



Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Profil lekooporności szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z tracheostomią



Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

Kamil Drożdż**, Dorota Ochońska*, Łukasz Ścibik*, Monia Brzychczy - Włoch*

* Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

** Wydział Hodowli i biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie.

Wstęp. U pacjentów z tracheostomią ważnym aspektem nawracających zakażeń bakteryjnych o etiologii *S. aureus* jest towarzyszący temu biofilm tworzący się wskutek stosowania biomateriałów w postaci rurek tracheostomijnych. Formowanie biofilmu przez patogenne gronkowce jest uważane za główny czynnik wirulencji, zabezpieczający przed ukierunkowanym działaniem środków przeciwbakteryjnych, mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz niesprzyjającymi warunkami środowiska. Obecność biofilmów w organizmie człowieka może być niebezpieczne z powodu ich dużej oporności na terapię antybiotykami. Oporność ta może być wynikiem spowolnionej lub niekompletnej penetracji antybiotyku w głąb biofilmu hamowanej przez płaszcz polisacharydowy; interakcji dodatnio naładowanego antybiotyku z ujemnie naładowanym polimerem macierzy biofilmu lub wynikiem nagromadzenia produktów przemiany materii i wyczerpania potrzebnych substratów co może spowodować przemieszczenie się bakterii z podstawnych warstw biofilmu do stanu zahamowanego wzrostu określanego jako zatrzymana animacja (ang. *suspended animation*).

Cel pracy. Celem pracy była ocena profilu lekooporności szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z tracheostomią.

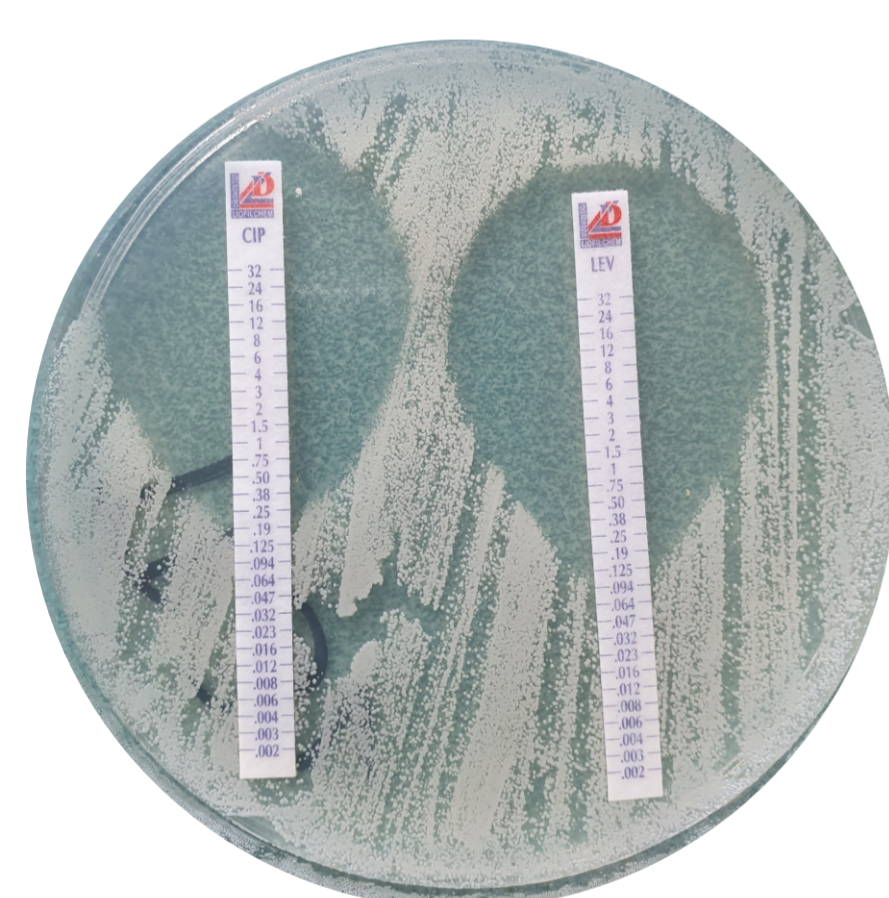
Materiały i metody. Grupę badawczą stanowiły 24 izolaty kliniczne *S. aureus* pochodzące z wymazów z rurek tracheostomijnych (ang. *Tracheostomy Tubes*, TTs) w okresie od czerwca 2018 roku do września 2019 roku od pacjentów z tracheostomią hospitalizowanych w Klinicznym Oddziale Otolaryngologicznym 5 Szpitala Wojskowego z Polikliniką W Krakowie. Diagnostykę mikrobiologiczną przeprowadzono na podstawie posiewów wykonanych na podłożach stałych: Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (Becton Dickinson, BD) oraz podłożu Chapman'a (Mannitol-salt agar, bioMérieux). Badane izolaty identyfikowano rutynowymi metodami diagnostycznymi analizując właściwości fenotypowe oraz cechy biochemiczne (API®Staph). Dodatkowo przynależność gatunkową wyhodowanych szczepów określano z użyciem systemu automatycznego miniAPI (BioMérieux), którą potwierdzano molekularnie przeprowadzając reakcję multiplex PCR (mPCR) z użyciem specyficznych starterów (Rycina 4). Lekooporność badanych *S. aureus* oznaczano zgodnie z najnowszymi zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczeń Lekowrażliwości EUCAST wersja 9.0, 2019-01-01 (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Wrażliwość na następujące grupy leków: penicyliny; cefalosporyny; fluorochinolony; aminoglikozydy; glikopeptydy i lipoglikopeptydy; makrolidy, linkozamidy i streptograminy B; tetracykliny; oksazolidynony oraz inne; określano metodą dyfuzyjno-krażkową Kirby-Bauera (Oxoid) oraz metodą E-testu oznaczając wartość MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) z wykorzystaniem pasków z gradientem stężeń leków (Liofilchem). Jako szczep referencyjny wykorzystano *S. aureus* ATCC 29213. Klasyfikację izolatów do kategorii MDR (ang. *Multi Drug Resistant*), XDR (ang. *Extensively Drug Resistant*) lub PDR (ang. *Pan Drug Resistant*) przeprowadzono zgodnie z zaproponowanymi międzynarodowymi definicjami drobnoustrojów.

