško/japanski, brazilski, pedijatrijski, berlinski, za koje je usuglašena nova nomenklatura koja obuhvaća sekvencijski tip i tip *SCCmec*-kompleksa koji nalazimo kod tih izolata.

MLST-analiza pokazala je da je jedan od prvih *S. aureus* intermedijarno osjetljivih na vankomicin (engl. vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA) nastao od ST5-MRSA-II, pandemijskog njujorko/japanskog klona.

U istraživanju na 147 zemljopisno udaljenih MRSA-izolata pokazano je da su MRSA-izolati nastali od MSSA koji su barem u 20 navrata prihvatili *SCCmec*-gen. Prihvaćanje *SCCmec*-gena od strane MSSA-izolata četiri je puta češće nego zamjena postojećeg *SCCmec* novim.³¹

Za *SCCmec* tip IV tipično je da se nalazi u dva puta više klonova nego ostali *SCCmec*-tipovi. Tomu je razlog vjerojatno manja veličina kasete u usporedbi s drugim *SCC*-tipovima, što olakšava transfer između stafilokoknih izolata.³²

Izvanbolnički MRSA

Izvanbolnički MRSA se epidemiološki, fenotipski i genotipski razlikuju od bolničkih MRSA. Zajedničko svim izvješćima o infekcijama koje uzrokuje izvanbolnički MRSA

jest: nepovezanost s rizičnim faktorima koji su prisutni u bolesnika inficiranih MRSA-sojevima podrijetlom iz bolnice; nisu rezistentni na nebetalaktamske antibiotike;³³⁻³⁵ često³⁶ se javljaju u nebjelačkoj populaciji (američki Indijanci, stanovnici Aljaske, australski Aboridžini), u beskućnika, siromašnih, zatvorenika i sportaša.³⁷ Osobito značenje tih sojeva je u tome što su virulentniji od bolničkih MRSA, brzina rasta im je veća i brže se šire među bolesnicima zbog brže prilagodbe na domaćina.³⁸

Izvanbolnički MRSA javljaju se u značajno mlađoj dobnoj skupini nego bolnički (srednja dob je 23 godine prema Seyboldu i sur.,³⁹ odnosno 32 prema Aramburu i sur.⁴⁰ i pojavljuje se u relativno velikom postotku u pedijatrijskih bolesnika u SAD-u.^{41,42} Infekcije koje izvanbolnički MRSA uzrokuju obično su teške kožne infekcije (celulitis, nekrotizirajući fasciitis) i nekrotizirajuće pneumonije.³³

Izvanbolničke MRSA-izolate karakterizira posjedovanje SCCmec tipa IV i V^{9,12} kod kojih su SCCmec-kasete manje nego kod bolničkih SCCmec tipova I, II i III. Manja količina genskog materijala, veća virulencija, brži rast u odnosu na bolničke MRSA,⁴³ kao i bolja prilagodljivost domaćinu, čine izvanbolničke MRSA iznimno važnima.

Opisani su i bolnički MRSA-sojevi SCCmec tipa IV, tako da taj podatak nije dovoljan da bi se soj smatrao izvanbolnički MRSA-sojem. Stoga se različitim definicijama pokušalo jasno odijeliti izvanbolničke MRSA od bolničkih MRSA sojeva.⁴⁴

Karakteristika koja se često veže uz izvanbolničke MRSA jest posjedovanje gena koji kodira Panton-Valentineov leukocidin (PVL), iako ima izvještaja o dokazanim izolatima izvanbolničkih MRSA koji su multirezistentni, imaju SCCmec IV i nemaju PVL.⁴⁵ PVL je toksin specifičan za *S. aureus*, kodiran je dvama genima, *lukF-PV* i *lukS-PV*. Važan je u infekcijama kože i mekih tkiva, kao i teškoj nekrotizirajućoj pneumoniji.^{46,47} Vandenesch i suradnici su u svom istraživanju našli značajnu povezanost između tipa IV SCCmec i PVL u izvanbolničkih MRSA predloživši PVL kao genski marker za izvanbolnički MRSA. Slične su rezultate dobili i autori iz SAD-a,⁴⁸ ali grupa autora iz Australije nije našla povezanost izvanbolničkih MRSA SCCmec tipa IV s PVL.⁴⁹

Sojevi *Staphylococcus aureus* rezistentni na meticilin pojavili su se u izvanbolničkoj populaciji bolesnika u novije vrijeme u mnogim krajevima svijeta.

