

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Marie Brajerová

*Analýza kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k meticilinu vyskytujících se
v České republice a na Slovensku*
*Analysis of methicillin resistant Staphylococcus aureus strains from Czech
Republic and Slovakia*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Jan Tkadlec, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7.8.2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Tkadlecovi Ph.D. za jeho trpělivost, konzultace a odborné vedení při vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marcelu Krůtové Ph.D. za její rady a připomínky při práci v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat manželovi a rodině za jejich podporu při psaní diplomové práce.

Abstrakt

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je významným nozokomiálním patogenem, který se však od 90. let 20. století čím dál více vyskytuje i v komunitě (CA-MRSA). Obecně jsou komunitní kmeny virulentnější, avšak méně rezistentní než nemocniční (HA-MRSA). Některé linie MRSA, jako např. sekvenční typ 8 byly v šíření úspěšnější než jiné a rozšířily se na více místech ve světě. Je známo hned několik příkladů, kdy byly dominující linie nahrazeny jinými. Klíčové faktory rozhodující o výběru dominantní linie nejsou vždy zcela zřejmé. V rámci této diplomové práce byla provedena longitudinální studie epidemiologie MRSA ve Fakultní nemocnici v Motole v období 2018–2020, s charakterizací výskytu klonálních komplexů. Zároveň byla provedena multicentrická studie epidemiologie MRSA na Slovensku v období leden – duben 2020. Dále bylo několik izolátů z dominantních linií fenotypově charakterizováno. Ve FN Motol byl zjištěn vysoký výskyt klonálního komplexu 5 se zastoupením *spa*-typu t586, což je ve shodě s recentními studii v ČR. Převážné zastoupení klonálního komplexu 5 bylo zjištěno i na Slovensku. Rozdílem však byly signifikantní záchyty i jiných sekvenčních typů a klonálních komplexů, jako např. EMRSA-15 (20 % izolátů). Dalším významným objevem byl záchyt klonu USA300, který je epidemickým klonem v Americe, ale v Evropě jsou dosud zaznamenány pouze ojedinělé záchyty.

Klíčová slova: MRSA, rezistence, typizace, antibiotika, *mecA*, *SCCmec*, klonální šíření

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major nosocomial pathogen that has spread into the community since the 90s. In general, the community-associated (CA-MRSA) strains are more virulent, but less resistant to antimicrobials than the hospital-acquired strains (HA-MRSA). Some lineages of MRSA such as sequence type 8 have been transmitted more successfully around the world than others and there are situations where a dominant lineage has been replaced by a new one. The factors that are crucial for the selection of dominant lineage are often not clear. As part of this thesis, a longitudinal study of MRSA epidemiology in the Motol University Hospital during the period of 2018-2020 was performed and the occurrence of MRSA clonal complexes was characterized. A multicenter study of the epidemiological situation of MRSA in Slovakia during the period of January – April 2020 was also performed concomitantly. Moreover, several isolates from dominant lineages were further characterized by their phenotype. In the Motol University Hospital study, it was found that the HA-MRSA of the clonal complex 5 dominates and is represented mainly by *spa*-type t586; a finding that concurs with recent studies from the Czech Republic. In Slovakia, similar to the Czech Republic, MRSA lineages from clonal complex 5 were predominant. Other lineages were also significantly present e.g. HA-MRSA lineages from clonal complex 22, also known as EMRSA-15 (20% of isolates) and more importantly, the epidemic USA300 clone was detected, which is an epidemic clone in the United States, but has so far been rarely reported in Europe.

Keywords: MRSA, resistance, typing, antibiotics, *mecA*, *SCCmec*, clonal spread

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce.....	10
3. Literární přehled.....	11
3.1 Základní biologické vlastnosti a klinický význam <i>S. aureus</i>	11
3.2 Antibiotická rezistence <i>S. aureus</i>	12
3.2.1 Genetický základ MRSA	12
3.3 Populační struktura MRSA	14
3.3.1 Typizační metody pro studium populační struktury <i>S. aureus</i>	15
3.3.2 Globální linie MRSA	18
3.3.3 MRSA v ČR a střední Evropě (diskuse z článku 2020, mapa střední Evropy)	24
4. Materiál a metody.....	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Bakteriální kmeny a izoláty	27
4.1.2 Chemikálie a kity	28
4.1.3 Primery a sondy	29
4.2 Metody	31
4.2.1 Kultivace	31
4.2.2 Stanovení citlivosti k antibiotikům	31
4.2.3 Molekulárně genetická analýza studovaných kmenů.....	33
4.2.4 Analýza fyziologických vlastností studovaných kmenů.....	39
4.2.5 Statistické a bioinformatické metody.....	41
5. Výsledky.....	42
5.1 Epidemiologie MRSA ve Fakultní nemocnici Motol 2018-2020	42
5.1.1 Izoláty MRSA	42
5.1.2 Antibiotická citlivost.....	42
5.1.3 Klonální struktura	46
5.1.4 Panton-Valentinův leukocidin.....	47
5.2. Epidemiologie MRSA Slovensko leden-duben 2020.....	49
5.2.1 MRSA izoláty	49
5.2.2 Antibiotická citlivost.....	49
5.2.3 Klonální struktura	53
5.2.4 Panton-Valentinův leukocidin.....	54
5.2.4 <i>mecC</i>	55
5.3 Fyziologické vlastnosti dominantních linií MRSA v ČR a na Slovensku	55

5.3.1 Stanovení MIC a PVL.....	56
5.3.2 Růstová rychlost.....	57
5.3.2 Tvorba biofilmu	68
5.3.3 Hemolytická aktivita.....	70
6. Diskuze.....	72
6.1 MRSA Fakultní nemocnice v Motole 2018–2020	72
6.2 MRSA Slovensko, leden – duben 2020	74
6.3 Fyziologické vlastnosti dominantních linií MRSA v ČR a na Slovensku	77
7. Souhrn	80
8. Seznam literatury.....	81
9. Přílohy	i

Přehled použitých zkratek

AZI	Azithromycin	Azitromycin
ACME	Arginine catabolic mobile element	Mobilní genetický element kódující metabolismus argininu
Agr	Accesory gene regulator	Doplňkový genový regulátor
BHI	Brain heart infusion	Brain heart infusion
CA-MRSA	Community-associated methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Komunitní meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
CC	Clonal complex	Klonální komplex
COMER	Copper and mercury resistance	Mobilní genetický element zajišťující rezistenci ke rtuti a mědi
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FAM	6-carboxyl fluorescein	6-karboxyl fluorescein
HA-MRSA	Hospital-associated methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Nemocniční meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
HEX	5'Hexachloro fluorescein	5' hexachloro fluorescein
LA-MRSA	Livestock-associated methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> spojovaný s péčí o hospodářská zvířata
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MIC	Minimum inhibitory concentration	Minimální inhibiční koncentrace

MLST	Multilocus sequence typing	Multilokusová sekvenační typizace
MRSA	Meticilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
O/N	Overnight	Přes noc
OXA	Oxacillin	Oxacilin
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PBP	Penicilin binding protein	Penicilin vázající protein
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis	Pulzní gelová elektroforéza
PSM	Phenol soluble modulins	Moduliny rozpustné ve fenolu
PVL	Panton Valentine Leukocidin	Panton-Valentinův leukocidin
ROX	Carbonyl-X-Rhodamin	Karbonyl-X-Rhodamin
SpA	Staphylococcal protein A	Stafylokokový protein A
SNP	Single nucleotide polymorphism	Rozdíly v jednotlivých nukleotidech
ST	Sequence type	Sekvenční typ
WGS	Whole genome sequencing	Celogenomové sekvenování

1. Úvod

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) je grampozitivní bakterie, která může svého hostitele pouze kolonizovat, ale také způsobovat závažné infekce. Je spojována s infekcemi v souvislosti s nemocniční péčí a je významným nozokomiální patogenem. Z infekcí, které způsobuje, převažují infekce kůže a měkkých tkání, jako jsou kožní léze, abscesy, furunkuly apod. Také se řadí mezi častého původce endokarditid a osteomyelitid. Infekce *S. aureus* jsou velmi často u starší populace ve spojitosti s dlouhodobou nemocniční péčí.

S. aureus v podobě rezistentních kmenů MRSA je také zosobněním jedné z největších hrozeb současné doby, a to rezistence k antibiotikům. Vývoj nových antibiotik je zdoluhavý a nepříliš ekonomicky výhodný proces, vzhledem k relativně rychlému vzniku rezistence i charakteru antibiotik jakožto léčiva, které pacient potřebuje užívat pouze několik dní, pokud je terapie úspěšná. Vzhledem k riziku šíření jsou velkým problémem plazmidy a jiné mobilní genetické elementy nesoucí geny antibiotické rezistence (McCarthy a Lindsay 2012). Jedním z příkladů takového mobilního genetického elementu je stafylokoková chromozomální kazeta *SCCmec*, která má za následek rezistenci *S. aureus* k většině β -laktamových antibiotik, včetně meticilinu, díky němuž získal meticilin rezistentní *S. aureus* své jméno – MRSA. Toto β -laktamové antibiotikum bylo zavedeno do klinické praxe na konci 50. let, v současné době se již nepoužívá, ale označení MRSA zůstalo.

Od 60. let, kdy se poprvé objevil MRSA, se kmeny rezistentní k meticilinu staly významnými původci nemocničních infekcí. Později se začaly objevovat případy, které nesouvisely s nemocniční péčí a pocházely z komunitního prostředí (Begier *et al.* 2004) a případy spojované s péčí o zvířata (Witte *et al.* 2007). V České republice byly první případy výskytu MRSA zaznamenány v 90. letech (Melter *et al.* 1999).

Epidemiologie MRSA je charakterizována výskytem úspěšných klonálních linií epidemických klonů, které mohou lokálně i globálně tvořit většinu detekovaných izolátů MRSA. Studium klonální struktury je proto zásadním bodem pro pochopení šíření MRSA a pro zavedení účinných protiopatření.

V naší zemi se vystřídalo několik dominantních klonálních linií MRSA. Tato práce navazuje na studii naší laboratoře analyzující epidemiologii MRSA v ČR v roce 2017, kdy v současné době je v nemocnicích častý klonální komplex 5 v zastoupení hlavně *spa*-typů t003, t014 a t586 (Tkadlec *et al.* 2021).

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo navázat na studii Tkadlec *et al.* 2021, která v roce 2017 studovala epidemiologii MRSA v jedenácti českých nemocnicích, sledováním epidemiologie MRSA ve Fakultní nemocnici v Motole. Dále srovnat situaci v ČR se Slovenskem a provést podrobnější analýzu izolátů z hlavních linií MRSA.

