

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

STAPHYLOCOCCUS AUREUS JAUTRUMO ANTIBIOTIKAMS
ANALIZĖ KLAIPĖDOS VAIKŲ LIGONINĖJE 2008-2009 METAIS

Magistrantė VIKTORIJA KAIRYTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovė
dr. Silvija Kiverytė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	3
ĮVADAS	4
LITERATŪROS APŽVALGA	5
1. BENDRA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> APŽVALGA	5
1.1. Stafilokokų genties apibūdinimas	5
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> charakteristikos	6
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> patogeniškumas	8
2. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> JAUTRUMAS ANTIBIOTIKAMS	9
2.1. Istorija	9
2.2. Atsparumo penicilinams mechanizmas	12
2.3. Atsparumo makrolidams mechanizmas	12
2.4. Atsparumo amnoglikozidams mechanizmas	13
2.5. Meticilinui atsparus <i>Staphylococcus aureus</i> - MRSA	13
2.6. Atsparumo vankomicinui mechanizmas	14
TYRIMO METODAI IR APIMTIS	15
1. MEDŽIAGOS	15
1.1. Biologinė medžiaga	15
1.2. Reagentai	15
1.3. Terpės.....	16
2. METODAI	19
2.1. <i>S. aureus</i> kultūros išskyrimas.....	19
2.2. Dažymas Gramo būdu	20
2.3. Fermentiniai testai.....	21
2.4. <i>S. aureus</i> diferenciacijos metodai	22
2.5. Jautrumo antibiotikams nustatymas.....	23
2.6. Statistinė analizė	27
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
1. <i>S. AUREUS</i> DUOMENŲ ANALIZĖ PAGAL VAIKŲ LYTĮ, AMŽIŲ, PASĖLIŲ KILMĘ IR LIGOS DIAGNOZĘ	28
2. <i>S. AUREUS</i> JAUTRUMO ANTIBIOTIKAMS DUOMENŲ ANALIZĖ	33
2.1. Jautrumas penicilinui	33
2.2. Jautrumas eritromicinui	35
2.3. Jautrumas gentamicinui	37
2.4. Eritromicino ir gentamicino koreliacija	39
2.5. Jautrumas oksacilinui.....	40
2.6. Jautrumas cefazolinui	42
2.7. Jautrumas kitiems antibiotikams.....	44
2.8. Jautrumo antibiotikams kitimas 2008-2009 metais	44
IŠVADOS	48
ABSTRACT	49
LITERATŪRA	50

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- A – kultūra atspari antibiotikui
- AAC – acetiltransferazė
- ANT – adenililtransferazė
- APH - fosfotransferazė
- Bp – bazių poros
- C – citozinas
- C.L.E.D. – Cystine Lactose Electrolyte Deficient – Double Indicator agar (liet. agaras su sumažintu cistino, laktozės ir elektrolitų kiekiu bei su dviem indikatoriais)
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- EARSS – *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (liet. Europos atsparumo antimikrobiniams vaistams priežiūros sistema)
- EDTA – etileno diamino tetraacetinė rūgštis
- G – guaninas
- g/l – gramai litre
- J – kultūra jautri antibiotikui
- MD – manito druskos agaras
- MH – Mueller-Hinton agaras
- MJ – kultūra mažai jautri antibiotikui
- MRSA – methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (liet. meticilinui atsparus *S. aureus*)
- MSCRAMM – microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (liet. mikrobinio paviršiaus komponentai, atpažįstantys adhezyvias matricos molekules)
- NaCl – natrio chloridas
- PBP – Penicilin-binding protein (liet. peniciliną surišantis baltymas)
- p – reikšmingumo lygmuo
- Pen - penicilinas
- PNS – plazmos nekoaguliuojantys stafilokai (angl. CNS – coagulase negative staphylococci)
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
- SCC*mec* – staphylococcal cassette chromosome *mec* (liet. stafilokokinė *mec* kasetė)
- VRSA – Vankomycin-resistant MRSA (liet. vankomicinui atsparus MRSA)

ĮVADAS

Staphylococcus aureus (liet. auksinis stafilokokas) yra vienas iš dažniausių įvairių žmonių infekcijų sukėlėjų. Auksinis stafilokokas sukelia daugybę problemų ne tik dėl savo didelio virulentiškumo, bet ir todėl, kad sugeba greitai įgyti atsparumą antimikrobiniams vaistams. Kliniškai svarbiausias yra stafilokoko atsparumas antistafilokokiniam penicilinazei atspariems penicilinams. Šis atsparumas istoriškai buvo pavadintas „atsparumu meticilinui“ (MRSA). Nepaisant antimikrobinės terapijos, sergamumas ir mirštamumas, susijęs su *S. aureus* infekcijomis, išlieka didelis, iš dalies dėl mikroorganizmo sugebėjimo įgyti atsparumą visiems antibiotikams, įskaitant vankomiciną. Dėl efektyvios vakcinės nebuvimo ir daugybės antibiotikams atsparių padermių atsiradimo *S. aureus* yra rimta visuomenės sveikatos problema. Todėl labai svarbu žinoti regioninius antimikrobinio jautrumo duomenis, kad būtų galima skirti veiklius vaistus prieš *Staphylococcus aureus*, dar nenustačius konkrečios kultūros jautrumo antibiotikams. Šie duomenys gaunami analizuojant *Staphylococcus aureus* jautrumą antibiotikams ir jo pokyčius laike. Ši problema yra ypač aktuali Lietuvoje, nes Lietuvoje nėra bendrų susistemintų duomenų apie *S. aureus* jautrumą antibiotikams.

Šis darbas atliktas Klaipėdos vaikų ligoninės mikrobiologijos laboratorijoje.

DARBO TIKSLAS

Staphylococcus aureus jautrumo antibiotikams analizė Klaipėdos vaikų ligoninėje 2008-2009 metais.

Tikslui įgyvendinti iškelti šie **uždaviniai**:

1. Išanalizuoti 2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje iš pasėlių išskirtas *Staphylococcus aureus* kultūras.
2. Ištirti *S. aureus* kultūrų jautrumą antibiotikams ir atlikti jautrumo antibiotikams 2008-2009 metais analizę.

LITERATŪROS APŽVALGA

1. BENDRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* APŽVALGA

1.1. Stafilokokų genties apibūdinimas

Stafilokokai yra gramteigiami, katalazę gaminantys kokai, dažytame tepinėlyje suformuojantys netaisyklingas ir vynuoges panašias kekes. Ląstelės sienelėje yra peptidoglikano ir teicho rūgščių. Dauguma rūšių yra fakultatyvūs anaerobai, galintys augti esant 10% NaCl bei 18-40°C temperatūroje (1).

Domenas:	<i>Bacteria</i>
Karalystė:	<i>Eubacteria</i>
Tipas:	<i>Firmicutes</i>
Klasė:	<i>Bacilli</i>
Būrys:	<i>Bacillales</i>
Šeima:	<i>Staphylococcaceae</i>
Gentis:	<i>Staphylococcus</i>
Rūšis:	<i>S. aureus</i>

1 pav. *S. aureus* taksonomija. Informacija paimta iš <http://www.uniprot.org/taxonomy/1280> (2).

“Bakterijų nomenklatūros internacionalinio kodo” 30b rekomendacija pateikia minimalius standartus *Staphylococcus* genties ir naujai atpažintų šios genties rūšių aprašymui. Kad rūšis būtų priskirta *Staphylococcus* genčiai, tai turi būti gramteigiamas kokas, ant kietos terpės formuojantis kekės pavidalo krūveles, gaminantis katalazę, turintis būdingą ląstelės sienelės struktūrą bei 30-40 mol % G+C DNR sudėtyje (3).

Staphylococcus gentis apima 42 pagrįstai apibūdintas gramteigiamų, katalazę turinčių kokių rūšis ir porūšius. Stafilokokai, tarp jų ir *Staphylococcus aureus*, paprastai yra oportunistiniai patogenai ar komensalai, gyvenantys ant šeimininko odos. Tačiau jie gali tapti patogenais, jeigu patenka į šeimininko audinius dėl odos barjero traumos, implantuojant medicininius įtaisus, taip pat sutrikdžius mikrobinę bendruomenę ar individams su nusilpusia imunine sistema. Todėl norint labiau apibrėžti stafilokokų šeimininko-patogeno santykius, siekiama kuo tiksliau identifikuoti *Staphylococcus* gentis mikrobinėse bendruomenėse (4, 5).

Stafilokokai yra plačiai paplitę gamtoje ir gali būti aptinkami žmonėse, gyvūnuose bei įvairiuose maisto produktuose. Kai kurios stafilokokų padermės yra siejamos su žmonių ar gyvūnų ligomis, kitos naudojamos technologiniais tikslais. *Staphylococcus aureus* yra gerai

žinomas patogenas, o plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai (PNS), apimantys rūšių daugumą, laikomi saprofitais arba retai patogeniškais (6, 7).

Maiste, ypač fermentuotuose mėsos produktuose, aptinkamos tokios rūšys kaip *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. epidermidis* ir *S. saprophyticus*. Tačiau *Staphylococcus aureus* aptikimas maiste – tai potenciali visuomenės sveikatos rizika, nes daugelis *S. aureus* padermių gamina enterotoksinus (7).

Staphylococcus aureus dažnai nustatomas esant visuomenėje įgytoms ir hospitalinėms infekcijoms, tarp jų – septicemijai, apatinių kvėpavimo takų, šlapimo takų ir odos infekcijoms, o PNS dažniausiai aptinkami kraujo kultūrose ir sukelia 1/3 hospitalinių infekcijų (7). Šiuo metu keletas PNS rūšių laikomos potencialiais patogenais. Jie dažniausiai sukelia hospitalines infekcijas, taip pat siejami su implantavimu tokių medicinos įtaisų kaip intraveniniai kateteriai, prostetiniai širdžių vožtuvai ir ortopediniai implantai. Po auksinio stafilokoko labiausiai su žmonių ligomis siejami stafilokokai yra *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ir *S. saprophyticus*. Kiti svarbūs oportunistiniai patogenai yra *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. saccharolyticus* ir *S. lugdunensis* (6, 7).

Ir *S. aureus*, ir plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai pasižymi neįtikėtinu sugebėjimu įgyti atsparumą antibiotikams, taip ribodami terapijos galimybes ir didindami pacientų sergamumą ir mirštamumą (8).

1.2. *Staphylococcus aureus* charakteristikos

Staphylococcus aureus yra svarbus patogenas, sukeliantis ir hospitalines, ir visuomenėje įgytas infekcijas. *S. aureus* dažnai kolonizuoja šeimininką, nesukeldamas jokių simptomų, ir gyvena kaip komensalas žmogaus nosyje. 20% sveikos populiacijos yra nuolatos kolonizuojami *S. aureus*, o 60% - nepastovūs nešiotojai (9, 10).

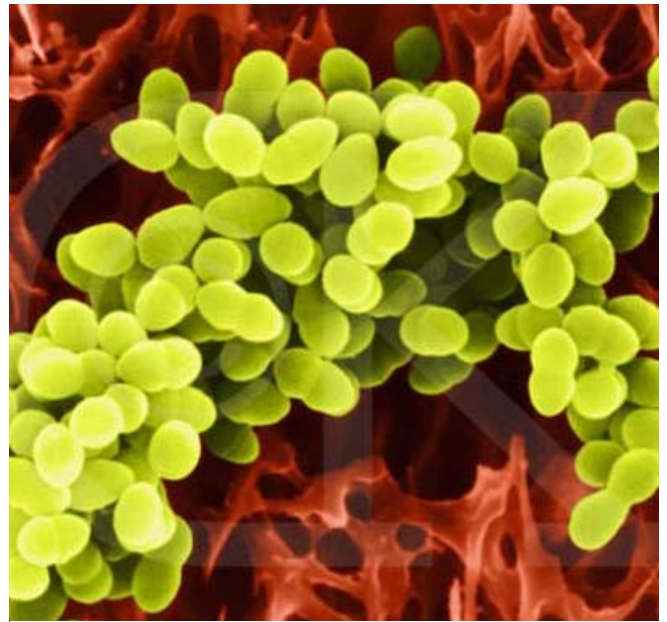
S. aureus kolonizuoja odą per 24-48 valandas po gimimo po kontakto su suaugusiųjų oda ar aplinka. Naujagimių kolonizacija *S. aureus* varijuoja nuo 20% iki 90% per pirmąją savaitę po gimimo, daugiausiai nosyje, bamboje ir ant odos. Stafilokokinės kolonizacijos tikimybė didėja ilgėjant hospitalizacijos trukmei (11).

Žiūrint į *S. aureus* per mikroskopą, matomi kekėmis išsidėstę gramteigiami kokai (2 pav.). *S. aureus* skiriasi nuo kitų stafilokokų rūšių auksine kolonijų pigmentacija bei teigiama koagulazės, manitolio fermentacijos ir deoksiribonukleazės testų reakcija (13).

Stafilokokų genomą sudaro žiedinė chromosoma (maždaug 2800 bp) ir plazmidės. Palyginamoji analizė parodė, kad dauguma stafilokokų genomo regionų yra konservatyvūs, bet yra keletas didelio variabilumo sekų blokų. Tikėtina, kad *S. aureus*

šias genomines sritis įgijo horizontalaus perdavimo būdu ir, bent iš pradžių, jų integracijai į genomą, ko gero, reikėjo DNR rekombinacijos (integrazės) genų. Genai, susiję su užkrečiamumu ir atsparumu antibiotikams, yra randami ir chromosomoje, ir nechromosominiuose elementuose. Variabilios genomo sekos sritys dažnai perneša užkrečiamumo ir atsparumo antibiotikams determinantes. Variabilūs regionai gali būti klasifikuojami kaip profagai, patogeniškumo salelės ar stafilokokinės kasetės chromosomos. Genai, susiję su užkrečiamumu ir atsparumu antibiotikams, tarp stafilokokų padermių, rūšių ir kitų gramteigiamų bakterijų rūšių yra perduodami per nechromosominius elementus (13-15).

Išorinė stafilokoko ląstelės sienelė sudaryta iš peptidoglikano, lipoteicho rūgščių ir įvairių kitų sekretuojamų toksinių produktų, kurie sukelia stafilokokinį sepsinį šoką. 50% sienelės sudaro peptidoglikanas. Peptidoglikano grandinės yra kryžmai sujungtos tetrapeptidinėmis grandinėmis ir pentaglicino tilteliu, specifišku *S. aureus*. Ribitolio teicho rūgštys kovalentiškai prijungtos prie peptidoglikano. Dauguma stafilokokų formuoja mikrokapsules. Kapsulė padidina stafilokoko užkrečiamumą, trukdydama fagocitozei. Nuo kapsulės priklauso *S. aureus* sukibimas su endoteliniais paviršiais, tačiau manoma, kad ji taip pat skatina bakterijų kolonizaciją ir nuolatinį buvimą ant gleivinių paviršių. Iš 11 mikrokapsulinio polisacharido serotipų, kurie buvo identifikuoti, 5 ir 8 tipai atsakingi už 75% *S. aureus* sukiamų žmonių infekcijų. Atspariausios meticilinui *S. aureus* padermės yra 5 tipo (10, 13, 15).



2 pav. *S. aureus* nuotrauka elektroniniu mikroskopu. Nuotrauka paimta iš <http://swampie.files.wordpress.com/2008/02/staphylococcus-aureus.jpg> (12).

Staphylococcus aureus turi daugybę užkrečiamumo faktorių, tarp jų daugiau nei 40 sekretuojamų baltymų ir fermentų, kurie naudojami infekcijoms susidaryti ir palaikyti. Stafilokokai gamina daug toksinų, kurie yra grupuojami remiantis jų veikimo mechanizmu. Kai kurie iš jų siejami su konkrečiomis ligomis, pavyzdžiui, toksinio šoko sindromo toksinas – su toksinio šoko sindromu, *Panton-Valentine*'o leukocidinas – su nekrozuojančia pneumonija ir odos ligomis, o stafilokokinių enterotoksinų A ir B šeima – su apsinuodijimu maistu. Taip pat stafilokokai gamina įvairius fermentus, tokius kaip proteazės ir lipazės, kurie naikina audinius. Šie bakterijų produktai gali palengvinti infekcijos plitimą į gretimus audinius, nors jų vaidmuo ligų patogenezėje nėra tiksliai apibrėžtas (13).