U početku, sve do 1980. godine slučajevi izvanbolničkih infekcija izazvanih MRSA-sojevima mogli su se povezati s nedavnom hospitalizacijom, kroničnom bolesti, čestim posjetima bolnici i bliskim kontaktom s hospitaliziranom osobom ili zdravstvenim radnikom; neki od takvih bolesnika boravili su određeno vrijeme u ustanovama za smještaj i njegu starijih i nemoćnih, okružju u kojem je također povećana mogućnost pojave bolničkih MRSA-sojeva. Međutim, nakon izvješća iz SAD-a, iz 1980. i 1981. godine o izvanbolničkim stafilokoknim infekcijama čiji su uzročnici rezistentni na meticilin^{50,51} počinje se razmatrati mogućnost postojanja rezervoara MRSA i u izvanbolničkom okružju. Prvi slučajevi izvanbolničkih MRSA-infekcija odnosili su se na intravenske ovisnike o drogama koji su rabili istu iglu i na taj se način međusobno inficirali. Prvi izvanbolnički MRSA-izolat u Australiji opisan je 1993. godine.⁵²

Godine 1998. u SAD-u je istraživana prisutnost izvanbolničkih MRSA-izolata u djece koja su se javljala liječniku u ambulante zbog drugih razloga, i nađena je incidencija od 3% u jednoj i 24% u drugoj dječjoj bolnici. Izolati su bili osjetljivi na nebetalaktamske antibiotike a više od 40%

djece nije imalo direktne ili indirektne povezanosti s bolničkim ustanovama tijekom 2 godine prije istraživanja.⁵³ Također je primijećeno da se broj djece primljene u bolnicu s infekcijom uzrokovanom izvanbolničkim MRSA-sojem tijekom razdoblja od 1990. do 1997. godine povećao 25 puta.^{42,54}

Godine 1999. četvero djece iz Minesote i sjeverne Dakote umrlo je nakon teških infekcija uzrokovanih izvanbolničkim MRSA.⁵⁵

U Europi se prva izvješća o izvanbolničkim MRSA spominju 2001. godine.⁴⁴

Analiza izvanbolničkih i bolničkih MRSA metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) pokazale su u početku da su MRSA-sojevi bili genetski slični,⁵⁶ dok su recentniji izvještaji pokazali značajne razlike među izvanbolničkim MRSA-izolatima.^{34,35,57} MLST-analizom utvrđena je veća klonska raznolikost izvanbolničkih MRSA u odnosu na bolničke MRSA-izolate.^{29,43}

Izvanbolnički MRSA koji su istraživani diljem svijeta različitih su MLST i PFGE-profila. Izvanbolnički MRSA MLST profili grupiraju se oko ST30 u Australiji i Južnoj Americi, ST80 u Europi, a ST1, 8 i 59 u izolatima iz SAD-a.^{46,58} Prisutnost ST 80, SCCmec IV, PVL-pozitivnih izvanbolničkih MRSA-izolata opisana je i u Hrvatskoj.⁵⁹ Iako, tipično za izvanbolničke MRSA, imaju SCCmec IV, izolati s genskim značajkama ST80 uglavnom imaju SCCmec podtip IVc, a izolati ST1, SCCmec podtip IVa.⁶⁰

Karakteristika je europskih izolata i posjedovanje gena *farI*, koji kodira rezistenciju na fucidinsku kiselinu.^{60,61}

Izvanbolnički MRSA sa SCCmec tipom V nađeni su u Australiji, u ST5, 8, 45, 59, 573 i 577, na Tajvanu u ST59, u Finskoj u ST8 i 27, u Urugvaju u ST45, Singapuru u ST1, 7, 8, 45, 59, 88, 188, 524 i 573, Francuskoj u ST377 i na Kosovu u ST152.

Osjetljivost na eritromicin varira od 10 do 100%,⁶² osjetljivost na klindamicin iznosi od 80 do 90%, većina izvanbolničkih MRSA osjetljiva je na ciprofloksacin, 95% izolata osjetljivo je na sulfametoksazol-trimetoprim.⁶²

Prilikom definiranja izvanbolničkih MRSA postoji nekoliko problema, bilo da se radi o epidemiološkoj definiciji ili genetskoj definiciji izvanbolničkih MRSA.

Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Center for disease control and prevention, CDC) iz Atlante, SAD, definira izvanbolničke MRSA kao sojeve izolirane u bolesnika koji nisu hospitalizirani, ili u hospitaliziranih bolesnika unutar 48 sati od prijma u bolnicu. Nadalje, po definiciji se isključuju izolati u bolesnika koji su imali prethodno dokumentiranu MRSA-kolonizaciju, boravak u bolnici unatrag godinu dana, koji borave u ustanovi kroničnog tipa, dijaliziraju se ili su bili operirani unutar godine dana. Po definiciji se također ne uključuju izolati bolesnika koji imaju trajni kateter ili pomagalo koje narušava integritet kože.⁶³

Ako se ne provede molekularna analiza sojeva, određen broj izvanbolničkih izolata može se proglasiti bolničkim a obrnuto, jer je moguće da, koristeći se epidemiološkim definicijama, bolesnik koji boravi u bolnici dulje od 48 sati, ako je koloniziran izvanbolničkim MRSA, dobije infekciju tim sojem i, obrnuto, bolesnik može biti inficiran bolničkim MRSA-sojem kojim ga je kolonizirao netko iz kućanstva, okoline, tko je bio hospitaliziran prije više godina i bio dugotrajno koloniziran bolničkim MRSA-sojem.