Byly stanoveny následující dílčí cíle této diplomové práce:

- Analýza izolátů MRSA ve Fakultní nemocnici Motol nasbíraných v období 2018-2020, zahrnující určení citlivosti k antibiotikům, detekci výskytu Panton-Valentinova Leukocidinu, charakterizaci klonální struktury.
- Analýza izolátů MRSA ze Slovenska nasbíraných v období leden-duben 2020, zahrnující určení citlivosti k antibiotikům, detekci výskytu Panton-Valentinova Leukocidinu, charakterizaci klonální struktury. Srovnání s izoláty MRSA z ČR.
- Bližší charakterizace izolátů reprezentující hlavní linie MRSA, stanovení jejich růstové rychlosti, tvorby biofilmu a hemolýzy s cílem objasnit faktory ovlivňující šíření těchto linií MRSA.

Byly stanoveny následující hypotézy:

- Dle dat z minulých let je předpoklad přetrvávající dominance klonálního komplexu 5 ve FN Motol s převládajícím *spa*-typem t586
- Vzhledem k neexistenci epidemiologických dat na Slovensku, sousedstvím a úzkým kontaktem s Českou republikou je předpoklad výskytu podobných *spa*-typů jako v České republice
- Předpoklad rozdílů v růstových rychlostech mezi analyzovanými kmeny, rozdílný vliv přidání subinhibičních dávek antibiotik na nemocniční versus komunitní linie MRSA
- Předpoklad rozdílů v tvorbě biofilmu a hemolýzy mezi komunitními a nemocničními kmeny/izoláty

3. Literární přehled

3.1 Základní biologické vlastnosti a klinický význam *S. aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní fakultativně anaerobní kokovitá bakterie, v mikroskopu tvoří hroznovité kokovité shluky. *S. aureus* je oportunní patogen a až 40 % populace je bezpříznakově kolonizováno (Becker *et al.* 2016). Nejčastěji je toto nosičství na nosní sliznici a je jedním z rizikových faktorů predisponující vznik případné infekce, v případě invazivní infekce u pacientů s prokázaným nosičstvím *S. aureus* je ve většině případů původem ten samý kmen (McCarthy *et al.* 2012). Tato primárně komenzální bakterie má potenciál vyvolat různé typy infekcí, nejčastěji infekce kůže a měkkých tkání. Mezi další onemocnění, které *S. aureus* způsobuje, řadíme infekce dýchacích cest, endokarditidy, osteomyelitidy, infekce močových cest a sepse. Jeho virulentní faktory, schopnost odolávat vysušení (Loftus *et al.* 2018) a přežívat ve vysokých koncentracích solí – až v 25% koncentraci NaCl (Vaish *et al.* 2018) ho řadí mezi významné grampozitivní nozokomiální patogeny.

Virulentní faktory často nejsou esenciální, ale dávají svému nositeli selekční výhodu. Jsou obvykle přenášeny na mobilních genetických elementech, mezi které se řadí např. plazmidy, profágy nebo ostrovy patogenicity. Vzhledem k horizontálnímu přenosu se výskyt mobilních genetických elementů liší mezi jednotlivými liniemi *S. aureus* (McCarthy a Lindsay 2012). Známy virulentní faktor *S. aureus* je např. Panton-Valentinův leukocidin (PVL). Tento leukocidin je přenášen na profágovi $\phi 2$, bývá přítomen u cca 10 % izolátů MRSA (Tkadlec *et al.* 2021) a zhoršuje průběh stafylokokové infekce. Dalším z významných virulentních faktorů jsou hemolyziny. Hemolysin α se váže na erytrocyty a vytváří v jejich membráně póry, čímž je lyzuje. Při kultivaci na krevním agaru je tento jev pozorován jako zprůhlednění krevního agaru.

Tab 1. Seznam virulentních faktorů *S. aureus*. Převzato a upraveno z (Badarau *et al.* Nagy 2017; McCarthy a Lindsay 2013; Holochová *et al.* 2010)

Virulenční faktor	Zástupce	Cíl působení		Výskyt
Adheziny				Core variable genome
Koaguláza				
Stafylokináza		Štěpení IgG		Bakteriofág $\phi 3$
Hemolyziny	Hla		Epiteliální a endoteliální buňky	Core variable genome – IEC2 locus
	HlgAB	Erytrocyty	Leukocyty – lyze fagocytů (neutrofilů, granulocytů, monocytů a makrofágů)	Core variable genome – Sbi/Hlg locus
	HlgCB			

Leukocidiny	PVL			Bakteriofág ϕ 2
	LukED	Erytrocyty		Core variable genome – Gl β locus
	LukMF			Bakteriofág ϕ 1
Enterotoxiny	A-E	T-buňky	Aktivace velkého počtu T buněk, proliferace a masivní uvolňování chemokinů a protizánětlivých cytokinů => syndrom toxického šoku	bakteriofágové
	TSST-1			SaPI
Exfoliativní toxiny	ETA	Disociace keratinocytů		Profág
	ETB			Plazmid pETB
	ETD			SaPI
Phenol soluble modulins	PSM α	Lýze leukocytů		PSMa locus core genome
	PSM β			SCCmec

3.2 Antibiotická rezistence *S. aureus*

Po rychlém získání rezistence k penicilinu se pro léčbu *S. aureus* vyvinula účinnější β -laktamová antibiotika, která jsou v mnoha případech infekce prvním antibiotikem volby. I k novým β -laktamovým antibiotikům si ale některé kmeny *S. aureus* získaly rezistenci. Mimo rezistence k těmto antibiotikům jsou velkým problémem kmeny *S. aureus*, které získaly tzv. multirezistenci, rezistenci k alespoň jednomu antibiotiku ve třech různých skupinách antibiotik (Magiorakos et al. 2012). Mnoho kmenů MRSA je mimo β -laktamových antibiotik rezistentní také k jiným skupinám antibiotik, např. k fluorochinolonům, makrolidům a linkosamidům (Tkadlec et al. 2021).

3.2.1 Genetický základ MRSA

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je charakterizován několika geny, které mu dávají schopnost odolat působení β -laktamových antibiotik. Tyto geny jsou součástí stafylokokové chromozomální kazety SCCmec.

SCCmec je mobilní genetický element o délce 21 kbp až 67 kbp (Zhang et al. 2005). Tento mobilní genetický element byl do *S. aureus* přenesen horizontálním genovým transferem z koaguláza negativních stafylokoků (Couto et al. 1996). Harkins et al. provedli celogenomové sekvenování u izolátů, které se objevily ve Velké Británii 60. a 70. letech a v Dánsku v 60. až 80. letech a zjistili, že kazeta SCCmec zodpovědná za rezistenci k meticilinu byla horizontálním genovým transferem přenesena do *S. aureus* s 95 % pravděpodobností v roce 1946 nebo dříve. Z tohoto objevu vyplývá, že zavedení meticilinu do klinické praxe nebylo primární příčinou vzniku MRSA (Harkins et al. 2017).

Základní komponentou kazety SCC*mec* jsou rekombinázy Ccr, které zajišťují vystřížení a integraci kazety SCC*mec*. Tyto rekombinázy jsou kódovány geny *ccrA*, *ccrB* a *ccrC*. Gen *ccrC* zajišťuje přenos SCC*mec* samostatně, geny *ccrA* a *B* fungují dohromady (Ito *et al.* 2004; Katayama *et al.* 2000).

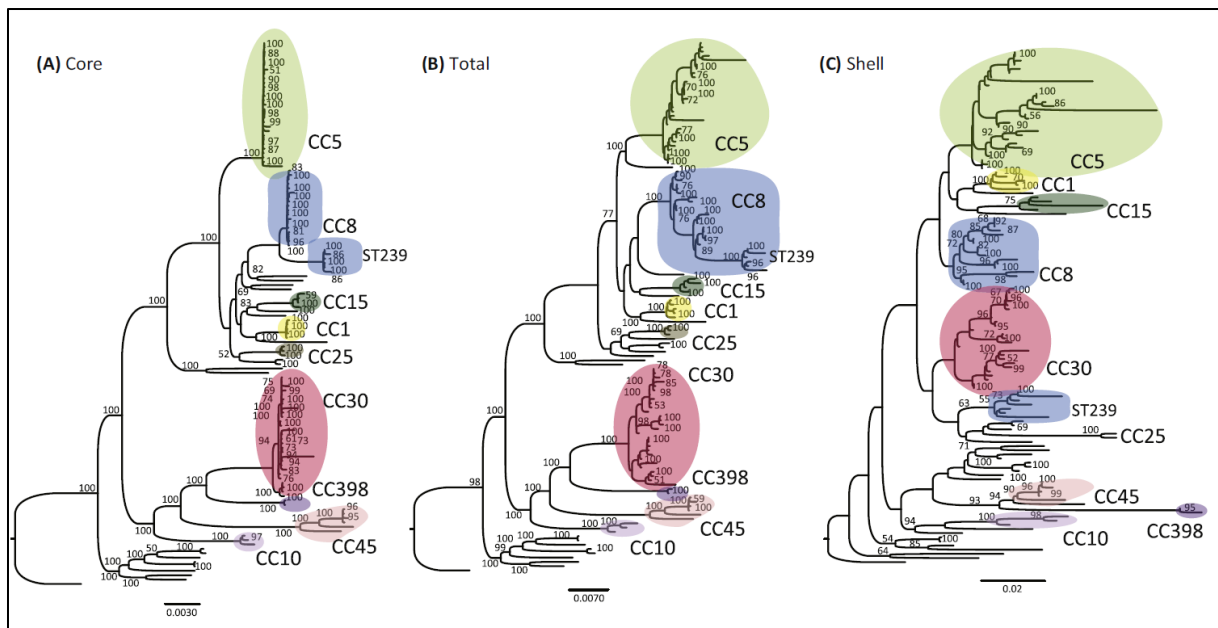
Další součástí SCC*mec* je gen *mec*. Ten kóduje alternativní penicilin vázající protein 2 (PBP2a), ve většině případů je kódován genem *mecA* a podílí se na biosyntéze peptidoglykanu v případě, že je MRSA vystaven β -laktamovým antibiotikům. Tato antibiotika cílí na penicilin vázající protein (PBP), který je esenciální při tvorbě peptidoglykanu. PBP2a zajišťuje rezistenci ke všem β -laktamovým a cefalosporinovým antibiotikům vyjma ceftobiprolu a ceftarolinu (Becker *et al.* 2014). V roce 2011 García-Álvarez *et al.* popsali u izolátu LA-MRSA homolog genu *mecA* a nazvaly jej *mecA_{LGA251}*, dnes je gen označován jako *mecC*. Tento gen nelze detekovat latexovou aglutinací ani PCR esejí pro detekci genu *mecA*. Gen *mecC* je nesen kazetou SCC*mec* typu XI. (García-Álvarez *et al.* 2011). V roce 2020 byl popsán první případ kmene, jehož SCC*mec* obsahovala gen *mecA* i *mecC* (Sekizuka *et al.* 2020). Gen *mecB*, jehož produkt také nahrazuje PBP v jeho funkci, byl u *S. aureus* popsán v roce 2018. Na rozdíl od *mecA* a *mecC* je ale přenášen na plazmidu (Becker *et al.* 2018). Region *mec* dále obsahuje signální transduktorový protein (kódovaný genem *mecRI*) a represorový protein (kódovaný genem *mecI*).