1.3. *Staphylococcus aureus* patogeniškumas

Staphylococcus aureus yra viena iš pagrindinių įvairių infekcijų priežasčių ir ligoninėse, ir už jų ribų. Jis gali sukelti paviršutines odos infekcijas, gilesnes plaukų folikulų infekcijas, abscesus, giliųjų audinių infekcijas ir net sisteminės širdies, plaučių, kaulų ir kraujo infekcijas. Jis gali būti endokardito, toksinio šoko sindromo, osteomielito, septicemijos, su maistu susijusių ligų priežastimi. *S. aureus* yra antras pagal dažnumą patogenas, sukeliantis sepsį mažo svorio naujagimiams intensyvioji priežiūros skyriuose (10, 11, 16).

Pirminė infekcijos vieta dažniausiai yra odos trūkis, kuris gali sukelti nedideles odos ir žaizdos infekcijas, tačiau *S. aureus* taip pat gali paveikti bet kurį kūno audinį, sukeldamas gyvybei pavojingas ligas – osteomielitą, endokarditą, pneumoniją ar septicemiją. Audinyje *S. aureus* gamina patogeniškumo veiksnius (su paviršiumi susijusius baltymus, fermentus, egzotoksinius, kapsulinius polisacharidus bei kitus genų produktus), kurie palengvina audinio kolonizaciją, audinių sunaikinimą ir padeda išvengti imuninės sistemos atsako (10, 17).

S. aureus patogeniškumas priklauso nuo jo gaminamų toksinų, egzofermentų, adhezinų ir imunitetą moduliuojančių baltymų. Vieno patogeniškumo veiksnio nepakanka sukelti stafilokokinę infekciją (išimtis – ligos, sukeltos specifinių toksinų, pvz. enterotoksinų ar toksinio šoko sindromo toksinų). Infekciją sukelia koordinuota veikla įvairių patogeniškumo veiksnių, kurie yra su ląstelės sienele susiję ir sekretuojami bakteriniai baltymai (10).

Šie veiksniai gali būti suskirstyti į tris grupes:

1. Su sienele susiję produktai, įskaitant MSCRAMM (angl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) šeimos adhezinus ir

kapsulinį polisacharidą, palengvina prisirišimą prie šeimininko audinių ir padeda priešintis šeimininko imuniniam atsakui.

2. Sekretuojami egzoproteinai, tokie kaip citolizinais ir ekstraląstelinės proteazės, kovoja su šeimininko gynybinėmis sistemomis ir palengvina invaziją į audinius bei maistinių medžiagų pasisavinimą.
3. Veiksniai, padedantys išvengti šeimininko imuninės sistemos, sumažina fagocitozę ir sąveikauja su antistafilokokiniais antikūnais. Šių patogeniškumo veiksnių ekspresija yra reguliuojama daugybės sąveikaujančių reguliacinių genų (*agr*, *sarA*, *sarHI*, *saeR-saeS*, *rot*, *srrA-srrB* ir *arlS-arlR*), reaguojančių į aplinkos sąlygas (bakterinis populiacijos tankumas, osmotiškumas, katabolitų koncentracija ir pH) (10, 18).

Nepaisant antimikrobinės terapijos sergamumas ir mirštamumas, susijęs su *S. aureus* infekcijomis, išlieka didelis, iš dalies dėl mikroorganizmo sugebėjimo įgyti atsparumą visiems antibiotikams, įskaitant vankomiciną. Dėl efektyvios vakcinės nebuvimo ir daugybės antibiotikams atsparių padermių atsiradimo *S. aureus* yra rimta visuomenės sveikatos problema (17).

2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS JAUTRUMAS ANTIBIOTIKAMS

2.1. Istorija

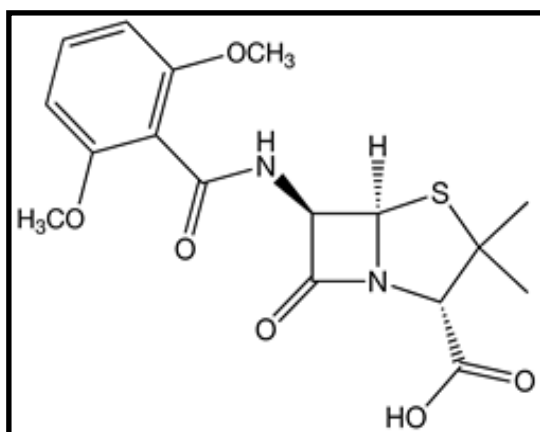
S. aureus įgyja atsparumą antimikrobiniam vaistams naudodamas vieną iš dviejų skirtingų mechanizmų: jau turimo geno mutaciją arba atsparumo geno horizontalų pernešimą iš kitų organizmų (konjugaciją, transdukciją ar transformaciją). Įgyti atsparumą padeda ir judrieji genomo elementai (19).

Nuo 1930 metų, antimikrobinės chemoterapijos pradžios, *S. aureus* tapo atsparus daugeliui antimikrobinėms vaistams, tačiau kliniškai svarbiausias yra atsparumas meticilinui. Genetinis atsparumo meticilinui mechanizmas užtikrina atsparumą visiems β -laktaminiam antibiotikams, o tai yra dažniausiai vartojamų antibiotikų klasė, kuriai priklauso penicilinai, cefalosporinai ir karbapenemai (20).

Jau 1950-aisiais buvo aišku, kokią potencialią reikšmę visuomenės sveikatai gali turėti *S. aureus*. Greitai po klinikinių bandymų pastebėtas lėtai, bet nepaliaujamai didėjantis atsparumas penicilinui. 1940-ųjų pabaigoje D.Britanijos ir JAV ligoninės pranešė, kad 50% *S. aureus* padermių buvo atsparios penicilinui. Be to, buvo sukurta efektyvi tipavimo sistema, paremta padermei specifine lize naudojant grupę bakteriofagų, o tai suteikė galimybę identifikuoti galimus infekcijos šaltinius. Galiausiai atsirado ypatingai invaziškas,

užkrečiamas ir penicilinui atsparus *S. aureus* klonas, kuris pirmiausia buvo nustatytas Australijoje, bet po to sparčiai išplito ir kituose kontinentuose. Šio klono sukeltos infekcijos savo užkrečiamumu ir plitimo greičiu priminė gripo pandemiją. Ši padermė buvo pavadinta 80/81 paderme pagal jos bakteriofaginį jautrumą. Iki 1957-ųjų 80/81 (tapo žinoma kaip „hospitalinis stafilokokas“) buvo atsakinga už beveik visas epidemijas gimdymo skyriuose JAV ir daugelį epidemijos protrūkių D. Britanijos ligoninėse. Ligoninėse trečdaliui šių padermę nešiojusių pacientų buvo diagnozuotas kraujo užkrėtimas, tuo tarpu pacientams, kurie buvo kitų padermių nešiotojai, kraujo užkrėtimas buvo žymiai retesnis, nustatytas tik 2-5% tokių ligonių. Kilo susirūpinimas ne tik dėl didelio mirtingumo rodiklio tarp šių pacientų, bet ir dėl to, kad epidemijos protrūkiai neapsiribojo pacientais ir dažnai sukeldavo invazines odos infekcijas slaugytojams. 80/81 padermės sukeltos infekcijos pradėjo retėti 1960-aisiais, kai buvo pradėtas naudoti meticilinas – pirmasis pusiau sintetinis penicilazei atsparus penicilinas (3 pav.) (20).

Praėjus šešioms mėnesiams po to, kai 1960 m. spalį buvo pradėtas naudoti meticilinas, ištyrus 5000 klinikinių kultūrų, buvo nustatytos trys meticilinui atsparios padermės. Visos trys turėjo tą patį fenotipą ir buvo iš tos pačios ligoninės Anglijos pietuose. Tačiau kadangi atsparumas meticilinui pasitaikydavo retai ir pasireikšdavo tik esant tam tikroms aplinkos sąlygomis (tokioms kaip žema temperatūra ir didelė druskos koncentracija), kurios labai skyrėsi nuo vyraujančių sąlygų infekcijų vietose, mikrobiologai buvo įsitikinę ilgalaikiu meticilino ir jam giminingų antibiotikų veiksmingumu. 1967 m. situacija pradėjo keistis; daugeliui vaistų atsparus MRSA (meticillin-resistant *S. aureus*) buvo aptiktas Šveicarijoje, Prancūzijoje, Danijoje, Anglijoje ir Indijoje. Nuo 1967 iki 1971 m. apie 15% visų Danijoje išskirtų *S. aureus* kultūrų buvo atsparios meticilinui, taip pat penicilinui, streptomycinui,



3 pav. Meticilino cheminė formulė; paimta iš <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Methicillin.png/220px-Methicillin.png> (21).

tetraciklinui, pasitaikydavo ir eritromicinui atsparių kultūrų. Dauguma padermių priklausė tam pačiam fagotipo 83A kompleksui. Po greito šio klono išplitimo, 1970-aisiais ir 1980-ųjų pradžioje MRSA Europoje pradėjo retėti. Šio reiškinio priežastis nėra aiški, bet manoma, kad sinergistinį efektą galėjo turėti pasikeitimai skiriant streptomyciną ir tetracikliną bei griežtos infekcijų kontrolės politikos įdiegimas (20).

Rūpesčiai atsinaujino 1980-ųjų pradžioje, kai vis dažniau buvo nustatomos gentamicinui atsparios MRSA padermės D. Britanijoje, JAV, Airijoje ir kitose šalyse. 1982 m. daugeliui vaistų atspari MRSA padermė buvo pastebėta Australijoje ir įvežta į Angliją. Iki 1995 m. Anglijoje ir Velse buvo identifikuota 16 epideminių MRSA tipų, tačiau tik trys iš jų vis dar buvo aptinkami 1990-aisiais. Tuo pačiu metu šešios epidemiškos kultūros vis dažniau buvo nustatomos centrinėje Europoje, keletas MRSA klonų paplito tarp kontinentų (20).

Dauguma dokumentuotų MRSA infekcijų buvo įgytos ligoninėse. Tačiau 1993 m. Australijos vakaruose naujos MRSA padermės buvo aptiktos tarp vietinių gyventojų, prieš tai nesusidūrusių su sveikatos priežiūros įstaigomis. Išaiškinta stulbinanti visuomenėje įgytų MRSA padermių evoliucija. Jos nuo ligoninių padermių skyrėsi keliomis savybėmis: buvo jautresnės antibiotikams, išskyrus β -laktamų klasę, jų genotipas skyrėsi nuo ligoninių padermių genotipo, dauguma turėjo kitokias atsparumo meticilinui kasetes ir dauguma turėjo užkoduotą virulentiškumo veiksnį, vadinamą *Panton-Valentine*'o leukocidinu (20).

1997 m. pirmą kartą aprašytos hospitalinės MRSA padermės su sumažėjusiu jautrumu trečios kartos glikopeptidams. Sumažėjęs jautrumas dažnai buvo heterogeninis ir siejamas su bakterijų ląstelių sienelių sustorėjimu. Pagaliau 2002 m. dviems nesusijusiems ligoniams buvo nustatytas vankomicinui atsparus MRSA (VRSA). Šie ligoniai taip pat buvo užsikrėtę vankomicinui atspariais enterokokais. 2004 m. trečias atsparumo vankomicinui atvejis nustatytas Niujorke, JAV. Visos trys padermės įgijo atsparumą vankomicinui iš vankomicinui atsparių enterokokų. Buvo įrodyta, kad heterogeninis atsparumas vankomicinui nulėmė gydymo nesėkmes - persistuojančią bakteriemiją (bakterijų buvimas kraujyje) ir karščiavimą, trunkantį ilgiau negu 7 dienas. Vis dėlto aprašytas sėkmingas gydymas alternatyviais antimikrobiniais vaistais (pvz. linezolidu), kai gydymas vankomicinu nesėkmingas (20).

Linezolidas – pirmasis kliniškai naudojamas oksazolidinonas, efektyvus gydant įvairias gramteigiamų patogenų sukeltas infekcijas. 2001 m. pirmą kartą pranešta apie linezolidui atsparų MRSA, išskirtą iš paciento, kuriam linezolidu buvo gydomas peritonitas. Nuo to laiko linezolidui atsparus *S. aureus* buvo aptiktas ir klinikėje medžiagoje, ir atrinktas *in vitro*, tačiau tai vis dar yra retas fenomenas (22, 23).

2003 m. JAV buvo pritarta gramteigiamų bakterijų sukeltų infekcijų gydymui daptomicinu. Daptomicinas yra pirmasis iš naujos klasės antibiotikų, vadinamų cikliniais lipopeptidais. Buvo patvirtintas klininis gydymo daptomicinu veiksmingumas. Jau 2005 m. *Mangilli ir kt.* pranešė apie daptomicinui atsparų MRSA. Manoma, kad atsparumas susiformavo dėl ilgo vaisto vartojimo gydant bakteriemiją. 2006 m. atliktoje pasaulinėje apklausoje nustatyta, kad tik 0.1% išskirtų *S. aureus* kultūrų buvo atsparios daptomicinui (24-26).

2.2. Atsparumo penicilinams mechanizmas

1941 metais penicilinas buvo pasiūlytas klinikinei medicinai kaip galimybė sėkmingai gydyti rimtas stafilokokines infekcijas. Tačiau jau tais pačiais metais buvo aprašytas fermentas penicilinazė. Penicilinai inhibuoja bakterinius PBP (peniciliną surišančius baltymus), būtinus ląstelės sienelės sintezei. Daugumos penicilinų bazinė struktūra susideda iš β -laktaminio žiedo ir šoninės grandinės. Penicilinazė – tai fermentas, kuris hidrolizuoja β -laktaminį žiedą, esantį β -laktaminiuose antibiotikuose, ir dėl to jie tampa neveikliais (pvz. penicilinas). Tai viena iš fermentų β -laktamazių formų (27-29).

S. aureus penicilinazės struktūrinis genas paprastai yra plazmidėje, nors keliose padermėse rasta įrodymų apie chromosominę padėtį. Šis fermentas yra indukuojamas, o jo formavimosi dažnį kontroliuoja reguliacinis genas, kurio produktas yra difunduojantis citoplazminis represorius. Penicilinazės plazmidėje taip pat yra genai, nulemiantys atsparumą keletui sunkiųjų metalų jonų, eritromicinui ir kitiems antibiotikams (30, 31).

Dėl atsparumo penicilinui penktojo dešimtmečio pradžioje buvo sukurti semi-sintetiniai penicilinai, atsparūs β -laktamazėms. Vienas iš tokių junginių buvo meticilinas (24).

2.3. Atsparumo makrolidams mechanizmas

Eritromicinas, pirmasis makrolidas, buvo pristatytas 1950-aisiais, ir po daugybės metų klinikinės patirties vis dar išlieka plačiai naudojamu antibiotiku. Jis pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis ir yra prokinetinis veiksnys. Tačiau dėl plataus makrolidų naudojimo vis labiau didėja atsparumas šios grupės antibiotikams (32).

Eritromicinas (tai pat ir linkozamidas klindamicinas) inhibuoja baltymų sintezę, prisirišdamas prie bakterinių ląstelių 50S ribosominių subvienetų. Atsparumą gali sukelti ribosominių saitų metilinimas, priklausomas nuo *erm* genų. *Erm* geno produktas yra ribosomos metilazė, kurios ekspresija paprastai yra minimali. Atspariose kultūrose eritromicinas indukuoja šios metilazės gamybą, o mutacijos *erm* promotoriaus regione sukelia metilazės gamybą be induktoriaus (33, 34).

Manoma, kad kitas veiksnys, sukeliantis *Staphylococcus spp.* atsparumą eritromicinui, yra ištekėjimo mechanizmas (efflux mechanism), kurį koduoja plazmidės genas *msr(A)*. Šis ABC šeimos baltymas turi du prototipinius ATP surišančius domenus, bet neturi akivaizdžių membraną pereinančių domenų, todėl kyla klausimas, kaip jis eksportuoja vaistus. Tikėtina, kad baltymas Msr(A) sąveikauja su kitu baltymu, kuris turi transmembraninius domenus, reikalingus vaistų eksportui (35).

Enterococcus faecium turi į *msrA* labai panašų *msrC* geną, kuris buvo klonuotas į *Staphylococcus aureus* norint patikrinti, ar jis galėtų sukelti stafilokokų atsparumą eritromicinui. Nustatyta, kad MsrC sukelia didelio lygio atsparumą auksiniuose stafilokokuose (33).