SCCmec tip IV u nekim zemljama^{64,65} dominantan je tip bolničkih MRSA koji se nalazi i u izvanbolničkoj populaciji bez rizičnih faktora za bolničke MRSA tako da se smatra da

je smjer širenja bio iz zajednice u bolnice,⁶⁶ a ne obrnuto. SCCmec tip IV tipičan je bolnički izolat i u Velikoj Britaniji,⁶⁷ gdje je poznat pod nazivom EMRSA-15, a i kao pedijatrijski klon u bolnicama diljem svijeta.⁶⁸

Raširenost izvanbolničkih MRSA

O raširenosti bolničkih MRSA-sojeva imamo mnoštvo podataka. Incidencija MRSA u bolnicama služi kao indikator uspješnosti provođenja programa kontrole bolničkih infekcija. Kao što je navedeno u uvodu, učestalost bolničkih MRSA značajno varira u svijetu. U zapadnoeuropskim zemljama koje imaju nisku incidenciju i prevalenciju MRSA uglavnom se primjenjuju stroge mjere kontrole širenja MRSA koje uključuju probir bolesnika na MRSA prilikom prijma u bolnicu, svih ili bolesnika za koje se procijeni da imaju rizične faktore (premještanje iz druge ustanove, boravak u inozemstvu), takozvana strategija »traži i uništi«.⁶⁹ Upravo iz zapadnoeuropskih zemalja dolaze prva izvješća o izvanbolničkim MRSA-sojevima u Europi gdje se, s obzirom na to da je prevalencija od 0,03 do 1,5%⁶⁹ i da se izvanbolnički MRSA uspješno širi u zajednici, ali i u bolničkim uvjetima, tek očekuju ozbiljniji problemi. Zbog komparativnih prednosti pred bolničkim MRSA, moguća je kroz neko vrijeme i potpuna dominacija izvanbolničkih MRSA u bolničkoj sredini. Dominacija izvanbolničkih MRSA i u bolničkoj sredini dovest će do određenih promjena u epidemiologiji: veći broj ljudi biti će podložan MRSA-infekcijama zbog osobine izvanbolničkih MRSA da izazvaju infekcije i u prethodno zdravih ljudi, povećanje prevalencije PVL-pozitivnih MRSA rezultirat će većom virulencijom bolničkih MRSA, a opstanak u sredini s velikim antibiotskim pritiskom dovest će do širenja izolata MRSA koji su podrijetlom izvanbolnički.⁷⁰

U nekim zemljama, npr. u Norveškoj, u bolnicama je najčešći MRSA SCCmec tipa IV čija je SCCmec-kaseta najmanja i horizontalnim transferom relativno brzo postaje dio genoma MSSA, ali i MRSA-izolata, a zbog svoga bržeg rasta i prilagodljivosti (engl. fitness) uspijeva se brzo širiti među bolesnicima. U SAD-u je u tijeku prava epidemija izvanbolničkih MRSA. 70% infekcija kože i mekih tkiva uzrokuje izvanbolnički MRSA, i to PFGE tip USA -300, odnosno ST tip 8 i USA -400, ST tipa 1. U Australiji se prevalencija izvanbolničkih MRSA povećala s 4,7% u 2000. na 7,3% u 2004. godini.⁷¹

U Hrvatskoj su opisani samo sporadični izvanbolnički PVL-pozitivni MRSA SCCmec IV izolati.⁵⁹

Dva su zemljopisno odijeljena »klona« izvanbolničkih MRSA, jedan je pandemijski, rasprostranjen u svijetu (ST30), a ostali su specifični za određene kontinente (ST1, ST8 i ST80). Pandemijski tip posjeduje gen za sijaloproteinski koštani adhezin, *bbp*, koji se povezuje s osteomijelitisom, a i gen za kolagenski adhezin, *cna*, koji, za razliku od *bbp*, možemo naći i u nepandemijskim tipovima.⁷²

Podrijetlo izvanbolničkih MRSA

Nije potpuno razjašnjeno je li SCCmec-element izvanbolničkih MRSA dospio horizontalnim transferom u MSSA izolate²¹ ili su izvanbolnički MRSA nastali od bolničkih sojeva, te su, nakon što su dospjeli u izvanbolničku sredinu, u sredinu oslobođenu antibiotskog pritiska, izgubili ostale gene rezistencije.⁷³

U novijoj literaturi objavljeno je da bolnički i izvanbolnički MRSA imaju slično podrijetlo. Dokazano je da se isti klon, penicilin-rezistentni fagotip 80/81, koji je harao

svijetom 1950-ih, nastavio širiti u bolnicama i u izvanbolničkoj sredini, a nakon uvođenja semisintetskih penicilina bio je eradiciran. Ponovo se javlja kao ST30 MSSA i PVL je pozitivan. Ovaj klon se ponovno proširio u razdoblju do 1990. godine, prihvatio SCCmec-kasetu i dominantan je izvanbolnički MRSA u Australiji. ST30 je također prihvatio i SCCmec tip II i postupno, uz određene mutacije postao ST36-MRSA-II, pandemijski EMRSA-16.⁷⁴

Nadalje, tri SCCmec-elementa koja sadržavaju gene koji kodiraju biosintetičke enzime za kapsularne polisaharide opisana su u MSSA, *S. epidermidis* i *S. hominis*. Ovi elementi imaju mnoge zajedničke karakteristike sa SCCmec, uključujući i regulatorne gene i insercijske sekvence, ali im nedostaje *mecA* gen. Zanimljivo je da su sekvence u L-C-regiji SCCmec tipa IV identične regiji pronađenoj kod *S. epidermidis*, što sve upućuje na ekstenzivni horizontalni transfer gena između stafilokoknih vrsta.²⁵