Zbytek kazety, která není součástí *ccr* ani *mec* regionů je nazývána regionem J (joining region). Region J se rozděluje do tří podskupin, J1-J3. V tomto regionu jsou v podobě integrovaných plazmidů či transpozonů kódovány geny rezistence k dalším antibiotikům, jako např. integrovaný plazmid pUB110, který nese rezistenci k tobramycinu a kanamycinu. Region J také může obsahovat rezistenci k těžkým kovům jako je např. kadmium. Tato rezistence je nesená na transpozonu Ψ Tn 554 (Ito *et al.* 2014).

U SCC*mec* rozlišujeme typy I až XIV, nejnovější typ SCC*mec* XIV byl popsán v roce 2020 (Urushibara *et al.* 2020). Typy SCC*mec* se mezi sebou liší kombinací genů *ccr*, *mec* a typem regionu J. Větší kazety SCC*mec* typu I a II jsou spojovány s nemocniční MRSA a často nesou dodatečné geny rezistence, zatímco SCC*mec*IV bývá kratší a vyskytuje se hlavně u komunitních MRSA (Ma *et al.* 2002). Tyto kazety jsou tedy významné nejen přenosem rezistence k β -laktamovým antibiotikům, ale v mnoha případech přenáší rezistenci k řadě dalších antibiotik (Ito *et al.* 2014).

3.3 Populační struktura MRSA

Podrobnějším zkoumáním lze odhalit, že mezi izoláty *S. aureus* existují značné genetické rozdíly, ovlivňující jejich schopnosti způsobit infekci a odolávat působení imunitního systému a antibiotické léčbě. Tyto rozdíly zahrnují přítomnost genů kódujících povrchové proteiny, genů pro faktory interagující s imunitním systémem hostitele (McCarthy a Lindsay 2010), a také přítomnost mobilních genetických elementů jako jsou plazmidy a s nimi spojené geny rezistence (McCarthy a Lindsay 2012). Podle vzájemné podobnosti lze izoláty *S. aureus* rozdělit do genetických linií, tzv. klonálních komplexů (Clonal complex – CC). Klonální komplexy byly původně určeny na základě typizační metody multilokusové sekvenační typizace (MLST) jako skupina sekvenčních typů (ST) mezi nimiž je rozdíl nejvýše ve dvou alelách ze 7 srovnávaných genů (viz Kapitola 3.3.1.) (Enright *et al.* 2000; Feil *et al.* 2003). Rozdělení do skupin odpovídajících klonálním komplexům ale potvrzuje i podrobnější analýza založená na celogenomovém sekvenování. Planet *et al.* analyzoval 129 veřejně dostupných genomů *S. aureus*, fylogenetická analýza těchto genomů ukazuje rozdělení do skupin korespondujících s klonálními komplexy, zároveň ukazuje značnou genetickou vzdálenost mezi jednotlivými klonálními komplexy (viz Obrázek 1) (Planet *et al.* 2017). Jedním z důvodů tohoto jasného vymezení klonálních linií je přítomnost mechanismů, které brání horizontálnímu přenosu genetické informace mezi nepříbuznými izoláty a spoluurčují tak klonální strukturu *S. aureus*. Příkladem může být *SauI* – restrikčně modifikační systém typu I (Waldron a Lindsay 2006). Vzhledem k tomuto rozdělení se evolučně výhodné znaky, jako jsou geny kódující rezistenci k antibiotikům, virulentní faktory a další, šíří dominantně populační expanzí nositelů těchto znaků, tedy klonálních komplexů. Rozdělení do klonálních komplexů je ještě více patrné u meticilin rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA), kde pouze u některých klonálních linií došlo k akvizici determinanty rezistence k meticilinu. Vývoj epidemiologie MRSA je charakteristický epidemickými „vlnami“ (Chambers a Deleo 2009), kdy po získání rezistence k meticilinu (a dalších genetických determinant) dochází k rozsáhlému rozšíření úspěšné klonální linie. Pro účely identifikace těchto linií se používají různé typizační metody, viz dále.



Obr. 1. Fylogenetická analýza populační struktury *S. aureus*. A) analýza na základě „core genome“ – tj. pouze genů přítomných ve více než 80 % analyzovaných genomů; B) celého genomu; C) přídatného genomu (accessory genome). Převzato z (Planet *et al.* 2017).

3.3.1 Typizační metody pro studium populační struktury *S. aureus*

K rozlišení izolátů *S. aureus*, včetně jejich zařazení do klonálních linií, se používají tzv. typizační metody. Z praktického hlediska je typizace bakteriálních izolátů využívána pro popis epidemického šíření (outbreak), tzn. jestli jsou případy stafylokokové infekce vyskytující se v daném čase a místě způsobeny stejným kmenem a jsou tedy v příčinné souvislosti. Mimo to má typizace význam v monitorování populační struktury dané bakterie a umožňuje tedy sledovat vývoj a rozšíření klonálních linií, ať už z hlediska časového nebo geografického, také tím typizace poskytuje globální pohled na epidemiologii *S. aureus*. K typizaci *S. aureus* se využívalo nebo využívá mnoho metod, ty hlavní z nich budou popsány v následujících odstavcích.

Multilokusová sekvenční typizace – MLST (multilocus sequence typing)

V roce 2000 publikoval Enright *et al.* popis eseje pro typizaci izolátů *S. aureus* pomocí MLST. V této studii si nejprve zvolili 14 tzv. „house-keeping“ genů. Tyto geny sekvenovali u 10 izolátů *S. aureus* a následně pro MLST typizační schéma *S. aureus* vybrali 7 genů, jejichž sekvence vykazovaly mezi srovnávanými izoláty největší variabilitu, měly tedy největší počet alel. Mezi tyto geny se řadí gen pro karbamát kinázu (*arcC*), pro šikimát dehydrogenázu (*aroE*), pro glycerol kinázu (*glp*), guanylát kinázu (*gmk*), fosfát acetyltransferázu (*pta*), trifosfát izomerázu (*tpi*) a acetyl koenzym A acetyltransferázu (*yqiL*). Analyzované úseky těchto genů mají délku v rozmezí 402 až 516 bp. Sekvence jsou vyhodnoceny, porovnáním se sekvencemi již známých alel a podle

kombinace alel (alelický profil) se určí ST typ (Enright *et al.* 2000). Pokud mají 2 izoláty identických všech sedm alel, tak patří oba do stejného sekvenčního typu. V případě záměny, byť jediné alely, je ST typ jiný (Feil *et al.* 2003).

MLST byla validována pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) (viz dále), představující tehdejší standardní typizační metodu. ST typy, které si byly velmi podobné, byly rovněž potvrzeny jako příbuzné pomocí PFGE, kdy se lišily pouze ve dvou až šesti fragmentech, na rozdíl od sekvenčně vzdálených ST typů, které i PFGE určila jako nepříbuzné lišící se ve velkém počtu fragmentů (Enright *et al.* 2000).

Příbuzné ST typy se řadí do klonálních komplexů (CC). Do jednoho CC patří takové ST, které mají identické 5 a více alel s minimálně jedním ST (Feil *et al.* 2003). Do stejného klonálního komplexu může patřit zároveň MSSA i MRSA, vysvětluje se to přijetím kazety *SCCmec* MSSA klonem nebo ztrátou kazety *SCCmec*.

Oproti dříve používané metodě PFGE je MLST lépe reprodukovatelná a data jsou lépe srovnatelná mezi laboratořemi. Nevýhodou MLST je relativně omezené rozlišení, nerozeznání dvou velmi podobných izolátů, které se liší v jiných genech, než na které MLST cílí a také cena, vzhledem k sekvenaci 7 fragmentů DNA.

***spa*-typizace**

Další metodou založenou na srovnávání sekvencí vybraných úseků DNA mezi izoláty *S. aureus* je *spa*-typizace, oproti MLST cílí pouze na jeden gen, a to na gen stafylokokového proteinu A (SpA). SpA je významný virulentní faktor *S. aureus*, je to povrchový protein, jehož domény A-E váží protilátky a zabraňují tak označení a zneškodnění bakterie imunitním systémem. Gen pro protein SpA obsahuje variabilní oblast X. Tato část genu *spa* zahrnuje repetitivní oblast *Xr*, která je variabilně dlouhá a skládá se z různého počtu a typu repetice o délce 24-27 bp (Santos-Júnior *et al.* 2016). Tato oblast je cílem *spa*-typizace.

V porovnání s MLST umožňuje *spa*-typizace, vzhledem k variabilitě cílové oblasti, vyšší rozlišení mezi izoláty, a je tedy vhodnější pro analýzu lokálních epidemií. Zároveň je ale analyzovaná variabilní oblast dostatečně stabilní, aby bylo možné identifikovat příbuzné izoláty (Robinson a Enright 2003). Gen pro protein A i geny analyzované v rámci MLST jsou lokalizovány na chromozomu *S. aureus*, a jsou vzácně cílem rekombinace, a protože variabilní oblast genu pro protein A se mění rychleji než geny MLST schématu, tak obvykle platí, že více *spa*-typů může patřit do jednoho ST nebo klonálního komplexu, ale ne naopak. Praktickým důsledkem je, že sekvenční typ nebo klonální komplex lze v mnoha případech ze *spa*-typu odvodit, pokud je informace o korelaci mezi daným ST a *spa*-typem dostupná (Mellmann *et al.* 2007).

Výhodou *spa*-typizace je také existence softwaru (Ridom StaphType) umožňující automatické přiřazení analyzovaných sekvencí k existujícím *spa*-typům a také klastrovací analýzu pomocí algoritmu BURP (based upon repeat pattern), který dokáže seskupit blízce příbuzné *spa*-typy (Harmsen *et al.* 2003). Vzhledem k analýze pouze jednoho lokusu je tato metoda také méně pracná a levnější než MLST.

Pulzní gelová elektroforéza – PFGE

Pro typizaci *S. aureus* se dříve hojně využívala makrorestrikční analýza genomové DNA s využitím pulzní gelové elektroforézy, označovaná obvykle zkráceně jako pulzní elektroforéza (PFGE – Pulse field gel electrophoresis). Principem metody je šetrná extrakce chromozomální DNA, nastříhání DNA restrikčními enzymy s nízkou frekvencí výskytu cílových míst (*Sma*I u *S. aureus*) a následné rozdělení vzniklých fragmentů genomové DNA pomocí pulzní elektroforézy dle jejich velikosti. U izolátů se pak porovnával velikostní profil přítomných fragmentů. Výhodou PFGE je vysoká diskriminační síla, dokáže identifikovat rozdíly mezi izoláty stejných ST typu i *spa*-typů, což je vhodné při analýze epidemii na lokální úrovni. Nevýhodou této metody je, že nepracuje přímo se sekvencemi DNA, ale pouze s velikostí fragmentů, a také že postup analýzy je pracný a vyhodnocení poměrně subjektivní. Důsledkem je nízká reprodukovatelnost mezi jednotlivými laboratořemi. PFGE také nedokáže určit příslušnost ke klonálním komplexům. Z těchto důvodů byla PFGE postupně nahrazena metodami jako je MLST, *spa*-typizace a nověji i WGS, které poskytují mnohem jednoznačnější a univerzálnější výsledky.