2.4. Atsparumo aminoglikozidams mechanizmas

Aminoglikozidai yra svarbūs antibiotikai gydant rimtas stafilokokines infekcijas. Jie yra stiprūs baktericidiniai veiksniai, inhibuojantys baltymų sintezę prisirišdami prie 30S ribosomos subvieneto. Stafilokokus aktyviausiai veikia gentamicinas ir tobramicinas. Jie dažnai kombinuojami su β -laktamu ir glikopeptidu, nes šie vaistai veikia sinergistiškai (36).

Pagrindinis stafilokokų atsparumo aminoglikozidams mechanizmas yra vaistų inaktyvacija ląsteliniams aminoglikozidus modifikuojančiais fermentais. Stafilokokuose buvo išskirti keli atskiri genų lokusai, koduojantys tokius modifikuojančius fermentus. Kliniškai svarbiausi genai koduoja acetiltransferazės (AAC), adenililtransferazės (ANT) ir fosfotransferazės (APH) fermentų aktyvumą. ACC fermentai modifikuoja aminoglikozidų amino grupes, o ANT ar APH fermentai – hidroksilo grupes, todėl šie antibiotikai praranda sugebėjimą surišti ribosomą ir dėl to nebegali stabdyti baltymų sintezės (36).

Kiti atsparumo aminoglikozidams mechanizmai yra ribosominės mutacijos ir aktyvus vaistų efluksas (ištekėjimas) iš bakterijų ląstelių (35, 37).

2.5. Meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus* - MRSA

Meticilinui atsparus *S. aureus* yra pavojingas bakterinis patogenas, pasižymintis užkrečiamumu ir atsparumu antibiotikams. Tam tikromis aplinkybėmis MRSA galima netgi sieti su padidėjusiu mirtingumu. Todėl MRSA infekcijų gydymui būtina sisteminė antibiotikų terapija (38).

Nuoseklūs molekuliniai epidemiologiniai stebėjimai rodo, kad MRSA ir *S. aureus* kaip rūšis evoliucionuoja daugiausia vegetaciniu būdu (t.y. klonavimas). Tačiau ir horizontalus DNR pernešimas iš kitų padermių ar rūšių vaidina svarbų vaidmenį *S. aureus* įgyjant atsparumą. Dažniausiai tai įvyksta dėl insercinių sekų (IS), transpozonų, profagu įsiterpimo į *S. aureus* genomą. Vis dėlto kai kurių genetinių pokyčių priežastys nėra žinomos (20).

MRSA atsirado, kai didelis mobilus genomo elementas, vadinamas stafilokokine *mec* kasete (angl. SCC*mec* – staphylococcal cassette chromosome *mec*), įsiterpė į meticilinui jautrią *S. aureus* padermę. Atsparumą meticilinui lemiantis genas *mecA*, esantis SCC*mec*

elemente, koduoja papildomą peniciliną surišantį baltymą (PBP2A), kurio afiniškumas β -laktaminiams antibiotikams sumažėjęs. PBP2A yra transpeptidazė, kuri gali užtikrinti ląstelės sienelės biosintezę, paprastai blokuojamą β -laktaminių antibiotikų. SCC*mec* kasetė įterpiama į chromosomą specifinėje netoli replikacijos pradžios taško esančioje sekoje (*attB_{SCC}*), todėl yra replikuojama anksčiau, o tai užtikrina greitą įgytų atsparumo antibiotikams genų transkripciją (20).

SCC*mec* kilmė ir perkėlimo mechanizmas vis dar lieka neaiškūs, iki šiol nerasta kitų bakterijų genčių, turinčių šį elementą. Manoma, kad evoliucinis *mecA* pirmtakas gali būti *S. sciuri* turimas *mecA* homologas (88% panašumo). Taip pat yra keletas faktų, kurie paremia hipotezę, jog SCC*mec* perėjo iš plazmos nekoaguliuojančių stafilokokų (PNS) į *S. aureus* (20).

2.6. Atsparumo vankomicinui mechanizmas

Dėl augančio daugeliui antibiotikų atsparių MRSA infekcijų skaičiaus gydymui pasirinktas glikopeptidas vankomicinas. Tačiau jau 1997 metais Japonijoje išskirta MRSA padermė su sumažėjusiu jautrumu vankomicinui. 2002 metais aprašytas pirmasis vankomicinui atsparus MRSA (VRSA). Nustatyta, kad atsparumo vankomicinui genas buvo perimtas iš vankomicinui atsparių enterokokų (39).

VRSA atsparumą nulemia genų klasteris *vanA*. Genetinis mechanizmas nėra tiksliai nustatytas, tačiau aptikta keletas ląstelės sienelės struktūros ir biosintezės pokyčių. Manoma, kad dėl šių pokyčių vankomicinas „afiniškai įstringa“ (affinity trapping) ir molekulės nebegali pasiekti savo taikinio ant citoplazminės membranos (39).

TYRIMO METODAI IR APIMTIS

1. MEDŽIAGOS

1.1. Biologinė medžiaga

Šiame darbe tiriamos *S. aureus* padermės, išaugintos iš klinikinės medžiagos 2008-2009 metais Klaipėdos vaikų ligoninės mikrobiologijos laboratorijoje.

Klinikinė medžiaga:

- Išmatos;
- Skrepliai;
- Tepinėliai iš gerklės;
- Kraujas;
- Smegenų skystis;
- Punktatai;
- Šlapimas;
- Pūliai (iš pūlinio, absceso, ausies, akies, bambos ir kt.).

1.2. Reagentai

1 lentelė. Darbe naudojami reagentai

Gamintojas, Šalis	Reagentai
Becton, Dickinson and Company, JAV	Liofilizuota triušio plazma su 0,15 % EDTA
bioMerieux SA, Prancūzija	Šokoladinis agaras su 5% arklio krauju
Deltalab, Ispanija	Liugolis, kristalvioletas, safraninas, blankinimo skystis (<i>Kit containing Gram differential staining</i>)
Oxoid, Anglija	<i>Staphylect Plus Test Reagent, Staphylect Plus Control Reagent (Staphylect Plus); Extraction Reagent 1, Extraction Reagent 2, Test Latex, Control Latex (Penicilin-binding protein (PBP') late agglutination test); Kraujo kultūrų sistemos (Signal Blood Culture System)</i>
Remel, JAV	Nitrocefino diskai
UAB Rygos farmacijos fabrikas, Latvija	3-6 % vandenilio peroksido tirpalas

1.3. Terpės

2 lentelė. Darbe naudojamos terpės

Terpė	Sudėtis ir ruošimas
<p>C.L.E.D. agaras (agaras su sumažintu cistino, laktozės ir elektrolitų kiekiu bei su dviem indikatoriais)</p> <p>Žaliai mėlynas skaidrus gelis</p>	<p>4.0 g/l subalansuoto peptono nr.1</p> <p>0.002 g/l bromtimolio mėlio indikatoriaus</p> <p>0.08 g/l andrade indikatoriaus</p> <p>15.0 g/l agaru nr.1</p> <p>0.128 g/l L-cistino</p> <p>3.0 g/l jautienos ekstrakto</p> <p>4.0 g/l triptono</p> <p>10.0 g/l laktozės</p> <p>36 g miltelių supilti į 1 litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 min., vėl gerai išmaišyti ir sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min. Atvėsinti iki 47°C temp., gerai išmaišyti ir išpilstyti į sterilias Petri lėkšteles.</p>
<p>5% Kolumbijos kraujo agaras</p> <p>Raudonas matinis gelis; spalva priklauso nuo pridėamo kraujo kiekio ir kokybės</p>	<p>15.0 g/l triptozės</p> <p>2.5 g/l sojos peptono</p> <p>12.0 g/l agaru nr.2</p> <p>5.0 g/l mielių ekstrakto</p> <p>5.0 g/l natrio chlorido</p> <p>5% sterilaus kraujo</p> <p>39.5 g miltelių supilti į vieną litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 min., kol milteliai ištirps, tirpalą išmaišyti ir sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min. Atvėsinti iki 47°C temp. ir pridėti 5% sterilaus kraujo. Pavirti 10 min. ir pridėti vitamino K. Gerai išmaišyti ir išpilstyti į sterilias Petri lėkšteles.</p>

<p>Manito druskos agaras (MD)</p> <p>Raudonas skaidrus gelis</p>	<p>1.0 g/l jautienos ekstrakto</p> <p>10.0 g/l subalansuoto peptono nr.1</p> <p>12.0 g/l agaro nr.2</p> <p>75.0 g/l natrio chlorido</p> <p>10.0 g/l D-manito</p> <p>0.025 g/l fenolio raudonio</p> <p>5% kiaušinio trynio emulsijos su teluritu</p> <p>108 g miltelių supilti į 1 litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 min., vėl gerai išmaišyti ir sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min. Terpę atvėsinti iki 47°C temp., įmaišyti kiaušinio trynio emulsiją ir išpilstyti į sterilias Petri lėkšteles.</p>
<p>Mueller Hinton agaras</p> <p>Šiaudų spalvos skaidrus gelis</p>	<p>2.0 g/l jautienos ekstrakto</p> <p>17.0 g/l agaro nr.1</p> <p>17.5 g/l rūgštimi hidrolizuoto kazeino</p> <p>1.5 g/l krakmolo</p> <p>50-100 mg/l kalcio jonų</p> <p>20-35 mg/l magnio jonų</p> <p>38 g miltelių supilti į vieną litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 min., vėl gerai išmaišyti ir sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min. Atvėsinti iki 47°C temp ir išpilstyti į sterilias Petri lėkšteles.</p>
<p>Skysta tioglikolinė terpė</p> <p>Blyškios šiaudų spalvos skaidrus skystis</p>	<p>15.0 g/l triptono</p> <p>0.5 g/l L-cistino</p> <p>2.5 g/l natrio chlorido</p> <p>0.75 g/l agaro</p> <p>5.5 g/l gliukozės</p> <p>5.0 g/l mielių ekstrakto</p> <p>0.5 g/l natrio tioglikolato</p> <p>0.001 g/l rezazurino</p> <p>29.75 g miltelių supilti į vieną litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 min. ir vėl gerai</p>

	išmaišyti. Užvirinti, kad ištirtų agaras, ir supilstyti į mėgintuvėlius. Sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min.
Smegenų-širdies infuzijos buljonas Blyškios šiaudų spalvos skaidrus skystis	17.5 g/l smegenų ir širdies infuzijos kietųjų medžiagų 2.0 g/l gliukozės 2.5 g/l dinatrio fosfato 10.0 g/l triptozės 5.0 g/l natrio chlorido 37 g miltelių supilti į vieną litrą dejonizuoto vandens ir išmaišyti. Palaukti 10 minučių, maišant pašildyti, kad milteliai visiškai ištirtų ir išpilstyti į mėgintuvėlius. Sterilizuoti autoklavuojant 121°C temperatūroje 15 min.

2. METODAI

2.1. *S.aureus* kultūros išskyrimas

2.1.1. Augimas ant kietos terpės

S. aureus išauginimui naudojami manito druskos, 5% kolumbijos kraujo, šokoladinis, C.L.E.D. agarai. Užsėta lėkštelė inkubuojama 16-48 h 35-37°C temperatūroje. Po inkubavimo vertinama kolonijų išvaizda. *Staphylococcus aureus* augimo charakteristikos pateiktos 3 lentelėje.



4 pav. MD terpė: lėkštelės viršuje auga *S. aureus*, apačioje – PNS.

3 lentelė. *Staphylococcus aureus* augimo charakteristikos ant kietų terpių

Terpė	Kolonijos dydis	Kolonijų forma	Spalva	Kitos savybės
Manito druskos agaras (4 pav.)	1.5-2.0 mm	Iškili, matinė, blizgančios	Ryškiai geltona, su juodu viduriuku	Suformuoja geltoną aureolę (turi fermentą lecitinazę)
C.L.E.D. agaras (šlapime)	1.0-1.5 mm	Iškili, matinė, blizgančios	Geltona/oranžinė	Mėlyna spalva, jei nefermentuoja laktozės
5% kolumbijos kraujo agaras	1.5-2.0 mm	Iškili, matinė, blizgančios	Balta/gelsva	Gali būti stebima hemolizė
Šokoladinis agaras	1.5-2.0 mm	Iškili, matinė, blizgančios	Balta/gelsva	Gali būti stebima hemolizė

2.1.2. Augimas skystoje terpėje

S. aureus gali neišaugti išsėjus ant pirminių lėkštelių, jei tyrimui paimta mažai patloginės medžiagos. Todėl tam tikra medžiaga (punktatai, pūliai, smegenų skystis) dar papildomai sėjama į skystą gausinimo terpę, iš kurios, esant augimui, išsėjama ant kietų terpių. Kraujas paimamas į buteliukus su specialia skysta terpe (*Signal Blood Culture System*) – bakterijos auginamos juos nuolat plakant purtytuvu, vėliau išsėjamos ant kietų terpių (4 lent.).

4 lentelė. *Staphylococcus aureus* augimo charakteristikos skystose terpėse

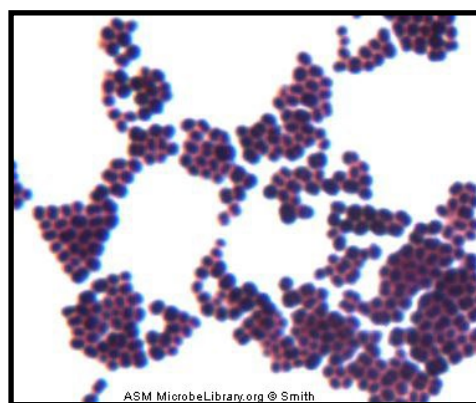
Terpė	Sėjama medžiaga	Kolonijų forma
Smegenų-širdies infuzijos buljonas	Smegenų skystis	Terpė susidrumsčia
Skysta tioglikolinė terpė	Pūliai, punktatai	Varveklis formos
Kraujo terpė	Kraujas	Kraujas pakyla, užputoja

2.2. Dažymas Gramo būdu

Gramo metodas skirtas diferencijuoti bakterijas į gramteigiamas ir gramneigiamas pagal jų ląstelių sienelių savybes.

Procedūra:

1. Ant objekcinio stiklelio plonu sluoksniu uždedama tiriamoji medžiaga – tiesiogiai nuo išaugintos kultūros (bakterinės suspensijos, 1-2 kolonijų, homogenizuotų druskos tirpale) ar tiesiogiai iš paciento.
2. Tepinėlis paliekamas išdžiūti ir užfiksuojamas karščiu virš liepsnos.
3. Ant stiklelio užpilamas kristalvioletas. Po 1 minutės nuplaunama vandeniu.
4. Ant stiklelio užpilamas jodo tirpalas. Po 1 minutės nuplaunama vandeniu.



5 pav. Gramteigiami kokai kekėmis. Nuotrauka paimta iš <http://cbmg.umd.edu/> (40).

5. Praplaunama su acetono alkoholiu, kol tepinėlis pasidaro skaidrus. Nuplaunama vandeniu.
6. Ant stiklelio užpilama safranino. Po 1 minutės nuplaunama vandeniu.
7. Stiklelis dar kartą nuplaunamas vandeniu ir paliekamas nudžiūti kambario temperatūroje.
8. Ant tepinėlio užlašinamas lašas sintetinio aliejaus.
9. Tepinėlis apžiūrimas per mikroskopą imersinės mikroskopijos būdu.

Vertinimas:

Gramteigiami mikroorganizmai nusidažo violetine-mėlyna spalva.

Gramneigiami mikroorganizmai nusidažo rožine-raudona spalva.

Staphylococcus aureus tepinėlyje per mikroskopą matomi kaip gramteigiami kekėmis išsidėstę kokai (5 pav.) (41).

2.3. Fermentiniai testai

2.3.1. Katalazės testas

Katalazės testas skirtas aptikti mikroorganizmuose fermentą katalazę, vandenilio peroksidui suyrant į deguonį ir vandenį.

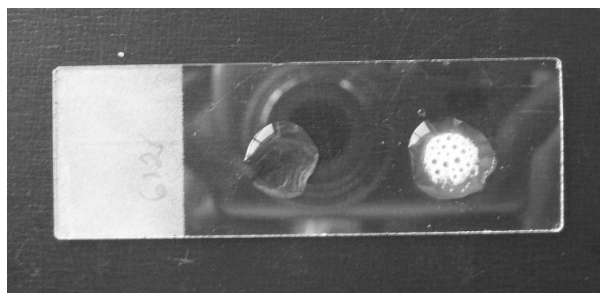
Procedūra:

1. Ant stikliuko užlašinamas 1 lašas vandenilio peroksido tirpalo.
2. Sterilia kilpa paimama atskira kolonija ir sumaišoma su vandenilio peroksidu.
3. 10 sekundžių stebima, ar vyksta putojimas.