Wyniki. Analizowane szczepy MRSA charakteryzowała wyższa oporność na badane antybiotyki niż szczepy MSSA. W obu grupach gronkowców na uwagę zasługuje wysoki odsetek szczepów opornych na benzylopenicylinę (91% dla MRSA, 77% dla MSSA). Ponad 64% badanych szczepów MRSA była oporna na tobramycynę, a 54% na gentamycynę. Spośród szczepów MRSA oporność na erytromycynę, klindamycynę, teikoplaninę, tygecyklinę oraz chloramfenikol wynosiła 45%. Na poszczególne fluorochinolony (ciprofloksacynę, lewofloksacynę, moksifloksacynę, ofloksacynę) i kwas fusydowy opornych było po 36% szczepów MRSA, na ryfampicynę 18%. Nie stwierdzono szczepów MRSA opornych na amikacynę, linezolid, wankomycynę oraz trimetoprim z sulfametoksazolem.

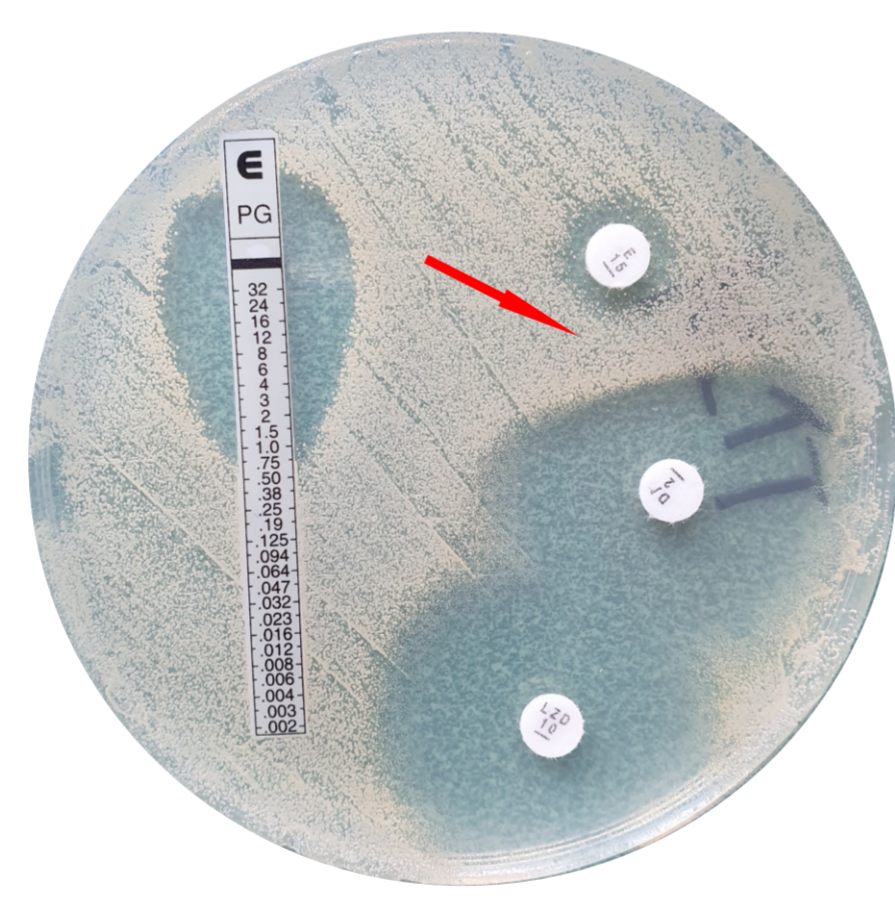