Zanimljiva je činjenica da je SCCmec tip IV element bio dominantan u izolatima *Staphylococcus epidermidis* i 1970-ih godina, a da je rijetka pojava među *S. aureusom* prije 1990. godine.^{25,75}

Jedan od pristupa istraživanju podrijetla MRSA je paralelna analiza genoma *S. aureusa* i ostalih stafilokoknih vrsta da bi se utvrdila sličnost gena rezistencije i otkrio mehanizam i smjer genskog transfera.⁷⁶ Nađena je dobra konzerviranost nukleotidnih sekvenci *ccrAB*-alela na istome zemljopisnom području a među različitim stafilokoknim vrstama, *S. warneri* i *S. epidermidis* zajedno sa *S. aureusom*. Malo se zna o strukturi SCCmec-kompleksa u koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS),¹⁷ većina studija koncentrirana je na MRSA, ali postoje snažni argumenti koji govore o KNS kao izvoru gena rezistencije za *S. aureus*, a i druge gram-pozitivne mikroorganizme.⁷⁷⁻⁸⁰ Nema jednoznačnih pokazatelja mehanizma i smjera, ni mikroorganizma koji bi bio odgovoran za *mecA*-transfer, ali neki autori sugeriraju da se transfer *mecA* odvio iz KNS u *S. aureus*.⁸¹ Wienders i suradnici izvijestili su o mogućem horizontalnom *in vivo* transferu *mecA* u *S. aureus* uz prisutnost metilicilin-rezistentnog izolata KNS za vrijeme antibiotske terapije, gdje je *de novo* nastao MRSA-soj.²² Postojanje homologa SCCmec-genu kod komenzalne stafilokokne vrste potvrđuje tvrdnju o rezervoaru rezistentnih genskih dijelova kod drugih stafilokoknih vrsta.¹⁸

Smatra se da je horizontalnim transferom SCCmec tipa IV, koji se često može naći među zdravim pojedincima, došlo do konverzije kolonizirajućeg *S. aureusa* u MRSA.⁸²

Vrijedno je spomenuti još jedan potencijalni rezervoar za izvanbolničke MRSA, radi se o prijenosu MRSA sa životinja,⁸³ bilo da je riječ o ljubimcu, psu,⁸⁴ konju, mački ili životinjama u gospodarstvu (svinja), a sumnja postoji na prijenos preko kravljeg mlijeka⁸⁵ ili kontaminiranoga pilećeg mesa.⁸⁶

Algoritam detekcije izvanbolničkog MRSA

S obzirom na činjenicu da se u svijetu broj izvanbolničkih MRSA povećava, u dijagnostičkom i terapijskom pristupu izvanbolničkomu bolesniku sa sumnjom na stafilokoknu infekciju potrebno je uzeti u obzir mogućnost da se radi o MRSA-soju.

Sumnju na izvanbolnički MRSA-soj treba postaviti kad se radi o teško bolesnim mladim ljudima koji su prethodno imali simptome slične gripi, o oboljelima od pneumonije koji imaju simptome hemoptize, visoko su febrilni, leukopenični i hipotenzivni. Takvi simptomi signaliziraju infek-

ciju koja ugrožava život, nekrotizirajuću pneumoniju ili septički šok i mogući letalni ishod.

Značajan način prezentacije infekcija koje uzrokuje izvanbolnički MRSA jesu kožne infekcije, kod kojih se razvijaju apsces, furunkul, karbunkul, bez drenaže infekcije progrediraju u fasciitis, zatim duboke infekcije mekih tkiva, nakon kojih, ako dođe do izlječenja, ostaju deformacije tkiva.

Dobar odabir uzorka za mikrobiološko testiranje (obriška, aspirata rane, iskašljaja ili aspirata traheje u slučaju lokalizirane infekcije te krvi u slučaju sistemske infekcije i u slučaju pneumonije), brza detekcija MRSA u mikrobiološkom laboratoriju, kao i rezultati osjetljivosti na odgovarajuće nebetalaktamske antibiotike pridonijet će odgovarajućem liječenju infekcija i pravodobnom poduzimanju mjera kontrole infekcija s ciljem što manjeg širenja vrlo prilagodljivih izvanbolničkih MRSA-sojeva u ambulantama i bolničkoj sredini. Prilikom obrade bolesnika s infekcijom uzrokovanom izvanbolničkim MRSA potrebno je poduzeti mjere kontaktne izolacije, tj. spriječiti širenje takvih izolata i izbjegavati zajedničke predmete s drugim bolesnicima, kao i kod bolničkih MRSA. Smatra se da je relativno velik broj epidemijskih infekcija izvanbolničkim MRSA izazvan upravo prenošenjem patogena preko predmeta zajedničke upotrebe (sapuni, ručnici, britvice).