Vertinimas:

Teigiamas rezultatas – lašo putojimas (*S. aureus* - katalazę turintis mikroorganizmas).

Neigiamas rezultatas – putojimas nevyksta) (6 pav.) (42).



6 pav. Katalazės testas: lašas kairėje – neigiamas rezultatas, dešinėje – teigiamas rezultatas.

2.4. *S. aureus* diferenciacijos metodai

2.4.1 Plazmos koaguliazės testas

S. aureus identifikuojamas atliekant plazmos koaguliacijos mėgintuvėlyje testą. Koagulazė – ekstraląstelinis baltymas, kuris fibrinogeną verčia į fibriną. Tai klasikinis požymis *S. aureus* nustatymui klinikinėse mikrobiologijos laboratorijose.

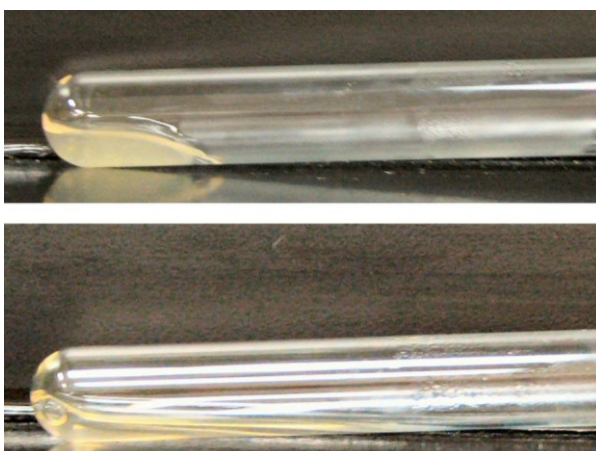
Procedūra:

1. Komercinė liofilizuota triušio plazma su EDTA praskiedžiama steriliu distiliuotu vandeniu santykiu 1:1 ir išpilstoma į siaurus mėgintuvėlius po 0.5 ml.
2. Sterilia bakteriologine kilpele emulsifikuojamos 2-4 kolonijos (1 kilpa) į rehidratuotą plazmą (į mėgintuvėlį su plazma).
3. Gerai išmaišoma ir inkubuojama 37°C temperatūroje 4 valandas.
4. Jei plazma nėra koaguliavusi po keturių valandų, tai ji dar inkubuojama iki 24 valandų.

Vertinimas:

Teigiamas rezultatas – plazma koaguliavo (identifikuotas *S. aureus*).

Neigiamas rezultatas – plazma nekoaguliavo (7 pav.) (43).



7 pav. Plazmos koaguliazės testas: mėgintuvėlis viršuje – teigiamas rezultatas, apačioje – neigiamas rezultatas. Nuotrauka paimta iš <http://www.microbelibrary.org/asonly/details.asp?id=2987&Lang=> (44).

2.4.2. Latekso agliutinacijos testas

Staphylect Plus (Oxoid, Anglija) yra latekso plokštelės agliutinacijos testas *S. aureus* diferenciacijai aptinkant *clumping factor*, *protein A* ir tam tikrus polisacharidus.

Staphylect Plus Test Reagent – mėlynos latekso dalelės, padengtos porcinu, fibrinogenu ir triušio IgG kartu su specifiniais polikloniniais antikūnais prieš *S. aureus* kapsulinį polisacharidą.

Staphylect Plus Control Reagent – mėlynos nesensitizuotos latekso dalelės.

Procedūra:

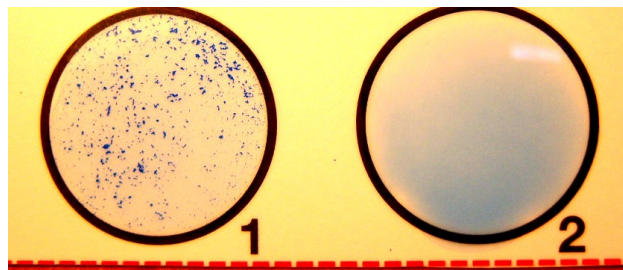
1. Vienas testo kortelės apskritimas naudojamas tyrimui (*Test Reagent*), kitas – kontrolei (*Control Reagent*). Į apskritimus uždedama po lašą *Test Reagent* ir *Control Reagent*.
2. Su kilpele paimama atskira kolonija ir sumaišoma su *Control Reagent* kortelės apskritime. Kita kilpele veiksmas pakartojamas su *Test Reagent*.
3. Kortelė paimama ir siūbuojama iki 20 sek. ir stebima, ar yra agliutinacija normaliame apšvietime.

Vertinimas:

Teigiamas rezultatas – mėlynų *Test Reagent* dalelių agliutinacija per 20 sek. (identifikuotas *S.aureus*) (8 pav.).

Neigiamas rezultatas - nevyksta agliutinacija ir po 20 sekundžių išlieka tolygi mėlyna suspensija.

Neinterpretuojamas rezultatas – *Control Reagent* agliutinacija. Tai rodo, kad kultūrai būdinga autoagliutinacija (43).



8 pav. Latekso agliutinacijos testas: 1 – teigiamas rezultatas,
2 – neigiamas rezultatas.

2.5. Jautrumo antibiotikams nustatymas

2.5.1. Diskų difuzijos metodas

Tai vienas iš būdų nustatyti mikroorganizmo jautrumą antibiotikams. Agaras inokuliuojamas pasirinktu mikroorganizmu ir uždedami popieriniai diskai, turintys reikiamą kiekį antibiotiko. Antibiotikai difunduoja į terpę ir suformuoja koncentracijos gradientą su didele koncentracija šalia disko, kuri tolstant nuo jo mažėja.

Procedūra:

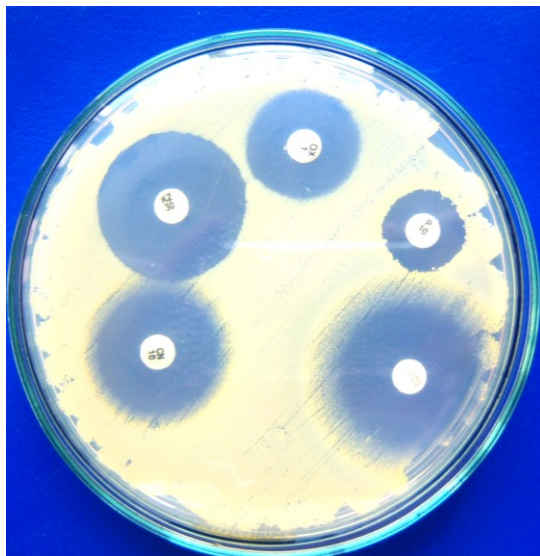
1. Sterilia kilpa paimama atskira *Staphylococcus aureus* kolonija ir inokuliuojama fiziologiniame tirpale. Suspensijos tankumas turi būti lygus 0.5 McFarland'o.
2. Sterilus tamponas keletą sekundžių pamirkomas suspensijoje. Tamponu inokuliuojamas MH agaras.
3. Ant lėkštelės žnyplėmis sudedami atitinkami antibiotikų diskai.
4. Lėkštelė inkubuojama $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 18-24 valandas.
5. Liniuote išmatuojamos augimo inhibicijos zonos. Zonos vertinamos pagal standartus, nurodytus 2007 metų leidinyje *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement*.

Vertinimas:

Augimo inhibicijos zonų diametrai interpretuojami kaip jautrumo kategorijos. Zonų diametrai pateikti 5 lentelėje.

Dedami antibiotikų diskai: penicilinas, oksacilinas, eritromicinas, gentamicinas, cefazolinas (9 pav.). Išauginus *S. aureus* šlapime, dedami diskai: ampicilinas, oksacilinas, gentamicinas, nitrofurantoinas, trimetoprim/sulfametoksazolis, cefazolinas, cefuroksimas.

Jei oksacilino zona yra vertinama kaip atsparu/mažai jautru, tai signalas, kad mikroorganizmas gali būti MRSA. Tyrimas pakartojamas papildomai uždedant cefoksitino ir vankomicino diskus.



9 pav. *Staphylococcus aureus* jautrumo antibiotikams nustatymas.

Cefoksitino disko testas yra tinkamiausias metodas *S. aureus* atsparumo tyrimui. Jis yra prilyginamas oksacilino disko testui, nustatant atsparumą oksacilinui. Tačiau cefoksitino disko tyrimą lengviau įvertinti, todėl jis tinkamesnis. Šiuo atveju cefoksitinas naudojamas kaip surogatas apibūdinti atsparumą oksacilinui.

MRSA nustatymui taip pat atliekamas peniciliną surišančio baltymo (PBP2') latekso agliutinacijos testas (45, 46).

5 lentelė. *S. aureus* jautrumo antibiotikams zonos ir jų vertinimai

Antibiotikas	Disko talpa	Atsparu	Mažai jautru/ Vidut. atsparu	Jautru
Pencilinas	10 vienetų	≤28	-	≥29
Oksacilinas	1 µg	≤10	11-12	≥13
Cefoksitinas	30 µg	≤21	-	≥22
Ampicilinas	10 µg	≤28	-	≥29
Cefazolinas	30 µg	≤14	15-17	≥18
Cefuroksimas	30 µg	≤14	15-17	≥18
Eritromicinas	15 µg	≤13	14-22	≥23
Gentamicinas	10 µg	≤12	13-14	≥15
Nitrofurantoinas	300 µg	≤14	15-16	≥17
Trimetoprim/ sulfametoksazolis	1.25/23.75 µg	≤10	11-15	≥16
Vankomicinas	30 µg	-	-	≥15

2.5.2. β-laktamazės aptikimas nitrocefino testu

Nitrocefino diskas yra reagentu impregnuotas diskas, naudojamas aptikti β-laktamazės gamybą bakterijose. β-laktamazė – fermentas, kurį gamina įvairūs organizmai. Tai atsparumą penicilinams ir cefalosporinams lemiantis fermentas. Šis testas atliekamas, kai diskų difuzijos metodu rodo jautrumą penicilinui ar ampicilinui.

Reaktyvus ingredientas – nitrocefinas.

Procedūra:

1. Žnyplėmis paimamas diskas ir padedamas ant švaraus stikliuko.
2. Diskas sudrėkinamas demineralizuotu vandeniu.
3. Sterilia kilpa paimamos 5-6 kolonijos ir ištrinamos ant disko.

4. Diskas inkubuojamas 1 valandą kambario temperatūroje.
5. Stebimas spalvos pasikeitimas.

Vertinimas:

Teigiamas testas – spalvos pasikeitimas į rožinę ar raudoną (10 pav.).

Neigiamas testas – spalva nepakinta (45).



10 pav. Nitrocefino testas: diskas kairėje – neigiamas rezultatas, dešinėje – teigiamas rezultatas.

2.5.3. Peniciliną surišančio baltymo (PBP2') latekso agliutinacijos testas

Šis testas yra greitos latekso agliutinacijos testas, aptinkantis PBP2' (taip pat vadinamą PBP2'a) *Staphylococcus* padermėse. Tai pagalbinis testas MRSA ir meticilinui atsparių PNS identifikavimui. Jie gamina PBP2' baltymą, koduojamą *mecA* geno. MRSA yra atsparus β -laktaminiams antibiotikams, t.y. visiems penicilinams, β -laktam/ β -laktamazės inhibitorių kombinacijoms, cefalosporinams ir karbapenemams.

Test Latex – lateksas, sensitizuotas su monokloniniu antikūnu prieš PBP2'.

Control Latex – lateksas, sensitizuotas su monokloniniu to pačio IgG poklasio antikūnu, nereaguojančiu su *S. aureus* baltymais.

Procedūra:

I. PBP2' ekstrakcija:

1. Į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį įlašinami 4 lašai ekstrakcijos reagento 1 (*Extraction Reagent 1*).
2. 5 μ l kilpele paimama keletas kolonijų, kad būtų pripildyta vidinė kilpelės kilpa (3-5 μ l - apie 1.5×10^9 ląstelių). Kultūra suspenduojama mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje. Vorteksuojama, jei yra gumuliukų. Turėtų būti matoma labai drumsta suspensija.
3. Mėgintuvėlis dedamas į verdantį vandenį ir kaitinamas 3 minutes.
4. Mėgintuvėlis išimamas ir atvėsinaamas kambario temperatūroje.

5. Į mėgintuvėlį įlašinamas 1 lašas ekstrakcijos reagento 2 (*Extraction reagent 2*) ir gerai sumaišoma.
6. Centrifuguojama 5 minutes 1500x g. Testui naudojamas supernatantas.

II. Latekso agliutinacija:

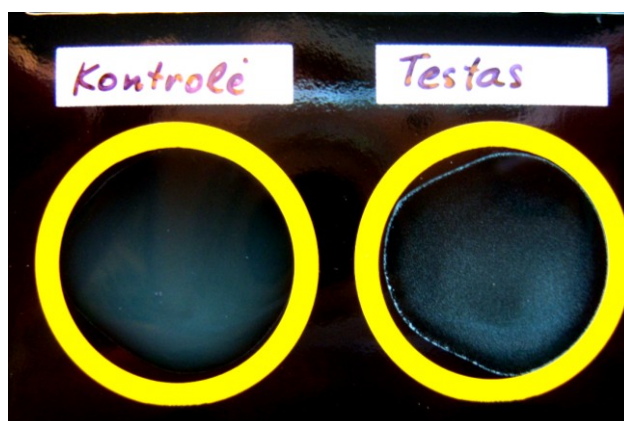
1. Vienas testo kortelės apskritimas naudojamas tyrimui (*Test Latex*), kitas – kontrolei (*Control Latex*). Į vieną apskritimą įlašinamas 1 lašas *Test Latex* reagento, į kitą – lašas *Control Latex* reagento.
2. Po 50µl supernatanto uždedama ant apskritimų. Lašuose supernatantas sumaišomas su *Test* ir *Control Latex*.
3. Kortelė paimama ir siūbuojama iki 3 minučių ir stebima, ar vyksta agliutinacija normaliame apšvietime.

Vertinimas:

Teigiamas rezultatas – per 3 minutes įvyksta agliutinacija su *Test*, bet ne *Control Latex* reagentu (11 pav.).

Neigiamas rezultatas – per 3 minutes neįvyksta agliutinacija nei su *Test*, nei su *Control Latex* reagentu..

Neinterpretuojamas rezultatas – per 3 minutes įvyksta agliutinacija su *Control Latex* reagentu (45).



11 pav. PBP2' latekso agliutinacijos testas: kairėje – kontrolė, dešinėje – teigiamas testas.

2.6. Statistinė analizė

Duomenų apie *Staphylococcus aureus* kultūras statistinė analizė buvo atlikta naudojant programą *SPSS Statistics 17.0*. Dumenys įvertinti Chi-kvadrato testu. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0.05$.