77% badanych szczepów MSSA było opornych na chloramfenikol, 21% na erytromycynę, 14% na tetracyklinę. Oporność na klindamycynę, teikoplaninę i tygecyklinę prezentowało po 7% szczepów MSSA. Nie stwierdzono szczepów MSSA opornych na fluorochinolony, aminoglikozydy, glikopeptydy (wankomycynę), linezolid, ryfampicynę, kwas fusydowy oraz trimetoprim z sulfametoksazolem. Spośród MRSA 63% z nich zaliczono do MDR.

Wnioski.

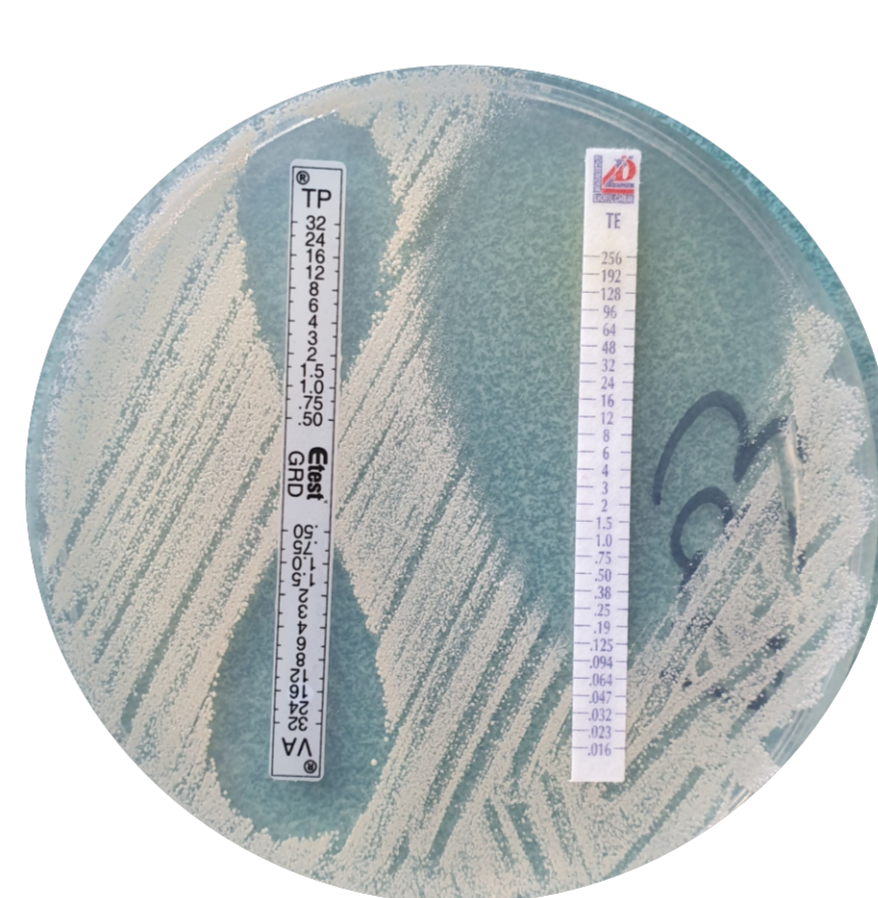
- I. U pacjentów z tracheostomią zaobserwowano wysoki odsetek izolatów o fenotypie MRSA (45%).
- II. Szczepy MRSA charakteryzowały się znacznie większą wielolekoopornością niż szczepy MSSA.
- III. Wśród szczepów MRSA 63% z nich zostało zaliczone do kategorii MDR.
- IV. Nowe kierunki terapii powinny uwzględniać istnienie rezerwarów wielolekoopornych szczepów *S. aureus* tworzących biofilm na powierzchniach rurek tracheostomijnych jako patogenu na powierzchniach rurek tracheostomijnych.