Celogenomové sekvenování

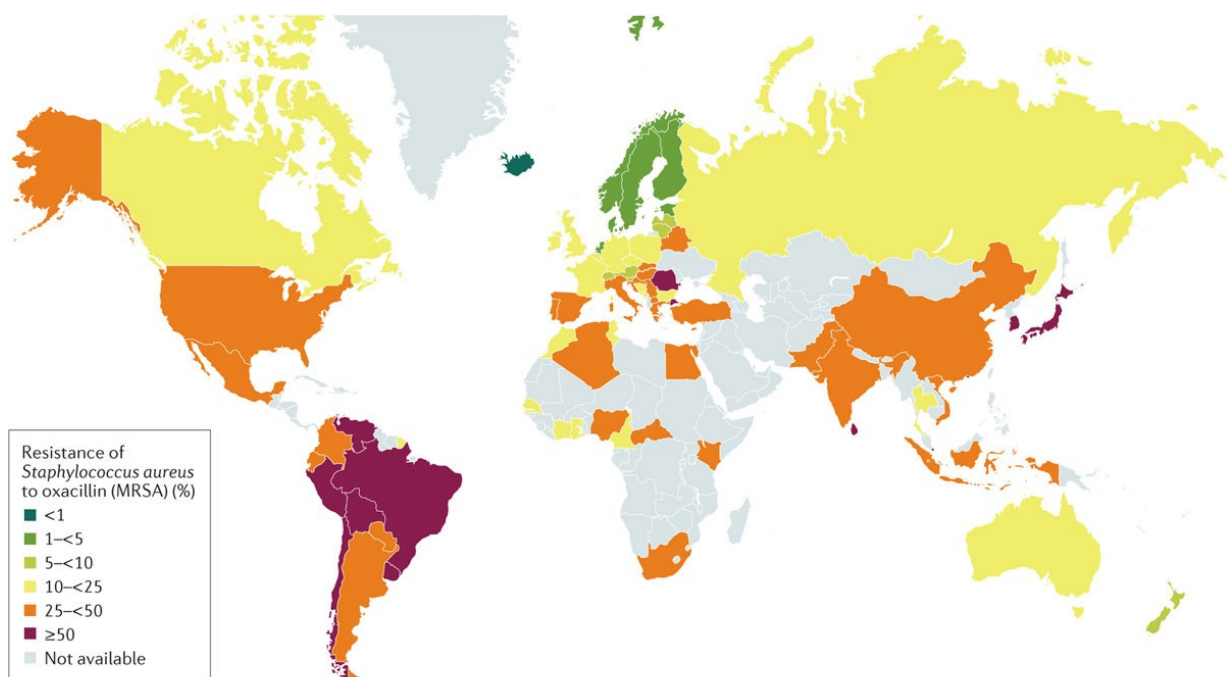
S rozvojem a větší dostupností metod celogenomového sekvenování (WGS – Whole Genome Sequencing) se z WGS stává univerzální metoda pro charakterizaci bakteriálních izolátů a své uplatnění našla i jako typizační metoda izolátů *S. aureus* (Durand *et al.* 2018).

WGS poskytuje ohromné množství dat o genomu studovaných izolátů, ze kterých lze určit jak *spa*-typ, tak ST typ daného izolátu (Bartels *et al.* 2014; Larsen *et al.* 2012), navíc lze určit přítomnost genu rezistence a virulence a dalších genetických markerů. Celogenomová data jednotlivých izolátů umožňují rozpoznat rozdíly v jednotlivých nukleotidech, tzv. single nucleotide polymorfism (SNP), mezi studovanými izoláty, což umožňuje rozlišení mezi izoláty, jaké MLST ani *spa*-typizace neumožňují, ale lze izoláty spolehlivě přiřadit ke klonálním komplexům, což je naopak limitací PFGE (Durand *et al.* 2018). Na základě rozdílu SNP můžeme určit příbuznost jednotlivých izolátů. Nevýhodou této metody je finanční náročnost, délka trvání a zpracování velkého množství dat.

Kmeny MRSA se typizují také určením stafylokokové chromozomální kazety *mec* (SCC*mec*). Tato kazeta je blíže popsána v kapitole 3.2.1.

3.3.2 Globální linie MRSA

Jak už bylo zmíněno výše, *S. aureus* se šíří klonálně. V průběhu let získávaly výhodu různé linie. V současné době je na světě přibližně 10 dominantních klonálních komplexů MRSA, které globálně zahrnují většinu případů MRSA. Mezi ně patří CC5 zastoupený např. *spa*-typy t003 a t014 (Grundmann *et al.* 2014), nebo také CC8 v Americe zastoupený jako velmi úspěšný klon USA300 (Tenover *et al.* 2006). Původ některých MRSA je v nemocnicích a jsou spojeny s nozokomiálními infekcemi, některé MRSA se ale šíří i v komunitě (Rolo *et al.* 2012). Dále může být MRSA spojován s péčí o hospodářská zvířata (Voss *et al.* 2005). V současné době s vývojem klonálních linií rozdíly mezi nemocniční a komunitní MRSA mizí.



Nature Reviews | Disease Primers

Obr. 2. Prevalence MRSA ve světě. V severní Evropě (Island, Norsko, Finsko, Švédsko a Dánsko) a Nizozemí je prevalence do 5 %, díky jejich cílenému programu na snížení prevalence MRSA. V USA je takto vysoká prevalence díky severoamerické variantě USA300, v Jižní Americe se jedná o jihoamerickou variantu USA300. Převzato z (Lee *et al.* 2018).

Nemocniční MRSA (HA-MRSA)

MRSA se objevil již rok po zavedení meticilinu do klinické praxe v roce 1959 ve Velké Británii (Lee *et al.* 2018). Díky zavedení meticilinu získal MRSA selekční výhodu v šíření a stal se významným nozokomiálním patogenem. Až do 80. let 20. století byl spojován hlavně s případy spojenými s nemocniční péčí, tzv. hospital-associated MRSA (HA-MRSA). V 60. až 70. letech se v Dánsku vyskytovaly MRSA izoláty s rezistencí k penicilinu, streptomycinu, tetracyklinu a často také k erytromycinu, tento antibiotický profil byl také pozorován na izolátech, které se objevovaly ve Velké Británii v 60. letech (Crisóstomo *et al.* 2001).

Až do konce 70. let se v nemocnicích ve světě vyskytovaly tzv. archaické klony MRSA, které potom ale záhadně vymizely. Tyto klony se nerozšířily mimo nemocniční zařízení a vyvinul se z nich např. Iberijský klon, který byl dominantní ve velké části Evropy (Oliveira *et al.* 2001). Crisóstomo *et al.* porovnávali archaické klony MRSA a MSSA s novějšími klony. U MSSA klonů se našly podobnosti např. s EMRSA-16 (Crisóstomo *et al.* 2001).

Na konci 60. let 20. století se začal šířit sekvenční typ 239 (Castillo-Ramírez *et al.* 2012; Harris *et al.* 2010). Na první pohled je vysoká podobnost mezi ST8 a ST239, tyto dva sekvenční typy se liší v jednom genu MLST (gen *arcC*). Robinson a Enright ale objevili, že přibližně 20 % genomu ST239 (minimálně 557 kb) bylo horizontálně přeneseno od ST30 (Robinson a Enright 2004). Jako jeden z mála je ST239 nositelem SCC*mecIII*. Všechny tyto elementy ze ST239 zahrnují operon pro rezistenci ke kadmiu, některé SCC*mecIII* elementy také kódují operon pro rtuťovou rezistenci. Dle studie od Monecke *et al.* lze rozlišit SCC*mecIII* ST239 na 39 odlišných subtypů se třemi významnými kmeny: Eurasijský, Jihoamerický/kmen Středního východu a kmen jihovýchodní Asie (Monecke *et al.* 2018). Eurasijský kmen byl popsán Harris *et al.* a Castillo-Ramírez *et al.* v letech 2010 a 2012 jako Turecký kmen vzhledem k významnému rozšíření v Turecku, později byl ale přejmenován na Eurasijský z důvodů výskytu tohoto kmene nejen v Turecku, ale i ve východní Evropě, Rusku, na Balkánu a v Pákistánu (Castillo-Ramírez *et al.* 2012; Harris *et al.* 2010). Pro tento kmen je charakteristická integrace transpozonu IS431 do genu *nsaB*. Kmen jihovýchodní Asie je významný přítomností genu *sasX/sesI*, který je nesen na profágovi. U Jihoamerického/kmene Středního východu tento gen naopak chybí (Monecke *et al.* 2018). V Evropě se v 90. letech významně rozšířily některé klony spadající pod ST239. Na začátku 90. let v portugalských nemocnicích dominoval tzv. Portugalský klon (ST239-III), postupně byl ale nahrazen Iberijským klonem (ST247-I) v polovině 90. let. Z Jižní Ameriky se do Evropy přes Portugalsko dostal tzv. Brazílský klon (ST239-IIIA), který v Portugalsku nahradil Iberijský klon (Aires De Sousa a De Lencastre 2004). Brazílský klon je (např. *spa*-typ t037) ve většině případů rezistentní k erytromycinu, klindamycinu, ciprofloxacinu, gentamicinu tetracyklinu a

trimetroprim-sulfametaxazolu (Kong *et al.* 2017). Dalším z významných klonů ST239 byl Maďarský klon, který v 90. letech převládal v Maďarsku – 74 % izolátů MRSA patřilo Maďarskému klonu. Postupně byl v Maďarsku nahrazen Jihoněmeckým klonem (ST228-I) a Newyorksko-japonským klonem (ST5-II) (Conceição *et al.* 2007).

V 90. letech dominoval v Evropě Iberijský klon (ST247, SCC*mecI*). Tento klon patří do klonálního komplexu 8 a záchyty byly zaznamenány od Portugalska až po Českou republiku, Skotsko a Itálii (Mato *et al.* 1998). Všechny izoláty byly rezistentní k ciprofloxacinu, gentamicinu, oxacilinu a tobramycinu. Většina izolátů pak byla rezistentní k erytromycinu, rifampinu, pefloxacinu a cefalosporinům. V novém tisíciletí byl Iberijský klon postupně nahrazován jinými klony, např. Italským klonem (ST228-MRSA-I) v Itálii (Campanile *et al.* 2009).