Zabilježen je i prijenos izvanbolničkih MRSA u laboratorijske radnike,⁸⁷ a i na liječnika koji je resuscitirao dijete oboljelo od nekrotizirajuće pneumonije izazvane izvanbolničkim MRSA-sojem,⁸⁸ pa je, stoga, potrebno pažljivo postupati pri susretu s ovim prenosivim, sve češće opisivanim patogenom.

Identifikacija *S. aureusa*

Značajke korištene u testovima za identifikaciju su: prisutnost proteina A, vezana koagulaza, slobodna koagulaza ili termostabilna nukleaza. Dodatne, molekularne metode razvijene su u novije vrijeme.

Test slobodne koagulaze je standardni test za identifikaciju *S. aureusa* a rezultat je raspoloživ za 4 ili 24 sata (izolati koji su negativni nakon 4 sata). Neki drugi stafilocoki, npr. *Staphylococcus schleiferi* ili *Staphylococcus intermedius* također su pozitivni, no rijetko ih nalazimo u humanim uzorcima.⁸⁹

Test vezane koagulaze, na predmetnom stakalcu je brz, ali 15% izolata *S. aureus* je negativno te takvi izolati trebaju potvrdu slobodne koagulaze.

Lateks-aglutinacijski testovi za identifikaciju *S. aureusa* najčešće su temeljeni na dokazu proteina A ili vezane koagulaze, pozitivan rezultat testa također pokazuju i izolati *S. lugdunensis* i *S. schleiferi*.

Ispitivanje deoksiribonukleaze (DNA-za) može se iskoristiti kao metoda probira, ali zbog određenog postotka DNA-za-pozitivnih KNS, pozitivni izolati trebaju potvrdu dodatnog testa.⁸⁹

Postoji niz komercijalnih biokemijskih testova i automatiziranih sustava za identifikaciju *S. aureusa*, nedostatak im je visoka cijena i relativna sporost u odnosu na npr. testiranje vezane i slobodne koagulaze.

Molekularni testovi su precizni, nema potrebe za konfirmativnim metodama, većina ih u osnovi sadržava amplifikacijske tehnike. Ciljni geni su im: gen za nukleazu (*nuc*), koagulazu (*coa*), protein A (*spa*), *femA* i *femB*, *Sa442*, 16S rRNA i geni koji kodiraju proteine koji se vežu na fibrinogen.⁹⁰ Zbog visoke cijene molekularnih metoda, njihova se primjena preporučuje samo u određenim slučajevima, u ko-

jima konvencionalne metode daju dvojbene rezultate te kod izražene sumnje na MRSA-infekciju.⁸⁹

Ispitivanje osjetljivosti na metilicilin (oksacilin)

Nakon identifikacije slijedi testiranje osjetljivosti izolata na oksacilin/cefoksitin.

Referentna metoda, »zlatni standard« u određivanju metilicilinske rezistencije je prisutnost *mecA*-gena. Unatoč tomu, u većini rutinskih mikrobioloških laboratorija najčešće se rabe fenotipske metode, disk-difuzija i oksacilinska probirna ploča, a postoje i komercijalni i automatizirani sistemi za detekciju metilicilinske rezistencije.⁸⁹

Kod fenotipskih metoda postoji niz faktora koji utječu na rezultat, kao što su: vrsta antibiotika, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija NaCl. Metilicilin, koji se više ne proizvodi zamijenjen je oksacilinom i, u novije vrijeme, cefoksitinom kao predstavnikom betalaktamskih antibiotika. Cefoksitin, primijenjen u metodi disk-difuzije za detekciju metilicilinske rezistencije pokazao je određenu prednost u nizu studija u odnosu na oksacilin.⁹¹ Još uvijek se, međutim, u određivanju minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) upotrebljava oksacilin jer nema standardiziranih prijelomnih točaka za cefoksitin.⁹¹ U izboru medija i podloga za testiranje osjetljivosti najkonzistentniji nalazi dobivaju se uz uporabu Mueller-Hintonova (MH) medija. Vrijeme inkubacije u metodi disk-difuzije, a i dilucijskim metodama (agarskoj diluciji i diluciji u bujonu), preporučeno za detekciju oksacilinske rezistencije je 24 sata, vrijeme za detekciju rezistencije primjenom cefoksitina je također 24 sata, iako neki autori sugeriraju da nema razlike u osjetljivosti i specifičnosti ako se inkubacija skрати na 18 sati.⁹²

Primjenom E-testa (AB Biodisk, Solna, Švedska) oksacilina i cefoksitina dobivaju se vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) usporedive s MIK dobivenim drugim metodama i difuzijskim metodama, uz upotrebu MH agara s 2% NaCl, standardnim inokulumom kao i za disk-difuziju (0,5 McFarland do 1 McFarland) i vremenom inkubacije od 24 ili, za cefoksitin, 18 sati.⁹² Prednost E-testa je jednostavnost primjene, a nedostatak relativno visoka cijena.

Upotreba probirne ploče sa 6 mg/L oksacilina i 4% NaCl također je metoda kojom se može utvrditi metilicilinska rezistencija.