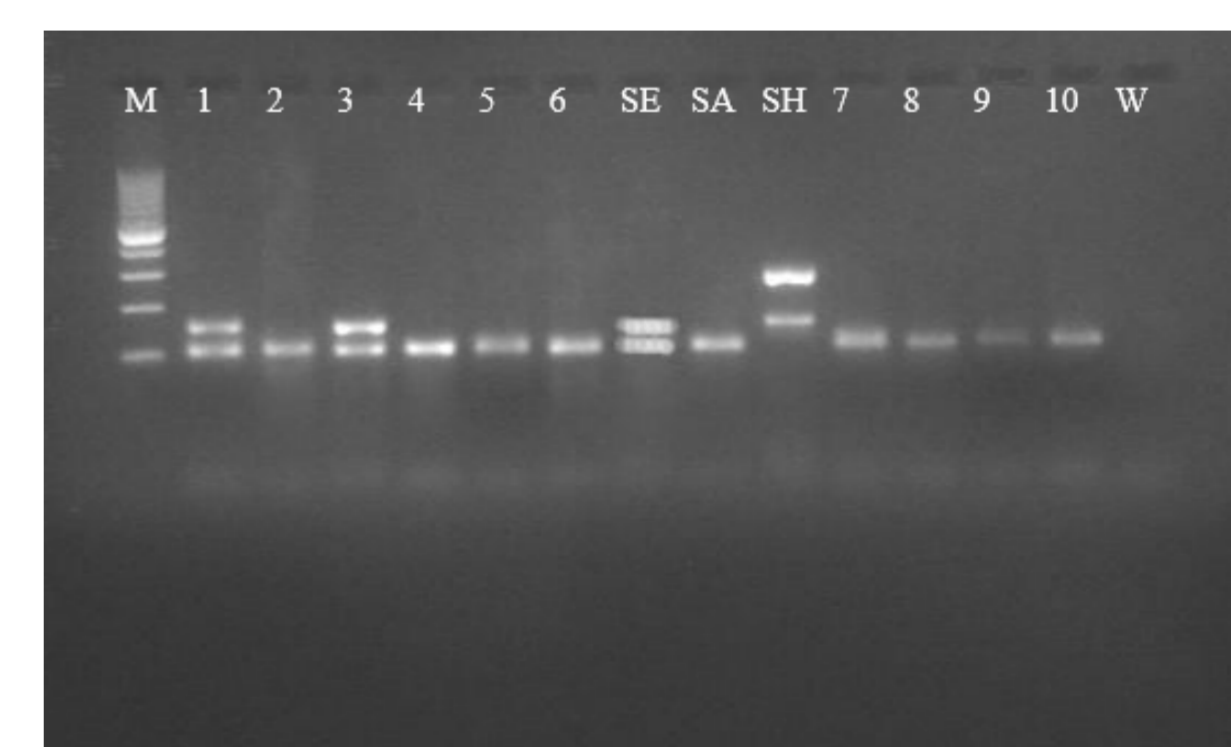
Rycina 1. Przykładowe zdjęcie antybiogramu szczepu *S. aureus* numer TT_32. CIP - ciprofloksacyna [0,25 mg/L], LEV - lewofloksacyna [0,125 mg/L]



Rycina 2. Przykładowe zdjęcie obrazujące antybiogram szczepu *S. aureus* numer TT_31, podłożu TSA. Widoczna wyraźna strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z klindamycyną (kształt litery D) co oznacza pojawienie się fenotypu iMLSb. PG - penicylina benzylowa [0,75 mg/L], E - erytromycyna [10 mm], DA - klindamycyna [32 mm], LZD - linezolid [32 mm].