V 90. letech 20. století se ve Velké Británii rozšířil klon EMRSA-15 a během 10 let se stal dominantním klonem ve Velké Británii (Johnson *et al.* 2001). V dalších letech se rozšířil např. do Německa a České republiky. EMRSA-15 patří do sekvenčního typu 22 a v roce 2011 to byl jeden z nejvýznamnějších klonů v Evropě (Grundmann *et al.* 2014). EMRSA-15 nedominoval pouze v Evropě, ale i v Austrálii. V roce 2016 tam tvořil 3/4 izolátů HA-MRSA, během let tak nahradil ST239-MRSA-III, který v Austrálii v roce 2003 tvořil 86,8 % izolátů HA-MRSA (AGAR 2017; Coombs *et al.* 2004).

Mezi významné linie HA-MRSA patří klonální komplex 5 (CC5). Na konci 90. let byl v Německu pozorován vzestup kmene nového pulzotypu, později nazvaného Rýnsko-Hessenský klon, který v roce 2006 podle Institutu pro lékařskou mikrobiologii a hygienu v Tübingenu tvořil 60 % zachycených izolátů (Schulte *et al.* 2013). V té době byly významné *spa*-typy t002 a t003 a postupem času se začal prosazovat i *spa*-typ t014. Ve studii od Grundmann *et al.*, ve které charakterizovali 1130 izolátů MRSA z 25 evropských zemí, byl t003 druhým nejčastějším *spa*-typem a t002 čtvrtým nejčastějším (Grundmann *et al.* 2014). Rýnsko-Hessenský klon je významným klonem také v Rakousku a Polsku (Chmielarczyk *et al.* 2017; Zarfel *et al.* 2016). ST5 často nesou SCC*mecII* nebo IV, zatímco u izolátů ST225 (patří k CC5) byla detekována pouze SCC*mecII*. Většina izolátů ST5 a ST225 je rezistentní k oxacilinu, erytromycinu, klindamycinu a ciprofloxacinu (Schulte *et al.* 2013).

Komunitní MRSA (CA-MRSA)

V roce 2000 vydalo americké centrum pro kontrolu a prevenci nemocí definici komunitní MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA). Infekce CA-MRSA je taková, kdy dochází k izolaci MRSA do 48 hodin od přijetí pacienta do nemocnice, a zároveň od jiné hospitalizace, chirurgického zákroku, dialýzy nebo pobytu v zařízení dlouhodobé péče uběhl více než 1 rok, dále pacient v době izolace MRSA nemá zavedený katetr nebo perkutánní zařízení a v předchozí době mu nebyla diagnostikována MRSA (Buck *et al.* 2005). Kmeny vyskytující se jako CA-MRSA se od HA-MRSA liší v několika významných faktorech. Jedním z těchto faktorů je SCC*mec* typ, kdy u HA-MRSA se nejčastěji vyskytuje SCC*mec* I, II a III, zatímco u CA-MRSA jsou nalézány SCC*mec* IV a V, které jsou kratší a předpokládá se, že svou kratší délkou působí menší zátěž na fitness MRSA (Ma *et al.* 2002). Multirezistentní CA-MRSA jsou spíše výjimkou, např. nemultirezistentní izoláty klonu komunitní MRSA USA-300 mají většinou kromě rezistence k β -laktamovým antibiotikům jen rezistenci k erytromycinu a ciprofloxacinu (Tenover *et al.* 2006). U HA-MRSA je situace odlišná, důsledkem většího tlaku v rámci nemocničního prostředí jsou rezistentní k více antibiotikům. CA-MRSA bývá virulentnější než HA-MRSA, ale ne více než mnoho meticilin citlivých kmenů (Cheung *et al.* 2011). Dalším rozdílem je Panton-Valentinův leukocidin (PVL). Tento cytolytický toxin není v základní výbavě *S. aureus*, ale je kódován na profágovi, proto se vyskytuje pouze u některých linií, u HA-MRSA se vyskytuje minimálně a nalézáme ho často u komunitních kmenů MRSA (Vandenesch *et al.* 2003).

Vyšší virulence CA-MRSA byla pozorována také v korelaci s vyšší aktivitou agr *quorum sensing* regulačního systému (Cheung *et al.* 2011). Doplnkový genový regulátor Agr (Accessory gene regulator) je jedním z dvoukomponentových systémů, které ovlivňují virulenci *S. aureus*. Agr se podílí na regulaci významných faktorů virulence, jako je např. alfa toxin, gamma-hemolysin, leukocidiny (lukAB, lukGH) a moduliny rozpustné ve fenolu (phenol soluble modulins, PSM). Zároveň se podílí na regulovaném snížení exprese některých povrchových proteinů, jako je SpA nebo povrchové receptory MnhA, MnhF a MnhG. Významnou roli ve virulenci hrají ale i další regulační vlivy (Li *et al.* 2009).

V 80. letech se začaly objevovat případy komunitní infekce MRSA, (CA-MRSA) (Saravolatz *et al.* 1982). Do té doby se lékaři setkávali s rezistentními kmeny, které ale nebyly tak virulentní a nebyl u nich přítomen PVL. Jak již bylo zmíněno výše, CA-MRSA je oproti HA-MRSA virulentnější a některé izoláty produkují PVL (Vandenesch *et al.* 2003). CA-MRSA se začalo věnovat více pozornosti až v 90. letech, kdy se v USA objevily fatální případy sepse a pneumonie u jinak zdravých dětí (Herold *et al.* 1998). Tyto infekce MRSA se projevovaly odlišně od těch předchozích, tyto kmeny byly virulentnější. Později byly reportovány případy infekce MRSA

sportovních týmů a armádních rekrutů, opět bez spojitosti s nemocniční péčí (Aiello *et al.* 2006; Begier *et al.* 2004). Tyto infekce způsobil PFGE pulzotyp USA400, který byl později nahrazen pulzotypem USA300 (CC8, *spa*-typ t008) (Jones *et al.* 2014).

Jedním z významných klonálních komplexů, ve kterém se vyskytuje CA-MRSA je klonální komplex 8 (CC8). Mezi jeho významného zástupce patří zmíněný epidemický klon USA300, který se začal šířit v 90. letech v USA a postupně začal dominovat i v nemocničním prostředí. Mezi lety 2001 – 2004 se výskyt USA300 v USA signifikantně zvýšil (Tenover *et al.* 2006) a v roce 2005 bylo v San Franciscu téměř 90 % případů MRSA z komunity, z toho 78,5 % případů bylo způsobeno izoláty USA300. Mimo rezistence k β -laktamovým antibiotikům jsou ve většině případů izoláty patřící k USA300 rezistentní k erytromycinu a některé izoláty i k fluorochinolonům (Liu *et al.* 2008).

Označení USA300 odkazuje ke klasifikaci klonálních linií (pulzotypů) metodou pulzní elektroforézy (PFGE), která byla v době počátku šíření CA-MRSA standardem pro typizaci MRSA (McDougal *et al.* 2003). USA300 se vyskytuje hlavně v Severní a Jižní Americe. Rozlišujeme severoamerickou a jihoamerickou variantu, přestože je pulzotyp PFGE obou těchto variant shodný. Tyto dvě varianty mají společného předka, který je datován přibližně do roku 1975 (Planet *et al.* 2015). Obě tyto varianty obsahují PVL, který významně přispěl k úspěšnému rozšíření USA300 nejen v komunitě, ale i v nemocnicích (Gustave *et al.* 2020). Severoamerická varianta, zkráceně USA300-NAE, je nositelem mobilního genetického elementu kódujícím katabolismus argininu (arginin catabolism mobile element, ACME), u kterého je důležitý enzym arginin deamináza, který pomáhá přežít USA300 při nižším pH (Degnan *et al.* 2000). To může být jeden z faktorů, díky kterým USA300 lépe přežívá na kůži a způsobuje převážně kožní infekce. U jihoamerické varianty, USA300-LV, se vyskytuje mobilní genetický element zajišťujícího rezistenci ke rtuti a mědi (COMER). Gustave *et al.* porovnali růstové schopnosti obou těchto variant a v mediu bez jakýchkoli přidaných látek je růstová rychlost USA300-NAE vyšší, než u USA300-LV. V případě přidání rtuti nebo mědi do media ale roste rychleji USA300-LV. Rozšíření USA300-LV v Jižní Americe geograficky koreluje s výskytem dolů mědi a rtuti (Gustave *et al.* 2020). V Evropě se USA300 téměř nevyskytuje, zatím jsou reportovány pouze raritní záchyty. Mezi lety 2005 až 2009 bylo zachyceno 34 případů USA300 v Belgii (Brauner *et al.* 2013) a v letech 2014/2015 byl v Belgii reportován outbreak o celkovém počtu 12 klinických případů a 6 nosičů (Kaïret *et al.* 2017).

Další z významných klonálních komplexů, do kterých se řadí i CA-MRSA, je CC80, reprezentovaný ST80. Do tohoto sekvenčního typu se řadí MSSA i MRSA a vyskytuje se v Evropě, severní Africe a Blízkém východě. ST80 získala SCC*mecIVc* a ve většině případů je rezistentní k fusidové kyselině, tetracyklinu, kanamycinu a amikacinu. Také je nositelem genů pro PVL

(Stegger *et al.* 2014). Od 90. let byly reportovány záchyty ST80 v západní Evropě (Brauner *et al.* 2013; Stam-Bolink *et al.* 2007; Witte *et al.* 2005), Dánsku, Norsku (Hanssen *et al.* 2005), Švédsku (Fang *et al.* 2008) a Řecku (Drougka *et al.* 2014). O výskytu ST80 ve zbytku evropských zemích nejsou publikovány studie. Většina studií, která popisovala výskyt CA-MRSA ST80 v Evropě je datována do roku 2013 a v posledních letech jsou záchyty ST80 popisovány hlavně v Severní Africe a Íránu. Z toho můžeme usuzovat, že ST80 je v Evropě na ústupu.

V Austrálii je CA-MRSA hojně rozšířen. V roce 2016 tam CA-MRSA tvořil skoro $\frac{3}{4}$ (73,6 %) všech izolátů MRSA. Velice rozšířen je tam ST93-IV, jehož izoláty tvořily 21,8 % ze všech izolátů MRSA. Tento sekvenční typ v posledních letech nahradil STI-IV, který v roce 2003 tvořil 10,8 % izolátů MRSA, zatímco v tom samém roce ST93-IV tvořil pouze 2,9 % izolátů MRSA. Je pravděpodobné, že díky dominanci ST93 začal komunitní MRSA převažovat. V roce 2003 se 133 řadilo mezi CA-MRSA, zatímco izolátů HA-MRSA bylo 393, naopak v roce 2016 bylo 368 izolátů CA-MRSA a pouze 132 izolátů HA-MRSA (AGAR 2017; Coombs *et al.* 2004).