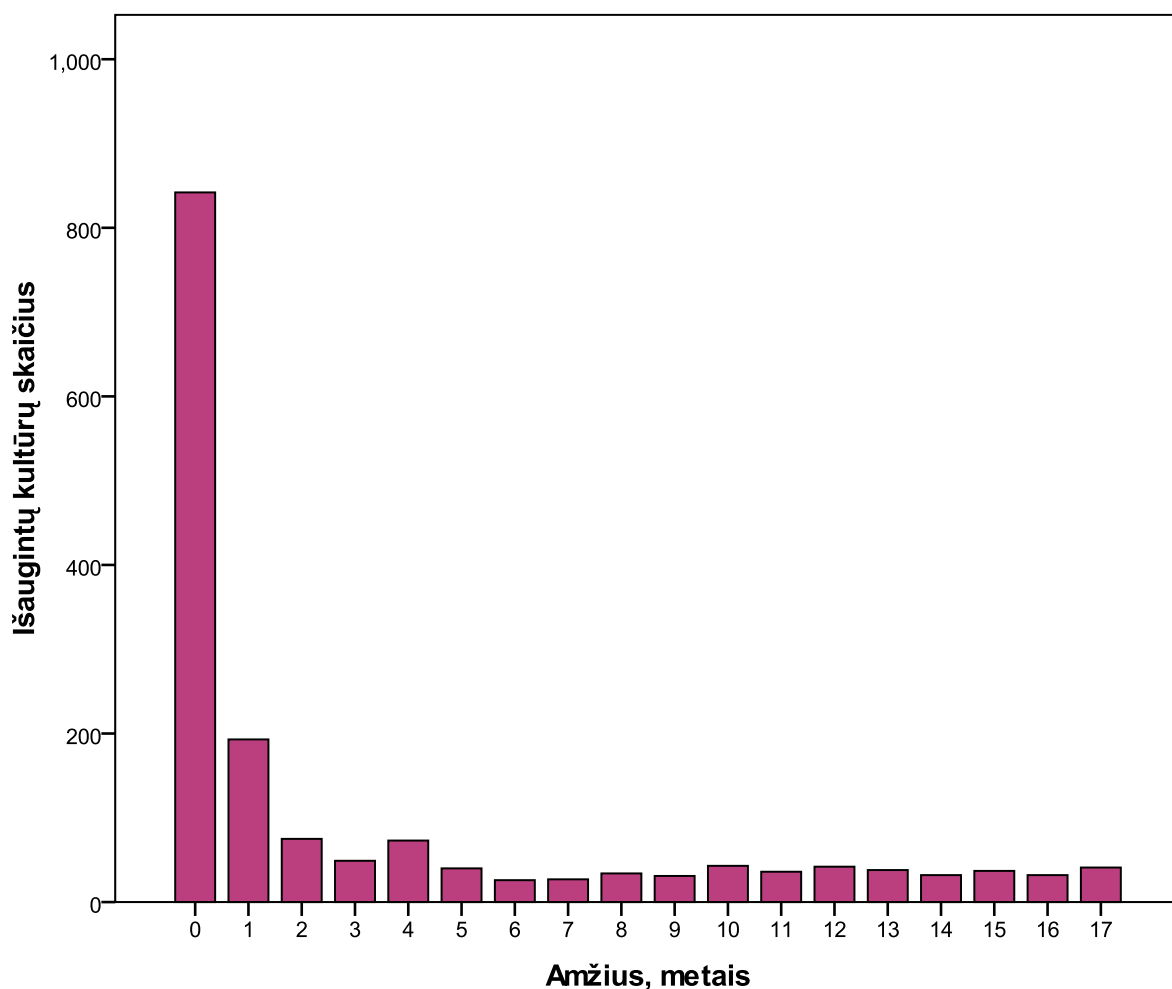
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. *S. AUREUS* DUOMENŲ ANALIZĖ PAGAL VAIKŲ LYTĮ, AMŽIŲ, PASĖLIŲ KILMĘ IR LIGOS DIAGNOZĘ

2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje iš pasėlių išskirta 1691 *S. aureus* kultūrų. Iš jų 803 (47.5%) pasėliai paimti iš mergaičių, o 888 (52.5%) – iš berniukų.

Pasėliai buvo imami vaikams nuo gimimo iki 18 metų amžiaus. Vaikams iki 1 metų amžiaus buvo išskirtos 842 kultūros (49.8%), o 1-18 m. vaikams - 849 kultūros (51.2%) (6, 7 lent.).

Daugiausia kultūrų buvo išauginta iki 2 metų amžiaus vaikams – 1035 kultūros (61.2%). Vyresnio amžiaus vaikams išaugintų *S. aureus* kultūrų skaičius mažėjo (12 pav.).



12 pav. Išskirtų *S. aureus* kultūrų skaičius pagal vaikų amžių

6 lentelė. Vaikams iki 1m. amžiaus išskirtos *S. aureus* kultūros

Amžius mėnesiais	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
0	216	12.8
1	158	9.3
2	109	6.4
3	84	5.0
4	59	3.5
5	56	3.3
6	38	2.2
7	37	2.2
8	22	1.3
9	26	1.5
10	28	1.7
11	9	0.5
Iš viso	842	49.8

7 lentelė. 1-18m. amžiaus vaikams amžiaus išskirtos *S. aureus* kultūros

Amžius metais	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
1	193	11.4
2	75	4.4
3	49	2.9
4	73	4.3
5	40	2.4
6	26	1.5
7	27	1.6
8	34	2.0
9	31	1.8
10	43	2.5
11	36	2.1
12	42	2.5
13	38	2.2
14	32	1.9
15	37	2.2
16	32	1.9
17	41	2.4
Iš viso	849	51.2

Iki 1 metų vaikams išaugintų *S. aureus* kultūrų skaičius yra reikšmingai didesnis nei vyresnio amžiaus vaikams ($p < 0.05$). Taip yra todėl, kad *Staphylococcus aureus* gali kolonizuoti naujagimius greitai po gimimo (per pirmąsias 24 valandas). Jis perduodamas iš motinų arba aplinkos. Potencialus infekcijos šaltinis yra ligoninių personalas, nešiojantis *S. aureus* (48-51).

Taip pat išaugintos *S. aureus* kultūros buvo suskirstytos pagal pasėlių kilmę. Daugiausia kultūrų buvo išauginta iš išmatų (52.4%), pūlių (29.3%) ir tepinėlių iš gerklės (14.0%) (8 lent., 13 pav.). Statistiškai reikšmingai daugiau kultūrų augo išmatose ($p < 0.05$) ir pūliuose ($p < 0.05$). Tepinėliuose iš gerklės augo statistiškai nereikšmingai daugiau kultūrų ($p > 0.05$).

S. aureus dažnai aptinkamas naujagimių virškinamajame trakte. Antibiotikams atsparios kultūros kolonizuoja virškinamąjį traktą nepriklausomai nuo to, kokius antibiotikus vartoja individualus kūdikis. *S. aureus* greitai įsitvirtina naujagimių virškinamajame trakte, greičiausiai dėl menkos konkurencijos su kitom žarnyno bakterijom. Vaikui augant, *S. aureus* kiekis žarnyne mažėja dėl didesnio suaugusiųjų mikrobiotos kompleksiskumo ir taip vadinamo “atsparumo kolonizacijai”, reiškiančio, kad vietinė žarnyno mikroflora apsaugo nuo žarnyno kolonizavimo egzogeniniais mikroorganizmais. Nustatyta, kad žarnyną kolonizavęs *S. aureus* gali paveikti naujagimio imuninę sistemą ir sukelti alergiją, atopinę egzemą ir dusimą. Hospitalizuotų pacientų *S. aureus* kolonizacija virškinamajame trakte yra siejama su padidėjusia stafilokokinės infekcijos rizika (52-57).

Vis dar neaišku, kaip *S. aureus* sukelia žarnyno infekcijas. Pagrindiniai mechanizmai yra gana paslaptingi, o etiologiniai procesai tik pradedami identifikuoti. Žarnyno *S. aureus* gali sukelti enteritą ar su antibiotikais asocijuotą diarėją (AAD) ir yra rizikos faktorius kitoms žarnyno infekcijoms. Taip pat dažnai apsinuodijama maistu, kuriame yra enterotoksigeninis *S. aureus*, sukeliantis diarėją (55-57). 2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje *S. aureus* buvo išskirtas iš išmatų vaikams, kurių ligos diagnozė buvo virškinamojo trakto bei žarnų funkcijos sutrikimai, enterovirusinės infekcijos, enterokolitas, gastritas, vėmimas, viduriavimas (diarėja), dehidratacija, pilvo pūtimas, karščiavimas, alerginės reakcijos ir kt.

Staphylococcus aureus gali daug metų kolonizuoti sveikų žmonių gerklę. 10% sveikų vaikų, jaunesnių nei 7 metų, gerklėje aptinkamas *S. aureus*. *S. aureus* gali asimptomiškai kolonizuoti gerklę, tačiau taip pat sukelia kvėpavimo takų infekcijas – pneumoniją, bronchitą, sinusitą ir kt. Jis yra asocijuojamas su pirmine naujagimių ir jaunų vaikų pneumonija bei antrine pneumonija po virusinės infekcijos bei laikomas viena iš dažniausių ligoninėje igytos

pneumonijos priežasčių. *S. aureus* dažnai prisideda prie cistine fibroze sergančių pacientų kvėpavimo takų ligų, infekuodamas 50% pacientų iki 10 metų amžiaus (58-62).

2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje *S. aureus* buvo išskirtas iš tonzilių ir skreplių vaikams, kuriems pasireiškė pneumonija, plaučių uždegimas, tonzilitas, faringitas, faringotonzilitas, laringitas, bronchitas, bronchinė astma, karščiavimas, cistinė fibrozė, adenoidų hipertrofija ir kt.

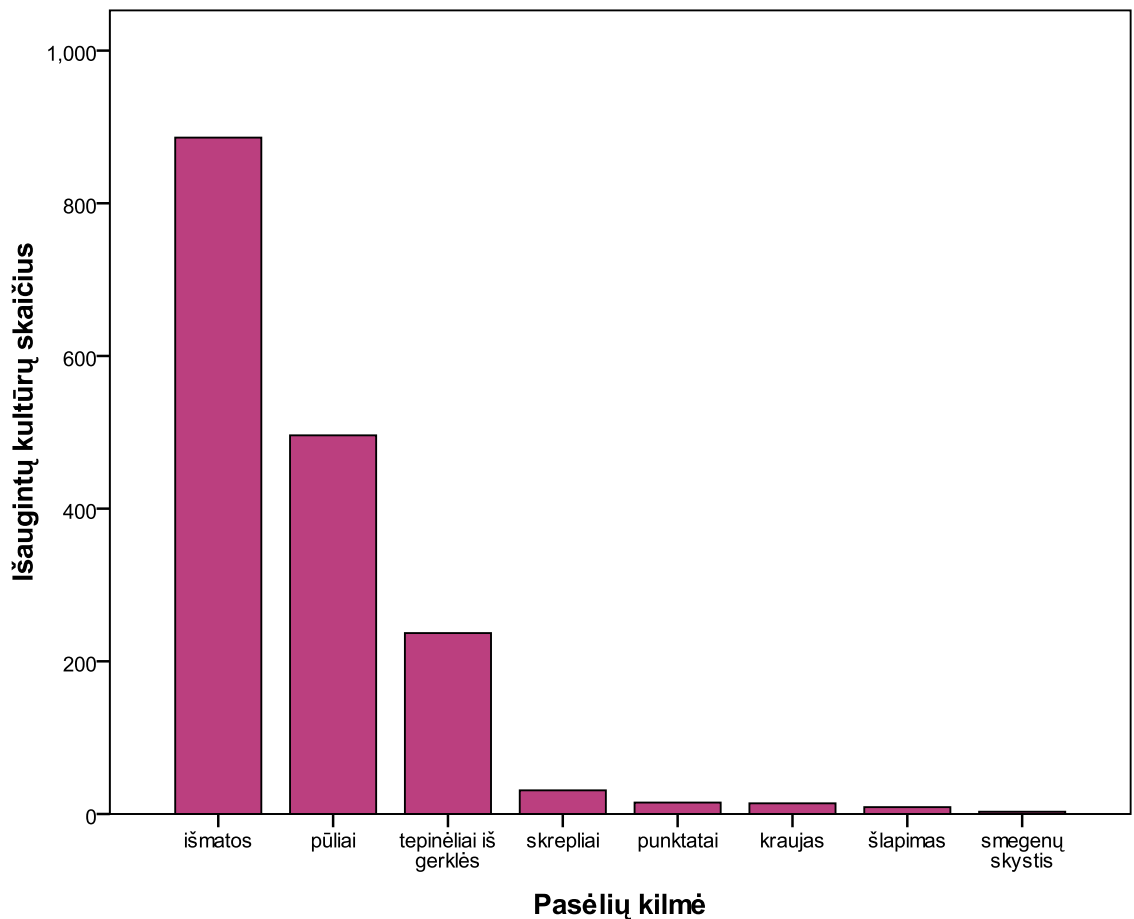
S. aureus infekcijos yra siejamos su abscesų formavimusi ir bakteriniu persistavimu. Stafilokokai auga grupėmis abscesų pažeidimų centre ir yra inkapsuliuoti pseudokapsulėse, kurios atskiria patogeną nuo imuninių ląstelių. *S. aureus* yra dažniausias etiologinis veiksnys, sukiantis odos abscesus. Stafilokokiniai odos ir minkštųjų audinių abscesai stipriai asocijuojami su žarnyno kolonizacija. *S. aureus* sukelia odos, žaizdų ir audinių infekcijas, septicemiją, akių infekcijas (konjunktivitą, keratitą, blefaritą), ausų, nosies, sinusų infekcijas ir kt. (63-67).

2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje *S. aureus* buvo išskirtas iš pūlių vaikams, kuriems nustatytos ligų diagnozės: odos pūliniai ir pūlinukai, abscesai, lūžių, nudegimų ir kt. žaizdos, flegmonos, furunkulai, limfadenitas, sepsis, piodermija, omfalitas, bėrimai, akių junginės uždegimas, konjunktivitas, otitas, sinusitas ir kt.

Iš kitų pasėlių (punktatai, kraujas, smegenų skystis, šlapimas) išskirtos 42 *S. aureus* kultūros (2.4%). Vaikams buvo diagnozuotas sepsis, meningitas, smegenų edema, osteomielitas, pneumonija, šlapimo takų infekcijos ir kt.

8 lentelė. Išskirtos *S. aureus* kultūros pagal pasėlių kilmę

Pasėlių kilmė	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
išmatos	886	52.4
pūliai	496	29.3
tepinėliai iš gerklės	237	14.0
skrepliai	31	1.8
punktatai	15	0.9
kraujas	14	0.8
šlapimas	9	0.5
smegenų skystis	3	0.2
Iš viso	1691	100.0



13 pav. Išskirtos *S. aureus* kultūros pagal pasėlių kilmę

Buvo palygintas išskirtų *S. aureus* kultūrų skaičius pagal pasėlių kilmę 2008 ir 2009 metais. 2009 m. *S. aureus* kultūrų iš išmatų išskirta statistiškai reikšmingai mažiau, o iš skreplių – statistiškai reikšmingai daugiau nei 2008 m. ($p < 0.005$). Palyginus kitus pasėlius, 2009 m. statistiškai nereikšmingai padaugėjo *S. aureus* iš pūlių, tepinėlių iš gerklės ir šlapimo, o sumažėjo – iš kraujo ir smegenų skysčio ($p > 0.05$) (9 lent.).

Galima svarstyti, kad žarnyno infekcijų galėjo sumažėti dėl probiotikų vartojimo arba mažėjančio enterotoksinus produkuojančių *S. aureus* skaičiaus. Tokiu atveju mažėtų siunčiamų ištirti išmatų, nes paprastai žarnyną kolonizuojantis *S. aureus* problemų nesukelia. Kita vertus, galima manyti, kad kitų stafilokokinių infekcijų daugėja, nes *S. aureus* yra labai paplitęs ir darosi vis virulentiškesnis, vis didesniai kiekiui žmonių ima kolonizuoti kvėpavimo takus ir odą ir sukelia daugiau susirgimų (68, 69).

9 lentelė. *S. aureus* kultūrų skaičius pasėliuose 2008-2009 m.

Pasėlio kilmė	2008		2009		<i>p</i>
	Kultūrų skaičius	%	Kultūrų skaičius	%	
Išmatos	515	54.9	371	49.3	0.002
Pūliai	264	28.1	232	30.8	0.067
Tepinėliai iš gerklės	124	13.2	113	15.0	0.143
Skrepliai	12	1.3	19	2.5	0.003
Kraujas	9	1.0	5	0.7	0.354
Punktatai	8	0.9	7	0.9	0.931
Šlapimas	4	0.4	5	0.7	0.251
Smegenų skystis	2	0.2	1	0.1	0.680
Iš viso	938	100.0	753	100.0	

2. *S. AUREUS* JAUTRUMO ANTIBIOTIKAMS DUOMENŲ ANALIZĖ

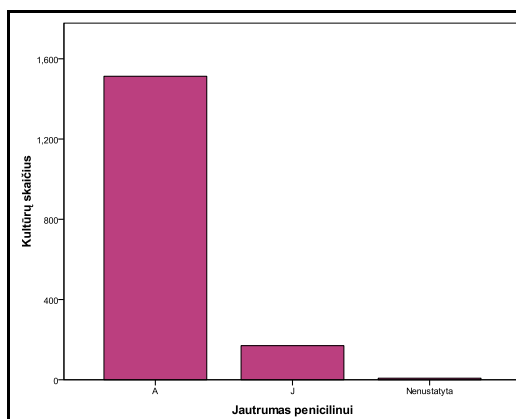
2.1. Jautrumas penicilinui

Klaipėdos vaikų ligoninėje rastas 89.5% *S. aureus* kultūrų atsparumas penicilinui (1513 kultūrų) (10 lent., 14pav.). Tai vidutiniškai atitinka kitus Lietuvos ligoninėse nustatytus *S. aureus* jautrumo penicilinui duomenis – 81.1-93.8% atsparumą penicilinui Kauno medicinos universiteto Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje, 83.1% Kauno ligoninėse, 89.0% Kauno medicinos universiteto Plastinės chirurgijos ir nudegimų skyriuje, 89.6-96.1% Kauno medicinos universiteto klinikų Chirurgijos klinikoje (70-73).