Izolati koji su *mecA*-pozitivni s izrazito heterogenom populacijom mogu biti zamijenjeni izolatima granično rezistentnima na oksacilin (BORSA). Tipično za izolate koji produciraju velike količine beta-laktamaze jest da u disk-difuziji imaju smanjenu zonu inhibicije, za razliku od »pravih« MRSA koji uopće ne pokazuju zonu inhibicije oko testiranja diska.⁸⁹

Metoda kojom se značajno može skratiti vrijeme potrebno za dijagnosticiranje MRSA jest metoda lateks aglutinacije kojom se detektira PBP 2a (BioMerieux, Francuska). Metoda ne zahtijeva posebnu opremu i stručnost kadrova, ekstrakcija antigena je jednostavna, a rezultati pouzdani.⁹³ Dokaz PBP2a izvodi se na čistoj kulturi izoliranog stafilocoka i tako zahtijeva ukupno najmanje oko 24 sata od uzimanja uzorka, rutinski 48 sati, osim ako je riječ o primoizolatu u čistoj kulturi *S. aureusa* na krvnom agaru. Ako postoji mogućnost molekularne dijagnostike, izoliranom se soju može odrediti prisutnost *mecA*-gena, što je također definitivno dokaz MRSA.

Automatizirani sustavi (Vitek-BioMerieux, Microscan-Dade Behring) uglavnom su pouzdani u detekciji metilicilinske rezistencije.⁸⁹

Detekcija MRSA u probirnim (»screening«) uzorcima

Probir MRSA-izolata na krutim podlogama s prethodnim inkubiranjem u tekućem obogaćujućem mediju ili bez njega najčešće je opisan. U tu se svrhu rabe agar s manitolom i NaCl (engl. mannitol salt agar, MSA), oksacilinski probirni agar (engl. oxacillin resistance screening agar, ORSAB), Baird-Parker podloga s ciprofloksacinom (BPC), kao i više vrsta kromogenih agara (MRSA Select, Bio-Rad; CHROM-agar MRSA-BioConnections; MRSA ID, BioMerieux).

Radi povećanja osjetljivosti probira često se za detekciju MRSA-uzoraka koji nisu primarno sterilni provede pre-konočna inkubacija u tekućem hranjivom mediju s antibioticima i nakon toga zasijava na krutu podlogu. U istoj epruveti inkubira se više probirnih uzoraka istodobno, što povećava vjerojatnost otkrivanja kliconoštva, a smanjuje cijenu pretrage. Najčešće korištene tekuće podloge su MH bujon, moždano-srčani bujon (engl. brain-heart infusion broth, BHI), triptonski sojin bujon, Robertsonov hranjivi bujon, a selektivne tvari su obično NaCl i oksacilin ili cefoksitin, a također su opisane tekuće podloge u kojima su inkorporirani indikatori rasta.⁸⁹

Ne postoji medij u kojem bi bilo moguće otkriti svaki MRSA-soj, kombinacijom raspoloživih metoda poželjno bi bilo u svakom laboratoriju podići osjetljivost i brzinu detekcije MRSA iz probirnih uzoraka. Novije metode molekularne dijagnostike koje istodobno otkrivaju *mecA*-gen i dio genoma koji je specifičan za *S. aureus* predstavljaju značajan pomak u detekciji MRSA iz probirnih uzoraka.

Novije PCR-metode ne koriste amplifikaciju *mecA* kao dokaz MRSA, jer postoji mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata amplifikacijom *mecA*-gena koagulaza-negativnih stafilokoka koji mogu kontaminirati uzorak. IDI-MRSA (Infecto Diagnostic, Kanada – BD) i GenoType MRSA Direct (Hain Lifescience, Njemačka), detektiraju dio *orfX*-gena, koji je specifičan za *S. aureus* i susjedni dio SCC*mec* kromosomske regije. Na taj se način jednim PCR-om određuje vrsta i detektira meticilinska rezistencija u nesterilnim uzorcima. Rezultati se dobiju za 2–4 sata.

Mali broj rutinskih laboratorija u Hrvatskoj ima na raspolaganju molekularne metode, pa su one ograničene na velike i referentne centre.

Brza detekcija virulentnih izvanbolničkih MRSA-sojeva važna je i zbog primjene mjera sprečavanja prenošenja infekcija prilikom prijma u bolnicu⁹⁴ bolesnika s izvanbolničkom MRSA-infekcijom i boravka na odjelima s teškim bolesnicima za koje infekcija može imati fatalan učinak. Neki autori sugeriraju probir bolesnika u jedinicama intenzivne njege s ciljem poboljšanja ishoda liječenja.⁹⁵

Liječenje infekcija izazvanih izvanbolničkim MRSA-sojevima

Pri izboru antibiotika za empirijsko liječenje infekcija koje u izvanbolničkih bolesnika uzrokuju stafilokoki potrebno je uzeti u obzir težinu infekcije, prisutnost rizičnih faktora za bolnički MRSA i lokalnu prevalenciju izvanbolničkih MRSA. Vankomicin se smatra lijekom izbora kod teških, za život opasnih infekcija u područjima s velikom prevalencijom izvanbolničkih MRSA, dok se linezolid smatra lijekom drugog izbora u takvim slučajevima.⁹⁶

Nedavno su se pojavile pretpostavke⁹⁷ da bi u slučaju infekcija izazvanih izvanbolničkim MRSA koji proizvode PVL-toksin najefikasniji bili antibiotici koji djeluju na ribosomsku translaciju proteina kao što su linezolid i klindami-

cin, zbog redukcije produkcije toksina; no, prije nego što se primijeni ovaj način liječenja, potrebna je potvrda *in vivo*.