MRSA u hospodářských zvířat (LA-MRSA)

MRSA může kromě nemocničních a komunitních zdrojů pocházet také od kontaktu se zvířaty, tzv. livestock-associated MRSA – LA-MRSA. Častým klonálním komplexem, který s těmito případy bývá spojován je CC398. Izoláty MRSA, které patří do CC398 jsou nejčastěji reprezentovány *spa*-typy t011 a t034. Price *et al.* provedli fylogenetickou analýzu, při které bylo zjištěno, že MSSA CC398 je potenciální předchůdce MRSA CC398 (Price *et al.* 2012). Izoláty MSSA CC398 nemají gen *mecA* a zároveň jsou citlivé k tetracyklinu (Mama *et al.* 2021). Gen *mecA* se u CC398 objevil až u izolátů spojených s hospodářskými zvířaty, stejně jako gen pro tetracyklinovou rezistenci, *tet* (Price *et al.* 2012). CC398 u hospodářských zvířat je faktor zvyšující pravděpodobnost infekce u lidí v přímém styku s hospodářskými zvířaty. Člověk může být také kolonizován CC398 pouhou inhalací prachu, která se v kolonizovaných kravínech/prasečincích vyskytuje (Bos *et al.* 2016). Nosičství LA-MRSA závisí na délce expozice. V případě doby nízké nebo žádné expozice se prevalence MRSA může snížit (Graveland *et al.* 2011), přesto ale MRSA CC398 může způsobovat outbreaky mezi prasaty a lidmi (Grøntvedt *et al.* 2016). Např. ve Španělsku je signifikantní rozdíl výskytu MRSA CC398 v regionech s nízkou a vysokou hustotou chovu prasat (Ceballos *et al.* 2019). Izoláty CC398 mohou u lidí způsobovat např. infekce kůže a měkkých tkání nebo bakteriémie (Murra *et al.* 2019; Witte *et al.* 2007).

Druhý nejčastější klonální komplex, který je spojován s LA-MRSA je CC9. Tento klonální komplex je dominantní LA-MRSA v Asii, a to např. v Taiwanu, Thajsku a Číně. CC9 je reprezentován např. *spa*-typem t899 a *spa*-typem t337, který nese SCC*mecIX* (Cui *et al.* 2009;

Fang *et al.* 2014; J. Larsen *et al.* 2012). U některých izolátů LA-MRSA se vyskytuje místo genu *mecA* jeho homolog *mecC* s SCC*mecXI*, např. u ST130 (Loncaric *et al.* 2013). Izoláty nesoucí SCC*mecXI* s *mecC* jsou rezistentní pouze k β -laktamovým antibiotikům, na rozdíl od izolátů CC398, u kterých je přítomen gen pro tetracyklinovou rezistenci (Aires-de-Sousa 2017). Díky celogenomovému sekvenování byl zjištěn přenos mezi hospodářskými zvířaty a člověkem (Harrison *et al.* 2013), což může znamenat, hospodářská zvířata jako potenciální rezervoár *mecC*.

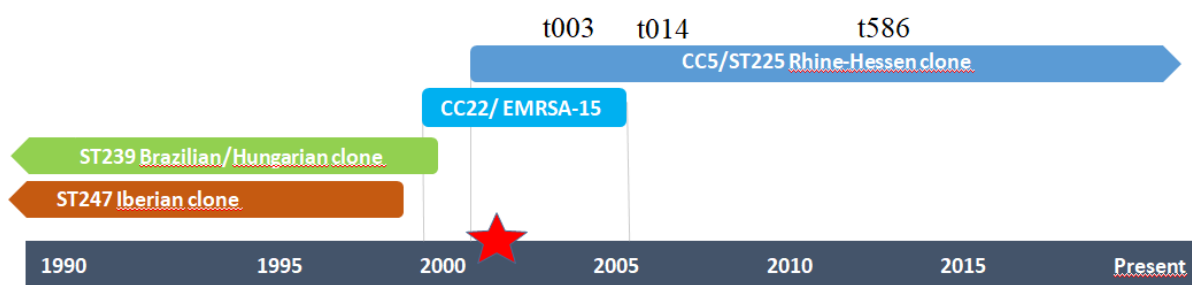
Tab. 2. Hlavní linie MRSA u lidí a zvířat ve světě. Tučně zvýrazněné sekvenční typy reprezentují dominantní ST typy na jednotlivých kontinentech. Převzato a upraveno z (Aires-de-Sousa 2017).

	Lidé		Zvířata	
	HA-MRSA	CA-MRSA	Prasata	Dobytěk
Evropa	ST5, ST8, ST22	ST80	ST1, ST97, ST398	ST8, ST130 , ST398
Severní Amerika	ST5, ST8	ST8	ST398	
Jižní Amerika	ST5, ST239	ST8		
Asie	ST5, ST239	ST30, ST59	ST9	
Oceánie	ST22, ST239	ST30, ST93		
Afrika	ST5, ST88, ST239			

3.3.3 MRSA v ČR a střední Evropě (diskuse z článku 2020, mapa střední Evropy)

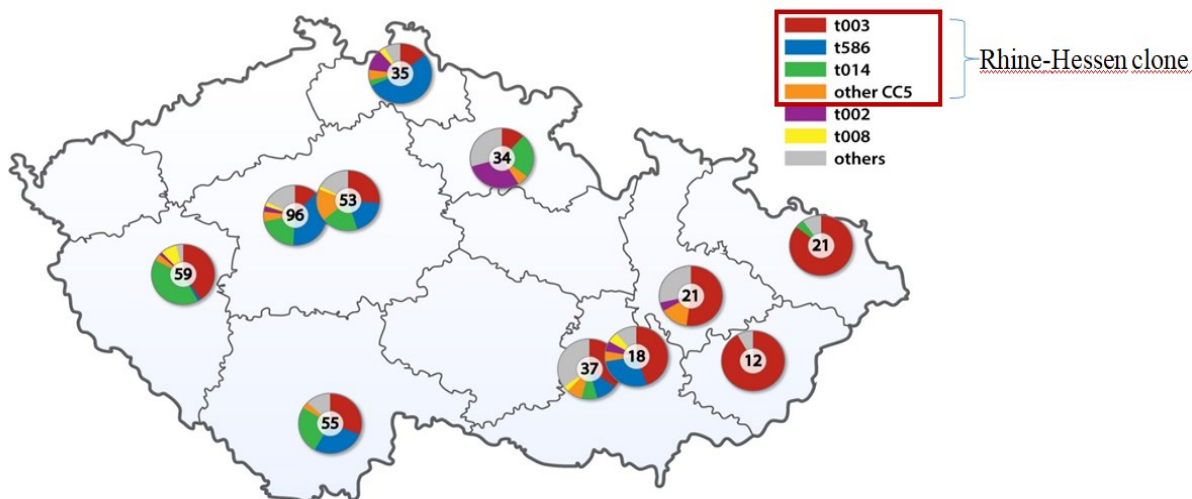
Mezi významné epidemické klony, které v České republice dominovaly, patří Iberijský klon (Sanches *et al.* 1995), Brazilský klon (Aires De Sousa *et al.* 1998) a E-MRSA – 15 (Enright *et al.* 2002).

První případy MRSA v České republice se objevily v 90. letech. Studie Meltera z roku 1999 popsala dominanci Brazilského (ST239-IIIa-t037) a Iberijského (ST247-I) klonu (Melter *et al.* 1999). Následná sbírka izolátů v letech 2000-2002 pak potvrdila dominanci Iberijského klonu, Brazilský klon byl ovšem nahrazen novým, „Českým klonem“ (Czech clone, ST239-III-t030), který sice patřil do stejného sekvenčního typu, byl ale jiného *spa*-typu (Melter *et al.* 2003). Co se týká antibiotické rezistence, Iberijský klon byl rezistentní k ciprofloxacinu, gentamicinu a tobramycinu. Brazilský klon byl ve většině případů rezistentní k erytromycinu, klindamycinu, ciprofloxacinu, gentamicinu, tetracyklinu a trimetoprim-sulfametaxazolu, Český klon byl k trimetoprim-sulfametaxazolu citlivý, rezistentní byl navíc k rifampinu, zbytek antibiotik se shodoval s Brazilským klonem (Melter *et al.* 1999; 2003).



Obr. 3. Dominantní klony MRSA v České republice od 90. let do současnosti. Červená hvězda značí zvýšení prevalence MRSA v České republice.

V roce 2006 proběhla mezinárodní studie, kde se ukázala nová nastupující dominance t003 (CC5-II, 66,7 %) a t032 (CC22-IV, 13,7 %). *spa*-typ t003 byl významný i v sousedním Německu, kde byl známý jako Rýnsko-Hessenský klon. *spa*-typ t032 byl v té době epidemicky významný hlavně ve Velké Británii a Irsku, označovaný jako EMRSA-15 (Grundmann *et al.* 2010). Dominanci CC5 potvrdila i studie od Neradová *et al.*, kdy ze 62 izolátů, zachycených v období 2010-2016 v královehradecké nemocnici, patřilo 61 do klonálního komplexu 5 (Neradova *et al.* 2020). Další studie, která mapovala výskyt MRSA v ČR, byla z naší laboratoře od Tkadlec *et al.* z roku 2021. Sběr MRSA na tuto studii probíhal na přelomu roku 2017/2018 v 11 českých nemocnicích (viz Obrázek 4). V roce 2017 v České republice dominoval klonální komplex 5, který byl reprezentován hlavně *spa*-typy t003 (SCC*mec*II, pokračující dominance), t014 (SCC*mec*II) a nově se objevujícím *spa*-typem t586 (SCC*mec*II, nastupující dominance). Tyto 3 *spa*-typy byly ve většině případů rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a ofloxacinu (Tkadlec *et al.* 2021). V další recentní studii bylo v období 2016-2018 v ČR dále nasbíráno 618 izolátů MRSA, kdy byl CC5 opět dominantním klonálním komplexem (91,7 % izolátů), většina izolátů byla tvořena *spa*-typy t003 (38,8 %) a t586 (20,9 %) (Pomorska *et al.* 2021).



Obr. 4. Rozložení jednotlivých *spa*-typů v nemocnicích v České republice na přelomu let 2017, 2018. Sběr probíhal v 11 českých nemocnicích a je zde vidět výrazná dominance klonálního komplexu 5 reprezentovaného hlavně Rýnsko-Hessenským klonem. Převzato z (Tkadlec *et al.* 2021).

Na Slovensku zatím neexistují veřejně dostupné studie ohledně epidemiologie MRSA.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny a izoláty

V rámci této diplomové práce byly provedeny dvě studie zaměřené na analýzu klinických a nosičských izolátů MRSA:

- Multicentrická studie epidemiologie MRSA na Slovensku, rok 2020

Mezi lednem a dubnem 2020 bylo získáno 413 izolátů MRSA. Sběr probíhal ve všech 8 krajích Slovenska, zahrnoval izoláty od pacientů hospitalizovaných v 16 nemocnicích a izoláty od pacientů navštěvujících ambulantní pracoviště nemocnic, poliklinik nebo praktických lékařů v 77 městech na Slovensku.

- Longitudinální studie výskytu MRSA ve FN Motol, 2018-2020

Sběr probíhal mezi lednem 2018 a prosincem 2020. Za tři roky studie bylo nasbíráno 347 neduplikovaných izolátů MRSA.