Šie ir tolimesni jautrumo duomenys lyginami tik su Kauno ligoninėmis, nes Lietuvoje nėra susistemintų duomenų apie *S. aureus* jautrumą antibiotikams, išskyrus EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) programą, kuri renka duomenis apie MRSA paplitimą Europos šalyse. Taip pat rasta labai mažai straipsnių apie *S. aureus* jautrumą antibiotikams Lietuvos ligoninėse (tik Kauno ligoninių straipsniai). Būtent dėl šios priežasties šis darbas yra ypač aktualus – jame pateiktais duomenimis apie *S. aureus* jautrumą antibiotikams galima vadovautis skiriant preliminarinius antibiotikus gydant stafilokokines infekcijas Klaipėdos vaikų ligoninėje.

10 lentelė. *S. aureus* jautrumas penicilinui

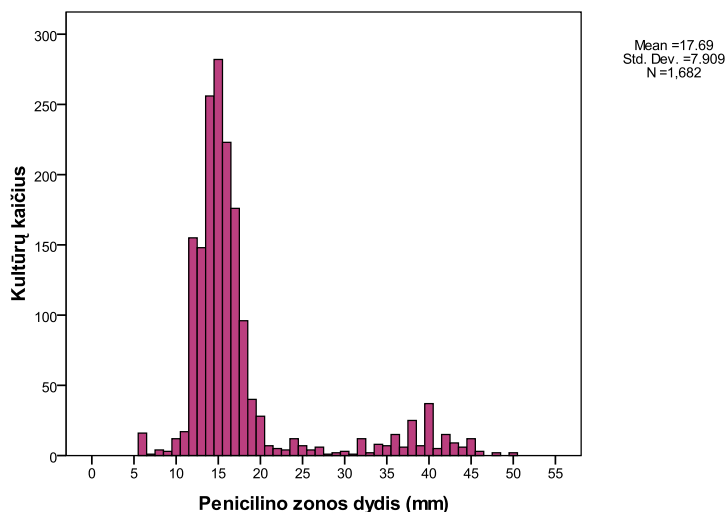
Jautrumas penicilinui	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
Jautru	170	10.1
Atsparu	1513	89.5
Nenustatyta	8	0.5
Iš viso	1691	100.0



14 pav. *S. aureus* jautrumas penicilinui

Penicilino zonų dydis svyravo nuo 6 mm iki 50 mm.

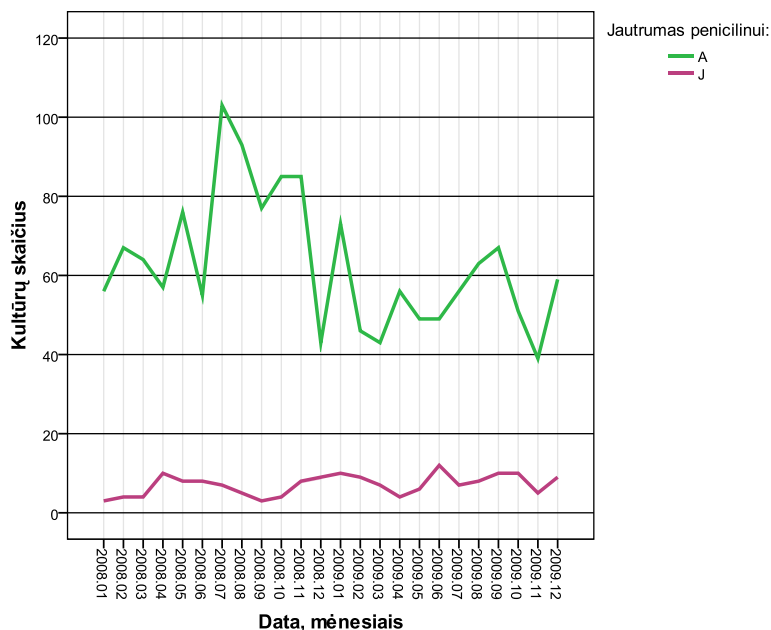
Daugiausia atsparių kultūrų zonų dydis buvo 12-18 mm, o jautrių – 38-40 mm (15 pav.).



15 pav. *S. aureus* jautrumo penicilinui zonų dydis

Staphylococcus aureus atsparių penicilinui kultūrų skaičius 2008-2009 metų mėnesiais labai svyravo. Daugiausia atsparių kultūrų nustatyta 2008m. liepos- lapkričio mėnesiais.

Jautrių kultūrų kiekio svyravimai buvo daug menkesni (16 pav.). Patikrinti, ar *S. aureus* kultūros tikrai jautrios penicilinui, buvo atliktas β -laktamazės testas.



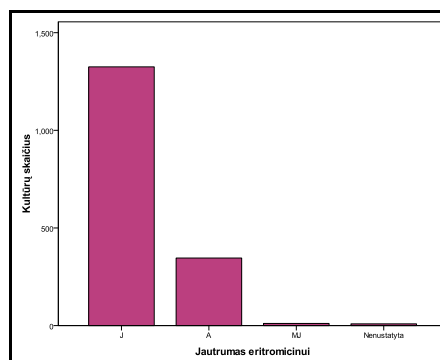
16 pav. Penicilinui jautrių ir atsparių kultūrų skaičius 2008-2009m.

2.2. Jautrumas eritromicinui

Pagal turimus duomenis apskaičiuota, kad eritromicinui atsparios 346 (20.5%), o mažai jautrios – 11 (0.7%) kultūrų (11 lent., 17 pav.). Šis atsparumas yra mažesnis už kitų Lietuvos ligoninių palyginus su atsparumo eritromicinui duomenimis - 29.9% atsparumu eritromicinui Kauno ligoninėse, 37.9-51.8% Kauno medicinos universiteto klinikų Chirurgijos klinikoje (70, 71).

11 lentelė. *S. aureus* jautrumas eritromicinui

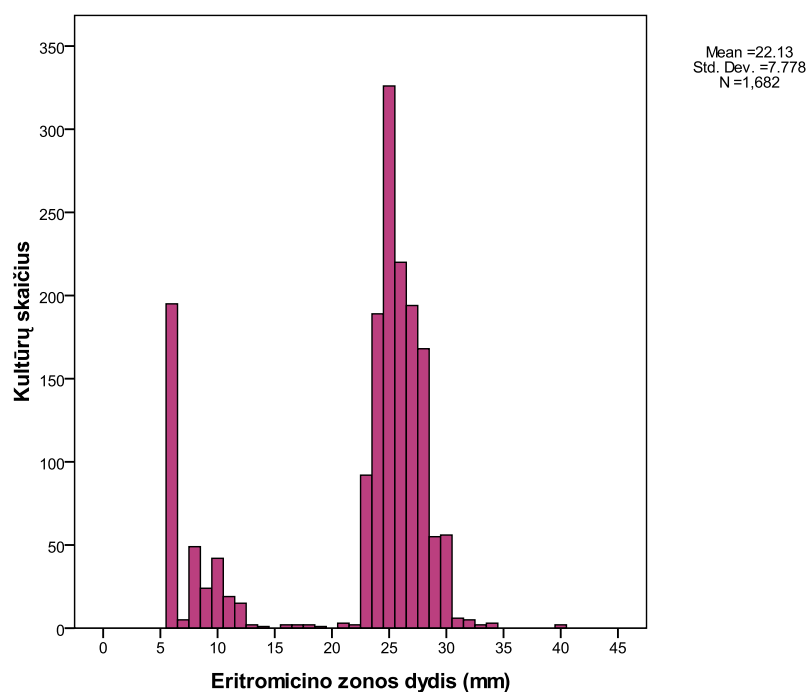
Jautrumas eritromicinui	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
J	1325	78.4
A	346	20.5
MJ	11	0.7
Nenustatyta	9	0.5
Iš viso	1691	100.0



17 pav. *S. aureus* jautrumas eritromicinui

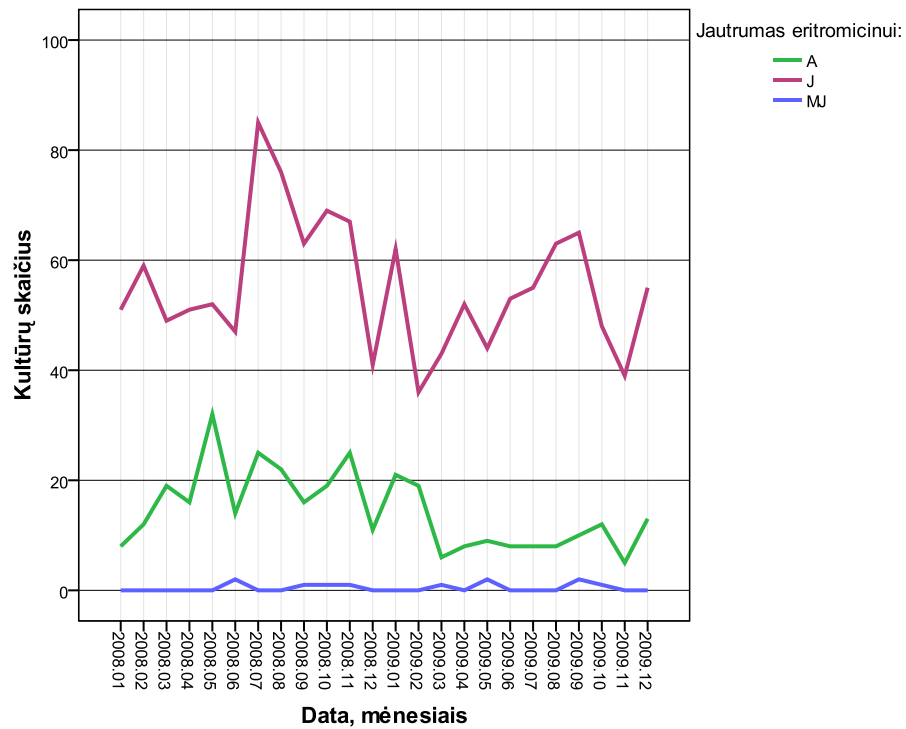
Eritromicino zonų dydis svyravo nuo 6 mm iki 34 mm (išimtis – 40 mm).

Daugiausia atsparių kultūrų zonų dydis buvo 6 mm, o jautrių – 23-28 mm (18 pav).



18 pav. *S. aureus* jautrumo eritromicinui zonų dydis

Staphylococcus aureus jautrių ir atsparių eritromicinui kultūrų kiekis 2008-2009 metų mėnesiais labai svyravo. Daugiausia atsparių kultūrų nustatyta 2008 m. gegužės, liepos ir lapkričio mėnesiais. Jautrių kultūrų daugiausia nustatyta 2008 m. liepos-lapkričio bei 2009 m. rugpjūčio-rugsėjo mėnesiais (19 pav.).



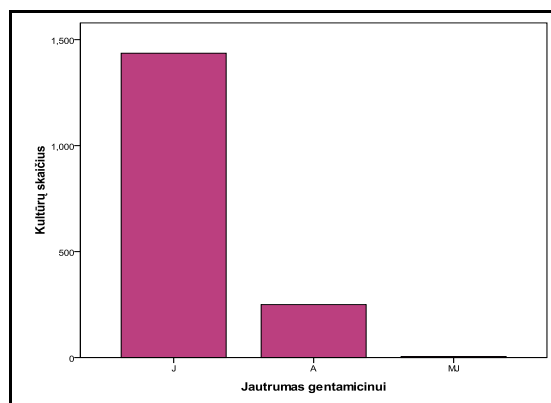
19 pav. Eritromicinui jautrių ir atsparių kultūrų skaičius 2008-2009m.

2.3. Jautrumas gentamicinui

Apskaičiuota, kad gentamicinui atsparios 250 (14.8%), mažai jautrios – 5 (0.3%) kultūros (12 lent., 20 pav.). Atsparumas gentamicinui daug mažesnis neigu kitose Lietuvos ligoninėse - 30.0% Kauno medicinos universiteto Plastinės chirurgijos ir nudegimų skyriuje, 37.7% Kauno medicinos universiteto Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje, 47.4-50.2% Kauno medicinos universiteto klinikų Chirurgijos klinikoje (70, 72, 73).

12 lentelė. *S. aureus* jautrumas gentamicinui

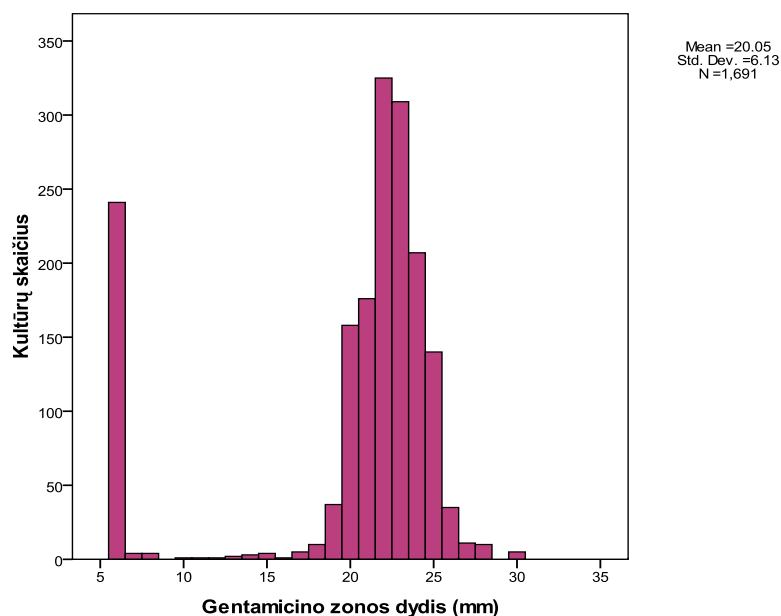
Jautrumas gentamicinui	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
J	1436	84.9
A	250	14.8
MJ	5	0.3
Iš viso	1691	100.0



20 pav. *S. aureus* jautrumas gentamicinui

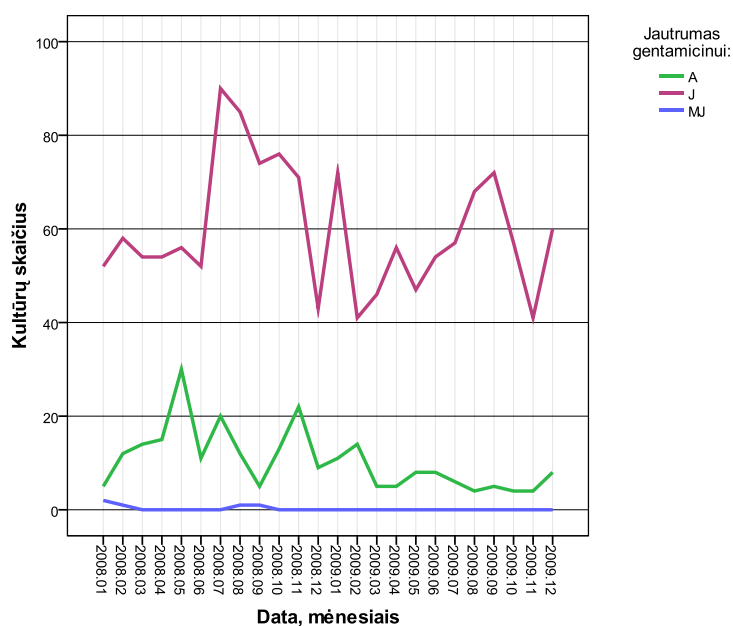
Gentamicino zonų dydis svyravo nuo 6 mm iki 30 mm.

Daugiausia atsparių kultūrų zonų dydis buvo 6 mm, o jautrių – 22-24 mm (21 pav.).



21 pav. *S. aureus* jautrumo gentamicinui zonų dydis

Staphylococcus aureus jautrių ir atsparių gentamicinui kultūrų 2008-2009 metų mėnesiais labai svyravo. Daugiausia atsparių kultūrų nustatyta 2008 m. gegužės, liepos ir lapkričio mėnesiais. Jautrių kultūrų daugiausia nustatyta 2008 m. liepos-lapkričio bei 2009 m. sausio, rugpjūčio ir rugsėjo mėnesiais (22 pav.).



22 pav. Gentamicinui jautrių ir atsparių kultūrų skaičius 2008-2009m.