U empirijskoj terapiji lakših infekcija, pri sumnji na stafilokoknog uzročnika, razumno je i dalje primjenjivati klosacilin ili alternativni antibiotik u slučaju alergije ili intolerancije, ako je veliki broj stafilokoka ipak osjetljiv na beta-laktamske antibiotike.

Nakon što se identificira MRSA kao uzročnik infekcije, terapija se mijenja prema antibiogramu. U slučaju izvanbolničkih MRSA na raspolaganju stoji obično nekoliko anti-stafilokoknih antibiotika, npr. klindamicin (osim u slučajevima inducibilne rezistencije), tetraciklin (doksiciklin) te sulfametoksazol-trimetoprim, koji se pokazao jednako vrijednim kao i vankomicin u liječenju teških MRSA-infekcija intravenskih ovisnika o drogama, a uspješnim se pokazao i u liječenju lakših izvanbolničkih MRSA-infekcija.⁹⁸

LITERATURA

- Jessen O, Rosendal K, Bulow P, Faber V, Eriksen KR. Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med* 1969;281:627–35.
- Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1267–72.
- Fournier B, Hooper DC. Mutation in topoisomerase IV and DNA gyrase of *Staphylococcus aureus*: novel pleiotropic effects on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1662–7.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135–6.
- Center for Disease Control and Prevention. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania, 2002. *JAMA* 2002;288:2116.
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111:1265–73.
- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781–91.
- Sjostrom JE, Lofdahl S, Phillipson L. Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1975;123:905–15.
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003;6:41–52.
- Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 2002;178:165–71.
- Ito T, Katayama Y, Asada K i sur. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323–36.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2637–51.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1955–63.
- Carbon C. MRSA and MRSE: is there an answer? *Clin Microbiol Infect* 2000;6, Suppl 2:17–22.
- Massida O, Montanari MP, P.E.V. Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1992 223–7.
- Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T. Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1992;36:445–53.
- Ma XX, Galiana A, Pedreira W i sur. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 2005;11:973–6.
- Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *bbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1823–36.
- Couto I, Wu SW, Tomasz A, Lencastre HD i sur. Development of methicillin-resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by

- transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *J Bacteriol* 2003;185:645–53.
20. Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001;183:2417–24.
 21. Mongkolrattanothai K, Boyle S, Kahana MD, Daum RS. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis* 2003;37:1050–8.
 22. Wielders CL, Vriens MR, Bresse S *i sur.* In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet* 2001;357:1674–5.
 23. Jevons MP. »Celbenin«-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961;1:124–25.
 24. Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br Med J* 1963;1:308–11.
 25. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3574–9.
 26. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ *i sur.* 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(Suppl 2):S114–32.
 27. Tamić A. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), prediktor kraja antibiotiske ere-dijagnoza, epidemiologija, terapija i sprečavanje širenja. *Liječ Vjesn* 1997;119:166–71.
 28. Tamić-Andrašević A, Tamić T, Kalenić S, Janković V, Payerl Pal M. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2005. godini. Hrvatska akademija medicinskih znanosti, Kolegij javnog zdravstva, Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj; Zagreb 2006.
 29. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7687–92.
 30. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;2:180–9.
 31. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3926–34.
 32. Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:92–7.
 33. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K *i sur.* Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003;290:2976–84.
 34. Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS *i sur.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* 2001;286:1201–5.
 35. Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ *i sur.* Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clin Infect Dis* 2001;33:990–6.
 36. Udo EE, Al-Sweih N, Noronha B. Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:262–9.
 37. Muller-Premru M, Strommenger B, Alikadic N *i sur.* New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:848–50.
 38. Etienne J. Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection? *Clin Infect Dis* 2005;41:591–3.
 39. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG *i sur.* Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis* 2006;42:647–56.
 40. Aramburu C, Harbarth S, Liassine N *i sur.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Switzerland: first surveillance report. *Euro Surveill* 2006;11:42–3.
 41. Center for Disease Control and Prevention. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Among Healthy Newborns-Chicago and Los Angeles County. *Morb Mortal Wkly Rep* 2004;55:329–32.
 42. Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J *i sur.* Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001–2003. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:343–8.
 43. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD *i sur.* Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002;40:4289–94.
 44. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 2003;36:131–9.
 45. Mulvey MR, MacDougall L, Cholin B *i sur.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005;11:844–50.
 46. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC *i sur.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978–84.
 47. Obed A, Schnitzbauer AA, Bein T, Lehn N, Linde HJ, Schlitt HJ. Fatal pneumonia caused by Panton-Valentine Leucocidine-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (PVL-MRSA) transmitted from a healthy donor in living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2006;81:121–4.
 48. Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy SV *i sur.* Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004;42:3752–7.
 49. O'Brien FG, Lim TT, Chong FN *i sur.* Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol* 2004;42:3185–90.
 50. Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med* 1982;97:325–9.
 51. Levine DP, Cushing RD, Jui J, Brown WJ. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis in the Detroit Medical Center. *Ann Intern Med* 1982;97:330–8.
 52. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993;25:97–108.
 53. Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra S, Daum RS. Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:410–4.
 54. Purcell K, Fergie J. Epidemic of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a 14-year study at Driscoll Children's Hospital. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159:980–5.
 55. Center for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997–1999. *JAMA* 1999;282:1123–5.
 56. Johnson JG, Bhan A, Pawlak J *i sur.* Changing epidemiology of community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:431–5.
 57. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC *i sur.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 1998;279:593–8.
 58. Chambers HF. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. *N Engl J Med* 2005;352:1485–7.
 59. Krzyston-Russjan J, Tamić-Andrašević A, Bukovski S, Sabat A, Hryniewicz W. First community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:697–8.
 60. Witte W, Braulke C, Cuny C *i sur.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:1–5.
 61. Dufour P, Gillet Y, Bes M *i sur.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002;35:819–24.
 62. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revised: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003;1.
 63. Community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). 2005.
 64. Dancer SJ, Coyne M, Speekenbrink A, Samavedam S, Kennedy J, Wallace PG. MRSA acquisition in an intensive care unit. *Am J Infect Control* 2006;34:10–7.
 65. Hanssen AM, Fossum A, Mikalsen J, Halvorsen DS, Bukholm G, Sollid JU. Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. *J Clin Microbiol* 2005;43:2118–24.
 66. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. *J Clin Microbiol* 2004;42:3077–82.
 67. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K *i sur.* A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 2002;186:1344–7.