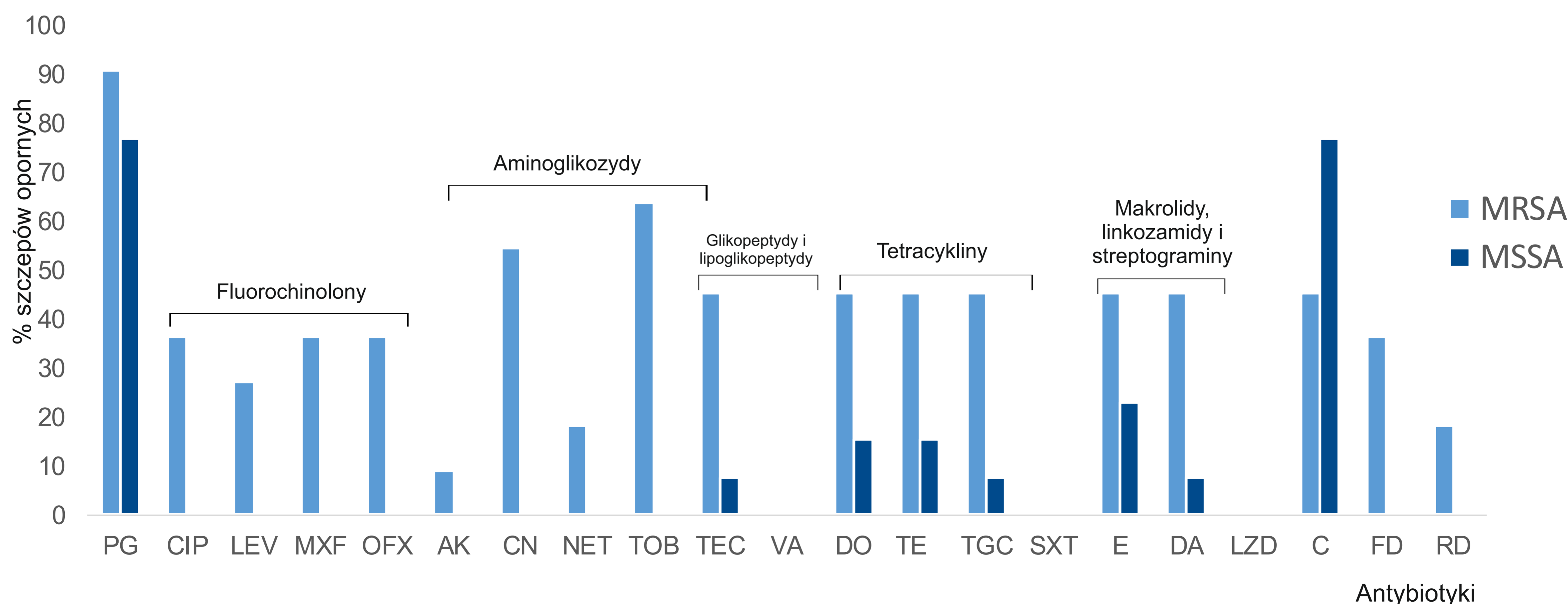


Rycina 3. Przykładowe zdjęcie obrazujące antybiogram szczepu *S. aureus* numer TT_33, podłożu TSA. VA - wankomycyna [0,75 mg/L], TP - teikoplanina [0,75 mg/L], TE - tetracyklina [0,25 mg/L].



Rycina 4. Przykładowe zdjęcie obrazujące rozdziel elektroforetyczny produktów amplifikacji po reakcji mPCR przeprowadzonej w kierunku identyfikacji gatunkowej izolatów *S. aureus* oraz obecności genu *mecA*.

Legenda: pz - pary zasad; M - marker wielkości DNA (zakres: 100-1000pz); SE - *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A); SA - *S. aureus* ATCC 25923; SH - *S. haemolyticus* ATCC 29970; 1-10 - próbki badane; W - kontrola ujemna (woda).



Wykres 1. Procent oporności szczepów *S. aureus* na poszczególne antybiotyki.

PG - penicylina benzylowa, CIP - ciprofloksacyna, LEV - lewofloksacyna, MXF - moksifloksacyna, OFX - ofloksacyna, AK - amikacyna, CN - gentamycyna, NEJ - netylmycyna, TOB - tobramycyna, TEC - teikoplanina, VA - wankomycyna, DO - doksylicyna, TEC - tetracyklina, TGC - tygecyklina, SXY - trimetoprim/Sulfamsazol, FOX - cefoksytyna, E - erytromycyna, DA - Klindamycyna, LZD - linezolid, C - chloramfenikol, FD - kwas fusydowy, RD - rifampicyna