U všech těchto izolátů byla provedena *spa*-typizace, SCC*mec* typizace a diskový difuzní test pro stanovení citlivosti k antibiotikům (viz Výsledky kapitola 5.1 a 5.2).

V rámci této práce byly také porovnány fyziologické vlastnosti izolátů reprezentující dominantní klonální linie z výše uvedených studií a sbírkové kmeny z předchozích studií naší skupiny reprezentující dominantní linie MRSA vyskytující se v ČR od poloviny 90. let minulého století:

Tab. 3. Seznam izolátů vybraných pro bližší charakteristiku jejich fyziologických vlastností s jejich *spa*-typem, linií, původem linie a výskytem. Původ linie: HA (hospital-associated) – nemocniční; CA (community-associated) – komunitní; LA (livestock-associated) – hospodářská zvířata.

Název izolátu	<i>spa</i> -typ	Linie	Původ	Výskyt	Reference
M870	t008	CC8 (ST8)	CA	Slovensko 2020	Tato práce
M897	t032	CC22	HA	Slovensko 2020	
M911	t311	CC5 (ST5)	CA	Slovensko 2020	
Brazilian clone 185 KV (BC)	t037	CC8 (ST239)	HA	ČR 1996–2002	(Melter <i>et al.</i> 1999; 2003)
Iberian clone 21 pl (IC)	t051	CC8 (ST247)	HA	ČR 1996–2002	

Czech clone 52 (CC)	t030	CC8 (ST239)	HA	ČR 1996–2002	(Tkadlec <i>et al.</i> 2021)
UK EMRSA15 HN729 (EMRSA15)	t379	CC22	HA	ČR 2001–2004	
M23	t586	CC5 (ST225)	HA	ČR 2017	
M25	t003	CC5 (ST225)	HA	ČR 2017	
M30	t034	CC398	LA	ČR 2017	
M66	t032	CC22	HA	ČR 2017	
M93	t014	CC5 (ST225)	HA	ČR 2017	
M117	t011	CC398	LA	ČR 2017	
M122	t008	CC8 (ST8)	CA	ČR 2017	
M276	t005	CC22	CA	ČR 2017	

4.1.2 Chemikálie a kity

Chemikálie a kity použité při experimentech uskutečněných v rámci diplomové práce jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4. Seznam názvů a výrobců použitých chemikálií a kitů.

Název chemikálie/kitu	Výrobce
Manitol salt agar	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
Tryptone soya broth (TSB)	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
Brain heart infusion (BHI)	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
Columbia krevní agar (5 %)	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
Muller-Hinton agar	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
MIKROLATEST® - Set pro stanovení MIC u <i>S. aureus</i>	Erba Lachema s.r.o.
Disky pro testování antibiotické citlivosti	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
Oxacilin	Bristol-Myers Squibb
Azitromycin	Sigma-Aldrich s.r.o.
Fosfátový pufr (PBS)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Chelex-100	BIO-RAD
HotStartTaq® Master Mix Kit	Qiagen
HotStartTaq® DNA Polymerase	Qiagen
Deoxynucleotide Set	Sigma-Aldrich s.r.o.
SeaKem® LE Agaróza	Lonza

GelRed®	Biotium
Agencourt® AMPure XP	Beckman Coulter
Agencourt® CleanSEQ	Beckman Coulter
BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
BigDye® Enhancing Buffer	MCLAB
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich s.r.o.

4.1.3 Primery a sondy

Seznam primerů a sond použitých při experimentech uskutečněných v rámci diplomové práce jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5. Seznam primerů a sond použitých v experimentální části této diplomové práce, včetně jejich komerčního názvu, sekvence a velikosti produktu.

*Při použití primerů *SCCmecV* lze detekovat jednak *SCCmecV*, jednak variantu *SCCmecV_t*, které se liší délkou produktu (325 bp vs 1600 bp).

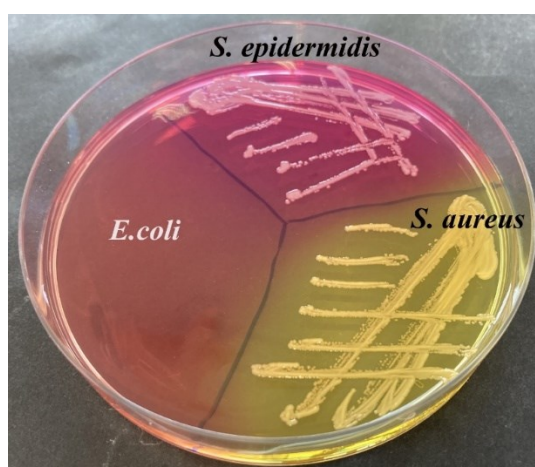
Cílový gen	Název oligonukleotidu	Sekvence 5'-3'	Velikost produktu	Reference
<i>spa</i>	<i>spa</i> -1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	Variabilní délka produktu	(Strommenger <i>et al.</i> 2008)
	<i>spa</i> -1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		
<i>mecA</i>	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286bp	(Kondo <i>et al.</i> 2007)
	mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA		
<i>ccrA1</i>	α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695bp	
<i>ccrA2</i>	α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937bp	
<i>ccrA3</i>	α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	1791bp	
<i>ccrB1</i> , <i>ccrB2</i> , <i>ccrB3</i>	βC	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	kombinace s α1, α2, α3	
<i>ccrA4</i>	α4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	1287bp	
<i>ccrB4</i>	β4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTT		
<i>ccrC</i>	γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATA AT	518bp	
	γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAA TAT		
SCC <i>mec</i> I	SCC <i>mec</i> I-F	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG	613bp	(Zhang <i>et al.</i> 2005)
	SCC <i>mec</i> I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
SCC <i>mec</i> II	SCC <i>mec</i> II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398bp	
	SCC <i>mec</i> II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
SCC <i>mec</i> III	SCC <i>mec</i> III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280bp	
	SCC <i>mec</i> III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
SCC <i>mec</i> IVa	SCC <i>mec</i> IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776bp	
	SCC <i>mec</i> IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		

SCC <i>mec</i> IVb	SCC <i>mec</i> IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493bp		
	SCC <i>mec</i> IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC			
SCC <i>mec</i> IVc	SCC <i>mec</i> IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200bp		
	SCC <i>mec</i> IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG			
SCC <i>mec</i> IVd	SCC <i>mec</i> IVd-F5	CTCAAATACGGACCCCAATACA	881bp		
	SCC <i>mec</i> IVd-R6	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG			
SCC <i>mec</i> IVg	SCC <i>mec</i> IVg-F	TGATAGTCAAAGTATGGTGG	792bp		(Milheiro <i>et al.</i> 2007)
	SCC <i>mec</i> IVg-R	GAATAATGCAAAGTGGAACG			
SCC <i>mec</i> IVh	SCC <i>mec</i> IVh-F	TTCCTCGTTTTTCTGAACG	663bp		
	SCC <i>mec</i> IVh-R	CAAACACTGATATTGTGTCG			
SCC <i>mec</i> V	SCC <i>mec</i> V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325bp (1600 bp)*	(Zhang <i>et al.</i> 2005)	
	SCC <i>mec</i> V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC			
<i>arcA</i>	<i>arcA</i> -F	GAGCCAGAAGTACGCGAG	724 bp	(Diep <i>et al.</i> 2006)	
	<i>arcA</i> -R	CACGTAACTTGCTAGAACGAG			
<i>lukSF</i> (PVL)	<i>lukSF</i> -F	TTACACAGTTAAATATGAAGTGAAC TGGA	118 bp	(Nakagawa <i>et al.</i> 2005)	
	<i>lukSF</i> -R	AGCAAAAGCAATGCAATTGATG			
	<i>lukSF</i> -sonda	Hex-AAGTGAAAGGACATAATTG			
<i>spa</i>	<i>spa</i> -F	CAGCAAACCATGCAGATGCTA	101 bp		
	<i>spa</i> -R	CGCTAATGATAATCCACCAAATACA			
	<i>spa</i> -sonda	Rox-TCAAGCATTACCAGAAAC			
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -F	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	155 bp		
	<i>mecA</i> -R	CTAATCTCATATGTGTTCCCTGTATTG GC			
	<i>mecA</i> -sonda	Fam-TTCCAGGAATGCAGAAAGACCA AAGCA-BHQ-1			

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace

Klinické izoláty byly kultivovány na Manitol Salt agaru (OXOID) po dobu 24 h. Toto médium obsahuje 7,5% koncentraci solí inhibující růst většiny bakterií mimo stafylokoky a manitol, jehož fermentace vizualizovaná změnou barvy přítomného pH indikátorů je druhově specifickou vlastností *S. aureus* (viz Obrázek 5). Po nárůstu byla totožnost kolonií ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight, Bruker Daltonics (MALDI-TOF). Pro dlouhodobé uchování byly kultury skladovány v -80°C v zamrazovacím médiu (Trypton sójový bujón) obsahujícím DMSO.



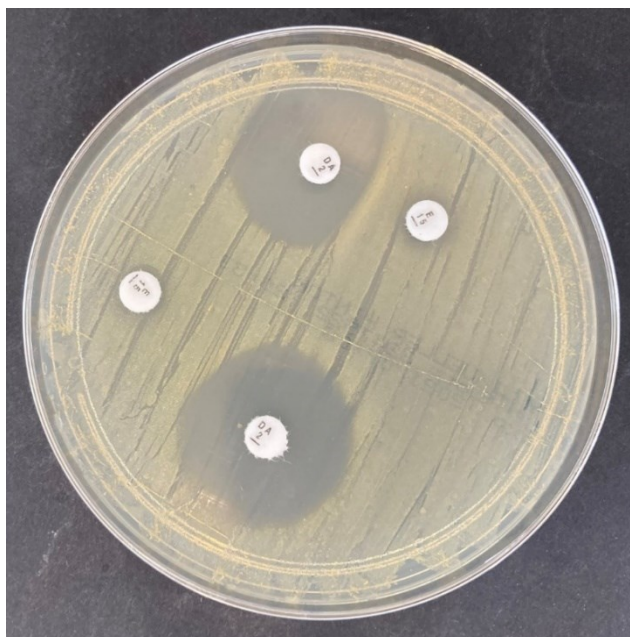
Obr. 5. Ukázka nárůstu *S. aureus*, *S. epidermidis* a *E. coli* na plotně s manitol agarem. Růst *E. coli* je inhibován v důsledku vysoké koncentrace solí (až 7,5 %). Stafylokoky takovou koncentraci soli tolerují, a proto je vidět nárůst *S. aureus* i *S. epidermidis*.