2.4. Eritromicino ir gentamicino koreliacija

13 lentelė. Jautrumo eritromicinui ir gentamicinui dažnių lentelė

Jautrumo eritromicinui ir gentamicinui dažniai			Jautrumas gentamicinui			Iš viso	
			A	J	MJ		
Jautrumas eritromicinui	Nenustatyta	Kiekis	3	6	0	9	
		% iš viso	0.2%	0.4%	0.0%	0.5%	
	A	Kiekis	233	112	1	346	
		% iš viso	13.8%	6.6%	0.1%	20.5%	
	J	Kiekis	14	1307	4	1325	
		% iš viso	0.8%	77.3%	0.2%	78.4%	
	MJ	Kiekis	0	11	0	11	
		% iš viso	0.0%	0.7%	0.0%	0.7%	
	Iš viso		Kiekis	250	1436	5	1691
			% iš viso	14.8%	84.9%	.3%	100.0%

Pastebėta, kad jeigu *S. aureus* atsparus eritromicinui, jis taip pat beveik visada atsparus gentamicinui ir atv. (13 lent.). Chi-kvadrato testas naudotas patikrinti hipotezę, ar tarp *S. aureus* jautrumo eritromicinui ir gentamicinui yra koreliacija. Kadangi tiek pagal Pirsono formulę (*Pearson Chi-Square*), tiek pagal tikėtinumo santykio formulę (*Likelihood Ratio*) $p=0.000$ yra mažesnis už reikšmingumo lygmenį 0.05, tai požymiai yra statistiškai priklausomi – *S. aureus* kultūrų jautrumas eritromicinui ir gentamicinui koreliuoja.

2.5. Jautrumas oksacilinui

Iš turimų duomenų nustatyta, kad oksacilinui atsparios – 3 (0.2%), mažai jautrios – 3 (0.2%) kultūrų (14 lent., 23 pav.). Atsparioms ir mažai jautrioms oksacilinui kultūroms patikrintas jautrumas cefoksitinui ir vankomicinui. Nustatyta, kad oksacilinui mažai jautrios kultūros buvo jautrios cefoksitinui. Tuo tarpu visos 3 oksacilinui (taip pat ir penicilinui bei cefazolinui) atsparios kultūros atsparios ir cefoksitinui, bet jautrios vankomicinui ir eritromicinui. Viena iš trijų kultūrų taip pat buvo atspari gentamicinui.

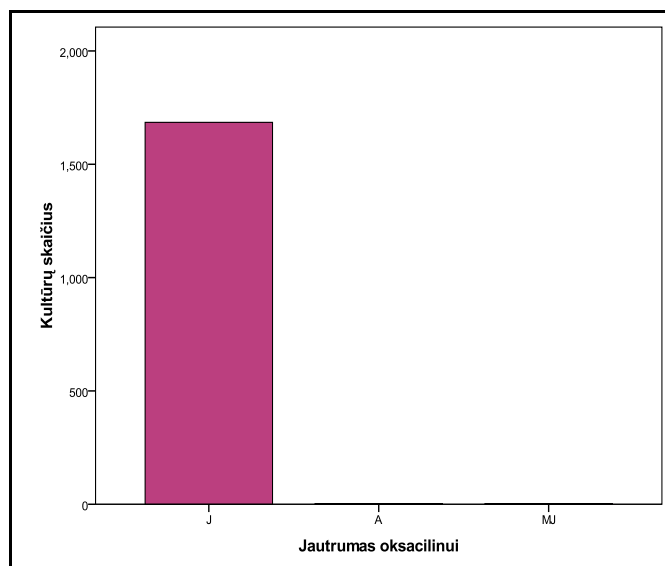
MRSA nustatymui buvo atliktas peniciliną surišančio baltymo (PBP2') latekso agliutinacijos testas. Visais trimis atvejais testas buvo teigiamas.

Per 2008-2009 metus Klaipėdos vaikų ligoninėje nustatytos 3 MRSA kultūros iš 1691 *Staphylococcus aureus* kultūrų (0.2%). Šis rodiklis yra daug mažesnis už bendrus Lietuvos duomenis. Pagal EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) duomenis, apimančius 92% Lietuvos populiacijos, 2008 m. Lietuvoje nustatyta 11% MRSA kultūrų (74).

2008 m. išskirta 1 MRSA kultūra iš pūlių, o 2009 m. išskirtos 2 MRSA kultūros – atitinkamai iš pūlių ir fekalijų.

14 lentelė. *S. aureus* jautrumas oksacilinui

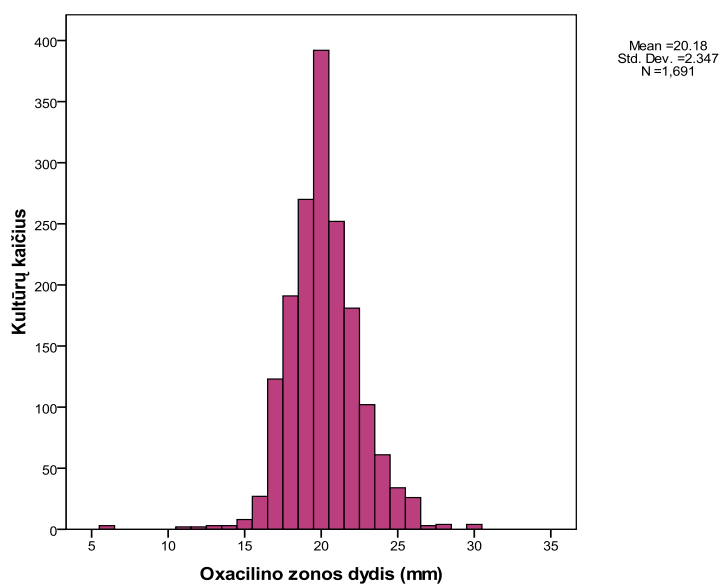
Jautrumas oksacilinui	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
J	1685	99.6
A	3	0.2
MJ	3	0.2
Iš viso	1691	100.0



23 pav. *S. aureus* jautrumas oksacilinui

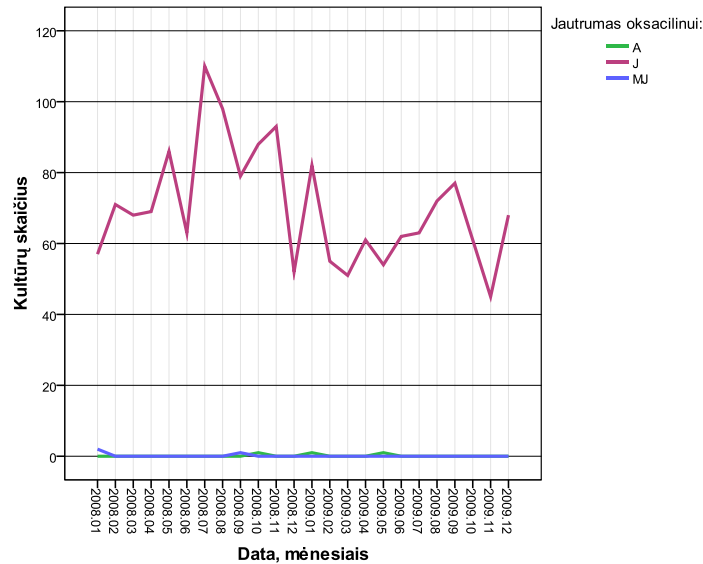
Oksacilino zonų dydis svyravo nuo 11 mm iki 30 mm (išimtis – 6mm).

Daugiausia jautrių kultūrų zonų dydis 18-22 mm (24 pav.).



24 pav. *S. aureus* jautrumo oksacilinui zonų dydis

Staphylococcus aureus jautrių oksacilinui kultūrų kiekis 2008-2009 metų mėnesiais svyravo. Daugiausia jautrių kultūrų nustatyta 2008 m. gegužės, liepos-lapkričio bei 2009 m. sausio, rugpjūčio ir rugsėjo mėnesiais. Oksacilinui atsparios kultūros (MRSA) nustatytos 2008 m. spalio bei 2009 m. sausio ir gegužės mėnesiais (25 pav.).



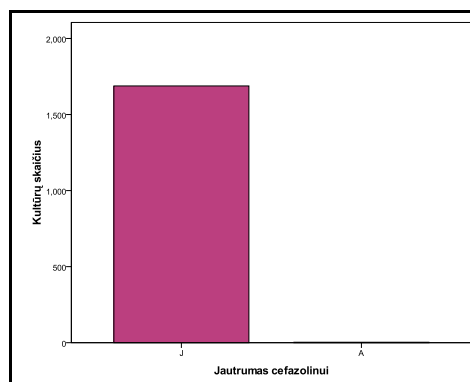
25 pav. Oksacilinui jautrių ir atsparių kultūrų skaičius 2008-2009m.

2.6. Jautrumas cefazolinui

Cefazolinui atsparios 3 kultūros (0.2%) (15 lent., 26 pav.). Šios kultūros yra MRSA, todėl jos atsparios penicilinams ir cefaloporinams. Kitose Lietuvos ligoninėse nustatytas didesnis atsparumas cefazolinui – 14.6% Kauno medicinos universiteto Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje (73).

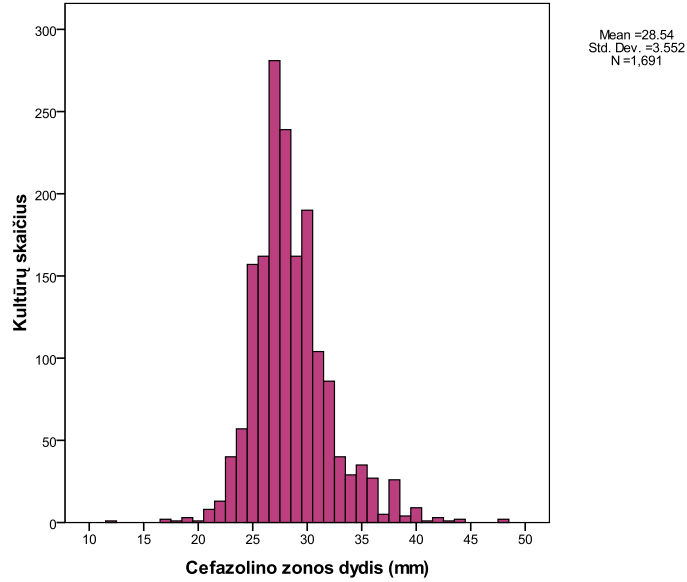
15 lentelė. *S. aureus* jautrumas cefazolinui

Jautrumas oksacilinui	Kultūrų skaičius	Kultūrų skaičius %
J	1688	99.8
A	3	0.2
Iš viso	1691	100.0



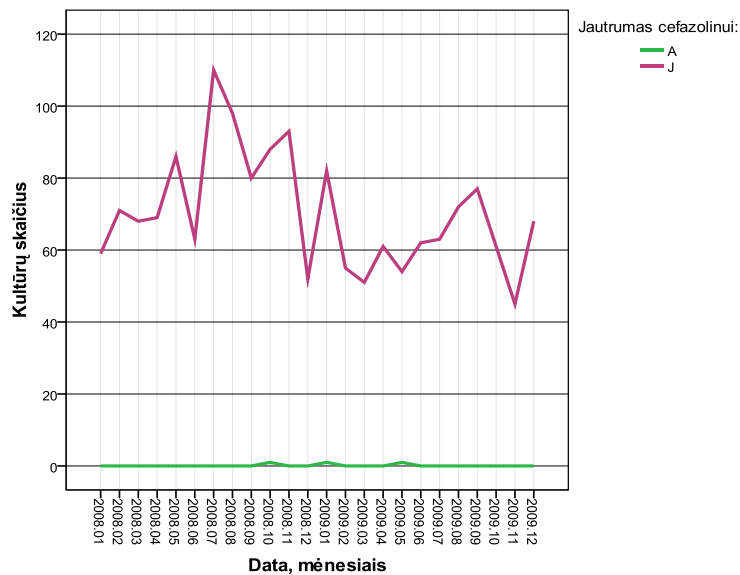
26 pav. *S. aureus* jautrumas oksacilinui

Cefazolino zonų dydis svyravo nuo 17 mm iki 44 mm (išimtys – 12 ir 48 mm).
 Daugiausia jautrių kultūrų zonų dydis svyravo intervale 25-30 mm (27 pav.).



27 pav. *S. aureus* jautrumo cefazolinui zonų dydis

Staphylococcus aureus jautrių cefazolinui kultūrų skaičius 2008-2009 metų mėnesiais labai svyravo. Daugiausia jautrių kultūrų nustatyta 2008 m. gegužės, liepos-lapkričio bei 2009 m. sausio, rugpjūčio ir rugsėjo mėnesiais. Cefazolinui atsparios kultūros (MRSA) nustatytos 2008 m. spalio bei 2009 m. sausio ir gegužės mėnesiais (28 pav).



28 pav. Cefazolinui jautrių ir atsparių kultūrų skaičius 2008-2009m.

2.7. Jautrumas kitiems antibiotikams

Staphylococcus aureus yra reta vaikų šlapimo takų infekcijos priežastis, nesant įkištų kateterių ar kitų infekcijos šaltinių (75).

2008-2009 metais iš šlapimo buvo išskirtos 9 *S. aureus* kultūros (0.5%). Iš šlapimo išskirtoms *S. aureus* kultūroms buvo tiriamas jautrumas ampicilinui, oksacilinui, gentamicinui, trimetoprim/sulfametoksazolui, nitrofurantoinui, cefazolinui ir cefuroksimui.

Visos 9 kultūros buvo atsparios ampicilinui, tačiau jautrios oksacilinui, trimetoprim/sulfametoksazolui, nitrofurantoinui, cefazolinui ir cefuroksimui.

Iš 9 kultūrų 3 buvo atsparios gentamicinui (33.3%).

2.8. Jautrumo antibiotikams kitimas 2008-2009 metais

Chi kvadrato testu palygintas 2008 ir 2009 metų atsparumas antibiotikams. Atsparumas oksacilinui ir cefazolinui statistiškai nereikšmingai padidėjo ($p>0.05$). Atsparumas penicilinui, eritromicinui ir gentamicinui statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p<0.05$) (16 lent.).

Atsparumas antimikrobiniam vaistams galėjo sumažėti dėl racionalaus antibiotikų vartojimo (70).

16 lentelė. *S. aureus* atsparumo antimikrobiniam vaistams kitimas 2008-2009m.

Antibiotikas	2008		2009		p
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%	
Penicilinas	861	91.8	651	86.5	0.000
Eritromicinas	219	23.3	127	16.9	0.000
Gentamicinas	168	17.9	82	10.9	0.000
Oksacilinas	1	0.1	2	0.3	0.151
Cefazolinas	1	0.1	2	0.3	0.151

Taip pat palyginti *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš išmatų, pūlių ir tepinėlių iš gerklės, jautrumo penicilinui, eritromicinui ir gentamicinui pokyčiai 2008 ir 2009 metais.

Palyginus su 2008 m., 2009 m. statistiškai reikšmingai sumažėjo *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš pūlių ir tepinėlių iš gerklės, atsparumas penicilinui ($p<0.05$). Statistiškai nereikšmingai sumažėjo *S. aureus* iš išmatų atsparumas penicilinui ($p>0.05$) (17 lent.).

17 lentelė. *S. aureus* jautrumo penicilinui kitimas 2008-2009 m.

Pasėlio kilmė	2008		2009		p
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%	
Išmatos	464	90.1	326	87.9	0.150
Pūliai	254	96.2	210	90.5	0.000
Tepinėliai iš gerklės	112	90.3	86	76.1	0.000

2009 m. statistiškai reikšmingai sumažėjo *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš išmatų ir pūlių, atsparumas eritromicinui ($p < 0.05$). Statistiškai reikšmingai padidėjo *S. aureus* iš tepinėlių iš gerklės atsparumas eritromicinui ($p < 0.05$) (18 lent.).

18 lentelė. *S. aureus* jautrumo eritromicinui kitimas 2008-2009 m.

Pasėlio kilmė	2008		2009		p
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%	
Išmatos	151	29.3	91	24.5	0.037
Pūliai	57	21.6	20	8.6	0.000
Tepinėliai iš gerklės	6	4.8	12	10.6	0.004

2009 m. statistiškai reikšmingai sumažėjo *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš pūlių, atsparumas gentamicinui ($p < 0.05$). *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš išmatų, atsparumas gentamicinui sumažėjo statistiškai nereikšmingai ($p > 0.05$). Statistiškai nereikšmingai padidėjo *S. aureus* iš tepinėlių iš gerklės atsparumas gentamicinui ($p > 0.05$) (19 lent.).