68. Sanches IS, De Sousa A, Cleto L, Beata de Campos M, de Lencastre H. Tracing the origin of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods. *Microb Drug Resist* 1995;2:319–29.
69. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O i sur. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1627–34.
70. Otter JA, French GL. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. <http://infection.thelancet.com> 2006;6:753–5.
71. Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC i sur. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust* 2006;17:374–5.
72. Otsuka T, Saito K, Dohmae S i sur. Key adhesin gene in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;4:1234–44.
73. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J Clin Microbiol* 2003;41:3806–15.
74. Robinson DA, Kearns AM, Holmes A i sur. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 2005;365:1256–8.
75. Luong TT, S. O, Bush K, Lee CY. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J Bacteriol* 2002;184:3623–29.
76. Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:285–96.
77. John JF, Grieshop LM, Atkins LM, Platt CG. Widespread colonisation of personnel at a Veterans Affairs medical center by methicillin-resistant, coagulase-negative *Staphylococcus*. *Clin Infect Dis* 1993;17:380–8.
78. Klingenberg C, Glad T, Olsvik O, Flaegstad T. Rapid PCR detection of the methicillin-resistance gene, *mecA*, on the hands of medical and non-medical personnel and healthy children and on surfaces in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 2001;33:494–7.
79. McDonnel RW, Sweeney HM, Cohen SH. Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:151–60.
80. Monsen T, Ronnemark M, Olofsson C, Wistrom J. Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated in blood cultures in relation to antibiotic consumption in hospital wards. *Scand J Infect Dis* 1999;31:399–404.
81. Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:447–54.
82. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486–93.
83. van Duijkeren E, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol* 2004;103:91–7.
84. van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2235–7.
85. Kwon NH, Park KT, Moon JS i sur. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:624–32.
86. Kwon NH, Park KT, Jung WK i sur. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet Microbiol* 2006;117:304–12.
87. Wagenvoort JH, De Brauwier EI, Gronenschild JM, Toenbreker HM, Bonnemayers GP, Bilkert-Mooiman MA. Laboratory-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in two microbiology laboratory technicians. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:470–2.
88. Chalumeau M, Bidet P, Lina G i sur. Transmission of panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* to a physician during resuscitation of a Child. *Clin Infect Dis* 2005;41:29–30.
89. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM i sur. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1000–18.
90. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol* 2001;39:3332–8.
91. Clinical and laboratory standards institute N. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M-100. izd. Vol. 26, No 3. 2006, Wayne, Pennsylvania, USA. 182.
92. Skov R, Smyth R, Larsen AR i sur. Phenotypic detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk-diffusion testing and estest on Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol* 2006;44:4395–9.
93. Budimir A, Plečko V, Presečki Stanko A, Tripković V, Rebrević B, Kalenić S. Brza identifikacija metilicilin-rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Liječ Vjesn* 2003;125:159–60.
94. Becker K, Friedrich A, Lubritz G. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:1434–9.
95. Wilson AP, Hayman S, Cepeda JA, Singer M, Belligan G. Screening for MRSA and GISA in the intensive care unit. *J Hosp Infect* 2006;64:85–6.
96. Bradley SF. *Staphylococcus aureus* pneumonia: emergence of MRSA in the community. *Semin Respir Crit Care Med* 2005;26:643–9.
97. Micek ST, Dunne M, Kollef M. Pleuropulmonary complications of panton-valentine leucocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest* 2005;128:2732–8.
98. Markowitz N, Quinn EL, Saravolatz LD. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Intern Med* 1992;117:390–8.