19 lentelė. *S. aureus* jautrumo gentamicinui kitimas 2008-2009 m.

Pasėlio kilmė	2008		2009		p
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%	
Išmatos	117	22.7	70	18.9	0.078
Pūliai	43	16.3	8	3.4	0.000
Tepinėliai iš gerklės	3	2.4	4	3.5	0.429

Iš kitų pasėlių išaugo per mažas skaičius *S. aureus* kultūrų statistiniam palyginimui. Jų jautrumo antibiotikams kitimas palygintas ne statistiškai.

2009 m. atsparumas penicilinui sumažėjo tik *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš skreplių. Iš kitų pasėlių išskirtų kultūrų atsparumas penicilinui buvo lygus 100 % (20 lent.).

20 lentelė. *S. aureus* jautrumo penicilinui kitimas kituose pasėliuose 2008-2009 m.

Pasėlių kilmė	2008		2009	
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%
Skrepliai	12	100.0	16	84.2
Kraujas	9	100.0	5	100.0
Punktatai	8	100.0	7	100.0
Smegenų skystis	2	100.0	1	100.0

S. aureus atsparumas eritromicinui 2009 m. sumažėjo taip pat tik kultūrų, išskirtų iš skreplių, o padidėjo – iš kraujo pasėlių. Visos *S. aureus* kultūros, išskirtos iš punktatai ir smegenų skysčio, buvo jautrios eritromicinui (21 lent.).

21 lentelė. *S. aureus* jautrumo eritromicinui kitimas kituose pasėliuose 2008-2009 m.

Pasėlių kilmė	2008		2009	
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%
Skrepliai	3	25.0	2	10.5
Kraujas	2	22.2	2	40.0
Punktatai	0	0.0	0	0.0
Smegenų skystis	0	0.0	0	0.0

2009 m. sumažėjo *S. aureus* kultūrų, išskirtų iš kraujo atsparumas gentamicinui. Visos *S. aureus* kultūros iš kitų pasėlių buvo jautrios gentamicinui (22 lent.).

22 lentelė. *S. aureus* jautrumo gentamicinui kitimas kituose pasėliuose 2008-2009 m.

Pasėlių kilmė	2008		2009	
	Atsparių kultūrų sk.	%	Atsparių kultūrų sk.	%
Skrepliai	0	0.0	0	0.0
Kraujas	2	22.2	0	0.0
Punktatai	0	0.0	0	0.0
Likvoras	0	0.0	0	0.0

S. aureus atsparumas oksacilinui ir cefazolinui 2008-2009 metais buvo labai mažas (0.2%). 2008 m. išskirta 1 MRSA kultūra iš pūlių (0.1%) , o 2009 m. išskirtos 2 MRSA kultūros – atitinkamai iš pūlių ir fekalijų (0.3%). Chi kvadrato metodu apskaičiuota, kad MRSA kultūrų skaičius 2009 metais statistiškai nereikšmingai padidėjo, lyginant su 2008 metais ($p>0.05$).

MRSA kultūros iš pūlių išskirtos 2 paauglėms mergaitėms. MRSA kultūros buvo atsparios penicilinui, oksacilinui ir cefazolinui; jautrios – eritromicinui, gentamicinui ir vankomicinui.

MRSA kultūra iš išmatų buvo išskirta naujagimiui berniukui. Ši kultūra buvo atspari penicilinui, oksacilinui, gentamicinui ir cefazolinui; jautri – eritromicinui ir vankomicinui.

IŠVADOS

1. Atlikus 2008-2009 m. Klaipėdos vaikų ligoninėje išskirtų *S. aureus* kultūrų analizę nustatyta, kad:
 - a) Vaikams iki 1 metų amžiaus išskiriama statistiškai reikšmingai daugiau *Staphylococcus aureus* kultūrų negu vyresnio amžiaus vaikams.
 - b) *S. aureus* vaikams dažniausiai sukelia žarnyno infekcijas, antroje vietoje – pūlingas infekcijas, trečioje vietoje – kvėpavimo takų infekcijas.
2. Atlikus *S. aureus* kultūrų jautrumo antibiotikams analizę, nustatyta:
 - a) Atsparumas penicilinui yra didelis, tai atitinka kitų Lietuvos ligoninių atsparumą penicilinui.
 - b) Atsparumas kitiems antibiotikams (eritromicinui, gentamicinui, oksacilinui, cefazolinui) yra nedidelis – mažesnis nei kitų Lietuvos ligoninių.
 - c) *S. aureus* kultūrų jautrumas eritromicinui ir gentamicinui koreliuoja – požymiai yra statistiškai priklausomi.
 - d) Palyginus 2008 ir 2009 m., statistiškai reikšmingai sumažėjo *S. aureus* atsparumas penicilinui, eritromicinui ir gentamicinui.
 - e) Preliminariam *S. aureus* infekcijos gydymui Klaipėdos vaikų ligoninėje galima skirti oksaciliną ar cefazoliną; antro pasirinkimo antibiotikai – eritromicinas ir gentamicinas.

ABSTRACT

The Analysis of *Staphylococcus aureus*' Susceptibility to Antibiotics in Klaipėda's Children Hospital in 2008-2009

Staphylococcus aureus is one of the most common cause of infections. It's relevant to know regional data of antimicrobial susceptibility to be able to prescribe effective drugs against *S. aureus* before knowing the susceptibility of a specific culture.

Objective. The analysis of *Staphylococcus aureus*' susceptibility to antibiotics in Klaipėda's children hospital in 2008-2009. In order to implement it, these tasks were established: 1) to analyse *Staphylococcus aureus*' cultures isolated from clinical material in Klaipėda's children hospital in 2008-2009; 2) to determine the antibiotic susceptibility of *S. aureus*' cultures and perform the analysis of antibiotic susceptibility in 2008-2009.

Methods. *S. aureus* was isolated by cultivating it on specific agars, catalase test, Gram staining; plasma coagulase test. Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion method; β -lactamase detection – by nitrocefin test; MRSA detection – by penicillin-binding protein (PBP') late agglutination test. Statistical analysis was performed with program *SPSS Statistics 17.0*.

Results. In Klaipėda's children hospital 1691 cultures of *S. aureus* were isolated in 2008-2009. Statistically relevant higher number of *S. aureus*' cultures was isolated from children aged less than one year old. Most cultures were isolated from faeces (52.4%), pus (29.3%) and throat swabs (14.0%). 89.5% resistance to penicillin was determined. 20.5% and 0.7% of cultures were resistant and intermediate to erythromycin; 14.8% and 0.3% of cultures were resistant and intermediate to gentamicin; 0.2% of each of cultures were resistant (MRSA) and intermediate to oxacillin; 0.2% of cultures were resistant to cefazolin. The decrease of resistance to penicillin, erythromycin and gentamicin in 2009 was statistically significant. The increase of resistance to oxacillin and cefazolin in 2009 was statistically insignificant.

Conclusions. In Klaipėda's children hospital *S. aureus* mostly caused gastrointestinal, purulent and respiratory infections. Mostly affected children were younger than one year old. High resistance to penicillin was determined (it moderately matches data from other Lithuania's hospitals). Resistance to other antibiotics (erythromycin, gentamicin, oxacillin, cefazolin) was lower than in other Lithuania's hospitals. There is correlation between resistance to erythromycin and gentamicin. *S. aureus* resistance to penicillin, erythromycin and gentamicin decreased in 2009, to compare with 2008. While treating staphylococcal infection in Klaipėda's children hospital oxacillin or cefazolin should be prescribed as preliminary antibiotics; erythromycin and gentamicin should be antibiotics of second choice.

LITERATŪRA

1. McClatchey K.D. Staphylococci and Related Genera. Clinical laboratory medicine. 2001; 51:1074-1077.
2. <http://www.uniprot.org/taxonomy/1280>; prisijungimo data: 2008-10-12.
3. Freney J. et all. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49 (2): 489-502.
4. Rowlinson et all. Isolation of a Strictly Anaerobic Strain of *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Microbiol. 2006; 44 (3): 857-860.
5. Ghebremedhin B. et all. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Gene Sequences. J Clin Microbiol. 2008; 46 (3): 1019-1025.
6. Layer F. et all. Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 2006; 44 (8): 2824-2830.
7. Delmas J. et all. Evaluation of the Vitek 2 System with a Variety of *Staphylococcus* Species. J Clin Microbiol. 2008; 46 (1): 311-313.
8. Iorio N. et all. Simplified and Reliable Scheme for Species-Level Identification of *Staphylococcus* Clinical Isolates. J Clin Microbiol. 2007; 45 (8): 2564-2569.
9. Sung J. et all. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology. 2008; 154: 1949-1959.
10. Fournier B., Philpott D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(3): 521-40.
11. Bratcher D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Nurseries. NeoReviews. 2005; 6 (9): 424.
12. <http://swampie.files.wordpress.com/2008/02/staphylococcus-aureus.jpg>; prisijungimo data: 2009-02-16.
13. Lowy F. *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med. 1998; 339(8): 520-32.
14. Baba T. et all. Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. J Bacteriol. 2008; 190 (1): 300-310.
15. O'Riordan K., Lee J. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 2004; 17 (1): 218-234.
16. Hata E. et all. Bacteriological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Humans and Bulk Milk. J. Dairy Sci. 2008; 91: 564-569.

17. Manna A.C., Cheung A.L. Expression of SarX, a Negative Regulator of *agr* and Exoprotein Synthesis, Is Activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2006; 188(12): 4288-99.
18. Sifri C. et al. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. Infect Immun. 2003; 71(4): 2208-17.
19. Ito T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat. 2003; 6(1): 41-52.
20. Grundmann H. et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as public-health threat. Lancet. 2006; 368: 874-85.
21. <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Methicillin.png/220px-Methicillin.png>; prisijungimo data: 2010-04-03.
22. Tsiodras S. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001; 358(9277): 207-8.
23. Besier S. et al. Linezolid Resistance in *Staphylococcus aureus*: Gene Dosage Effect, Stability, Fitness Costs, and Cross-Resistances. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4): 1570-2.
24. Karchmer A. From theory to practice: resistance in *Staphylococcus aureus* and new treatments. Clin Microbiol Infect. 2006; 12(8): 15-21.
25. Mangili A. et al. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2005; 1;40(7):1058-60.
26. Marty F.M. et al. Emergence of a Clinical Daptomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate during Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Osteomyelitis. J Clin Microbiol. 2006; 44(2): 595–597.
27. Salinas J. et al. Necrotizing Fasciitis in an Adult Male. Lab Med. 2004; 35:154-157.
28. Hardy K.J. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. Br J Anaesth. 2004; 92(1): 121-130.
29. Malik Z.A., Litman N. The Penicillins. Pediatr Rev. 2006; 27: 471-473.
30. Cohen S., Sweeney H.M. Constitutive Penicillinase Formation in *Staphylococcus aureus* Owing to a Mutation Unlinked to the Penicillinase Plasmid. J Bacteriol. 1968; 95(4): 1368-1374.
31. Kondo I. et al. Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the Penicillinase Plasmid in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1974; 117(1): 1-7.

32. Hawkyard C.V., Koerner R.J. The use of erythromycin as a gastrointestinal prokinetic agent in adult critical care: benefits versus risks. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(3): 347-358.
33. Steward C.D. et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(4): 1716-1721.
34. Levin T.P et al. Potential Clindamycin Resistance in Clindamycin-Susceptible, Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a Clinical Failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(3): 1222-1224.
35. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 20-51.
36. Schmitz F. et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43: 253-259.
37. Schaaff F. Et al. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2003; 293(6): 427-435.
38. Harbarth S. Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – recent advances and future challenges. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(12): 1154-63.
39. Brown D. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(6):1000-1018.
40. <http://cbmg.umd.edu/>; prisijungimo data: 2008-11-02.
41. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Staining procedures, BSOP TP 39. 2007.
42. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Catalase Test. BSOP TP 8. 2007.
43. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Coagulase Test. BSOP TP 10. 2007.
44. <http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2987&Lang=>; prisijungimo data: 2010-03-11.
45. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Susceptibility Testing. BSOP 45. 2007.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. 2007; 27 (1): 52-60.
47. Arnason S et al. Bacteraemia in children in Iceland 1994-2005. *Laeknabladid.* 2008; 94(7-8): 523-9.

48. Huang Y.C. et al. Association of *Staphylococcus aureus* colonization in parturient mothers and their babies. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(8): 742-4.
49. Brauncajs M. et al. Microorganisms isolated from healthy newborns in the first and third twenty-four hours. *Med Dosw Mikrobiol.* 2009; 61(2): 153-8.
50. Torre I. et al. Genomic typing techniques in a case of skin infection epidemic by *Staphylococcus aureus* in a newborn unit]. *Ann Ig.* 2003; 15(6): 895-901.
51. Matussek A. et al. Transmission of *Staphylococcus aureus* from maternity unit staff members to newborns disclosed through spa typing. *Am J Infect Control.* 2007; 35(2): 122-5.
52. Lindberg E. et al. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* colonising the intestines of Swedish infants. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(10): 890-4.
53. Lindberg E. et al. High Rate of Transfer of *Staphylococcus aureus* from Parental Skin to Infant Gut Flora. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(2): 530-4.
54. Vesterlund S. et al. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology.* 2006; 152: 1819-26.
55. Acton D.S. et al. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28:115–127.
56. Efuntoye M.O. Enterotoxigenicity And Drug Sensitivity Of Staphylococci From Children Aged Five Years And Below With Sporadic Diarrhoea. *East Afr Med J.* 2003; 80(12): 656-9.
57. Bhalla A. et al. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of *S. aureus* on skin of hospitalized patients. *BMC Infectious Diseases.* 2007; 7: 105.
58. Hamdan-Partida A et al. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* isolated from the anterior nares and throat from healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol.* 2010.
59. Bernardo M., Ueno M. Incidence of *Staphylococcus aureus* colonization in children attending day-care centers. *Rev Panam Infectol.* 2008; 10(1): 20-3.
60. Moreilhon C. et al. Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics.* 2005; 20: 244-255.
61. Felmigham D. Respiratory pathogens: assessing resistance patterns in Europe and the potential role of grepafloxacin as treatment of patients with infections caused by these organisms. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45: 1-8.
62. Heyer G. et al. *Staphylococcus aureus agr* and *sarA* Functions Are Required for Invasive Infection but Not Inflammatory Responses in the Lung. *Infect Immun.* 2002; 70(1): 127-133.

63. Cheng A. et al. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. FASEB. 2009; 23: 3393-3404.59.
64. Hsiao C. et al. *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Susceptibility of Abscess Samples from Adults and Children from the Kaleida Health System in Western New York State, 2003-2006. J Clin Microbiol. 2010
65. Vandecasteele S.J. et al. *Staphylococcus aureus* Infections in Hemodialysis: What a Nephrologist Should Know. Clin J Am Soc Nephrol. 2009; 4: 1388-1400.
66. Ubani U.A. Bacteriology of external ocular infections in Aba, South Eastern Nigeria. Clin Exp Optom. 2009; 92(6): 482-9.
67. Van der Veen E.L. et al. Influence of Sampling Technique on Detection of Potential Pathogens in the Nasopharynx. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006; 132: 752-5.
68. Vesterlund S. et al. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. Microbiology. 2006; 152: 1819-26.
69. Baum C. et al. Non-*spa*-Typeable Clinical *Staphylococcus aureus* Strains Are Naturally Occurring Protein A Mutants. J Clin Microbiol. 2009; 47(11): 3624-9.
70. Bagdonas R. et al. Racionalaus antibakterinių vaistų vartojimo algoritmo įtaka *Staphylococcus aureus* atsparumo antibiotikams kitimui. Lietuvos chirurgija. 2006; 4(1): 54-8.
71. Kareivienė V. et al. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics and spread of phage types. Medicina (Kaunas). 2006;42(4): 332-9.
72. Grigaitė R. et al. *Staphylococcus aureus* padermių, išskirtų iš nudegimų sukeltų žaizdų, atsparumas antibiotikams. Medicina (Kaunas). 2006; 42(5):377-383.
73. Pavilonytė Ž. et al. *Staphylococcus aureus* paplitimas hospitalizavimo laikotarpiu. Medicina (Kaunas). 2008; 44(8): 593-600.
74. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf; prisijungimo data: 2010-04-02.
75. Schlager T.A. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age: epidemiology, diagnosis, treatment, outcomes and prevention. Paediatr Drugs. 2001; 3(3): 219-27.