4.2.2 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Diskový difuzní test

Citlivost klinických izolátů MRSA k antibiotikům byla testována pomocí diskového difuzního testu. Antibiotikum, které je obsaženo v disku difunduje do okolí, inhibuje růst bakterií a tím se vytvoří inhibiční zóna, ve které nedochází k viditelnému růstu. Průměr této zóny se odečte posuvným měřítkem a porovná se s referenční hodnotou určující citlivost/rezistenci k danému antibiotiku. Rezistence ke klindamycinu může být inducibilní, v nepřítomnosti induktoru se takový izolát jeví citlivým. V případě testování citlivosti diskovým difuzním testem indukce klindamycinové rezistence dosahuje blízkostí disku s erythromycinem (v rozmezí 12-20 mm), (SZÚ 2014), který rezistenci indukuje a způsobuje jednostrannou deformaci zóny kolem disku

s klindamycinem, tzv. D-zóna (viz Obrázek 6). Izolát tvořící D-zónu by neměl být považován za citlivý ke klindamycinu.



Obr. 6. Ukázka D-zóny na plotně s Mueller-Hintovým agarem. Záleží na vzdálenosti mezi diskem s erytromycinem a klindamycinem. Na obrázku nahoře je vidět nerovnoměrný nárůst okolo klindamycinového disku. Tento jev se nazývá tzv. D-zóna a dochází k ní v důsledku inducibilní rezistence. Tento jev můžeme pozorovat pouze v určité vzdálenosti od disku s erytromycinem. Na obrázku dole je vidět rovnoměrně rozložená zóna v důsledku velké vzdálenosti od erytromycinu, a tudíž nedochází ke tvorbě D-zóny a izolát se jeví jako citlivý.

Postup: Z kolonií narostlých na Manitol Salt agaru byl ve fyziologickém roztoku připraven zákal o hodnotě 0,5 McFarland. Připravenou suspenzi byla plošně naočkována plotna s Muller-Hintonovým agarem (Oxoid). Raznicí byly na plotnu umístěny jednotlivé disky obsahující tato antibiotika (Oxoid): oxacilin, sulfametaxazol-trimetoprim, erytromycin, klindamycin, cefoxitin, tetracyklin, gentamicin, teicoplanin, vankomycin, ofloxacin, rifampicin, linezolid, ceftarolin, tigecyklin a ciprofloxacin. Plotny byly kultivovány přes noc při teplotě 37 °C a druhý den byly průměry inhibičních zón hodnoceny dle platných doporučení Evropské komise pro testování citlivosti k antimikrobním látkám (EUCAST 2020).

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

U vybraných izolátů (viz. Kapitola 4.1.1) byla citlivost k antibiotikům určena také stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) mikrodiluční metodou (MIKROLATEST®, Erba Lachema s.r.o.).

Postup: Z kolonií narostlých na Manitol Salt agaru byl ve fyziologickém roztoku vytvořen zákal 0,5 McFarlanda (odpovídající přibližně koncentraci buněk $1,5 \times 10^8$ buněk/ml). Do 13 ml MIC suspenzního media bylo přidáno 60 μ l připravené bakteriální suspenze. Následně bylo suspenzní médium v množství 100 μ l na jamku rozplněno do 96 jamkové mikrotitrační destičky s lyofilizovanými antibiotiky. Mikrotitrační destička byla inkubována při 37 °C přes noc.

Druhý den bylo odečteno MIC, odpovídající koncentraci antibiotika v první jamce ve vzestupné řadě, ve které již není přítomen viditelný zákal. Hodnoty MIC byly interpretovány dle každoročně aktualizovaného doporučení Evropské komise pro testování citlivosti k antimikrobním látkám (EUCAST 2020).

4.2.3 Molekulárně genetická analýza studovaných kmenů

Izolace DNA

DNA vybraných izolátů byla extrahována pomocí Chelexu. Chelex je pryskyřice, která se skládá ze styren divinylbenzen kopolymeru obsahující párové iminodiacetátové ionty. Při lýzi buňky dochází k aktivaci endonukleáz. Na aktivaci se podílejí ionty Mg^{2+} , které se ale v případě izolace Chelexem naváží na iminodiacetátové ionty.

Postup: Nejprve byla bakteriální kultura homogenizována v 5% roztoku Chelexu-100. Tato směs byla dále inkubována 10 min při 100 °C v termobloku. V této fázi dochází k lýzi buňky a denaturaci DNA. Poté byla suspenze stočena po dobu 10 min při 13500 rcf. Horní fáze byla přenesena do nové 1,5ml zkumavky tak, aby nedošlo k odsátí Chelexu s buněčnými zbytky. DNA byla dále skladována při -20 °C.

Detekce přítomnosti *mecA*, *spa* a *lukSF*

Pro detekci přítomnosti genů *mecA*, *spa* a *lukSF* (gen pro PVL) byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) v reálném čase na cycleru Biorad CFX96. Princip detekce je založen na monitorování fluorescence vznikající při hydrolýze DNA vazebných fluorescenčně značených sond. Tyto sondy obsahují na svém 5' konci fluorescenční značení a na 3' je zhášec, který blokuje fluorescenci fluoroforu, pokud je v jeho blízkosti. V případě, že je ve vzorku detekovaný úsek DNA, sonda na něj nasedne v oblasti mezi oběma primery a při amplifikaci ji DNA polymeráza svou 5' exonukleázovou aktivitou rozštěpí. Tím se fluorofor uvolní z dosahu zhášecí a začne emitovat světlo odpovídající vlnové délky, které zachytí optické detektory v termálním cycleru. Děj se opakuje při dalších cyklech PCR, vzhledem k rostoucímu počtu kopií detekovaného úseku DNA se v každém cyklu zvyšuje intenzita signálu. V případě, že detekovaný

gen ve vzorku není, nedojde k hydrolyze sondy, zhášeč zůstane v blízkosti fluoroforu a žádný signál není.

Pro detekci *lukSF* byla použita sonda 5' Hexachloro-Fluorescein (HEX), pro *spa* byl použit 6-Karboxyl-X-Rhodamin a pro *mecA* sonda 6-Karboxylfluorescein (FAM). V tabulce 6 jsou objemy chemikálií použité na jeden vzorek a v tabulce 7 program amplifikace PCR. Sekvence sond a primerů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tab. 6. Seznam a objem chemikálií použitých při PCR. Primer mix = primer F i R od jednoho genu ve stejném poměru.

Chemikálie	Objem/vzorek
Voda bez RNáz	doplnit do 20 μ l
10xHotStart PCR buffer	2 μ l
MgCl ₂	2 μ l
dNTP	0,8 μ l
Primer mix	à 0,6 μ l
Sonda	à 0,6 μ l
HotStart Taq polymeráza	0,256 μ l

Tab. 7. Program PCR amplifikace pro qPCR, stanovení přítomnosti *mecA*, *spa* a *lukSF* (PVL).

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	15 min	1
96 °C	20 s	45
58 °C	60 s	
72 °C	10 s	1

***spa*-typizace**

Metoda *spa*-typizace je založena na analýze sekvence variabilní části (oblast X) genu pro stafylokokový protein A (*spa*). Primery (viz Tabulka 5) používané na *spa*-typizaci nasedají na okolní konzervované úseky a namnoží variabilní úsek mezi nimi. Získaný produkt je sekvenován a dle jeho sekvence je izolátu přiřazen tzv. *spa*-typ.

Postup: DNA byla extrahována z izolátu pomocí Chelexu (viz kapitola 4.2.3), následovala PCR amplifikace produktu. V tabulce 8 jsou uvedeny objemy chemikálií počítané pro 1 vzorek. Jednotlivé chemikálie byly promíchány, krátce stočeny a napipetovány do sterilní zkumavky. Výsledný mastermix byl řádně promíchán, stočen a rozplněn do jednotlivých 0,2ml PCR zkumavek. Jako templát byl použit 1 ul extrahované DNA.

PCR probíhala dle programu, který je v Tabulce 9 v PCR cycleru Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems™).

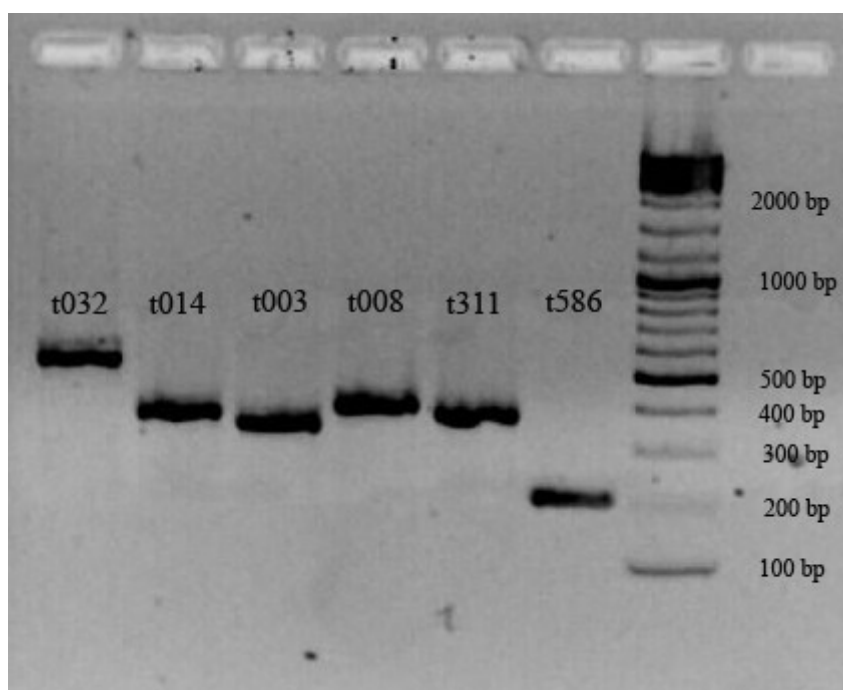
Tab. 8. Seznam a objem chemikálií použitých při PCR

Chemikálie	Objem/vzorek
HotStart mix	6,25 µl
Voda bez RNáz	4,75 µl
F primer	0,25 µl
R primer	0,25 µl

Tab. 9. Program PCR *spa*-typizace

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	15 min	1
96 °C	45 s	30
60 °C	45 s	
72 °C	90 s	
72 °C	10 s	1

Přítomnost a délka produktů PCR byly detekovány pomocí gelové elektroforézy v 2% agarozovém gelu.



Obr. 7. Ukázka variability v délce *spa* produktu a variabilní oblasti X.

Následně byly produkty PCR přečištěny pomocí magnetický kuliček Agencourt® AMPure XP, na které se navázala dvouvláknová DNA. Magnetické kuličky s navázanou DNA byly 2x promyty v 75% roztoku etanolu. Následovalo odsátí veškerého etanolu, který by inhiboval sekvenační reakci, a vysušení vzorku. DNA byla poté eluována ve 40 µl sterilní injekční vody a přenesena do čisté zkumavky. V tomto stavu byl vzorek připraven pro sekvenační reakci.

Jednotlivé chemikálie, které jsou vypsány v Tabulce 10 byly promíchány, krátce stočeny a napipetovány do sterilní zkumavky. S reagensii bylo nutné pracovat na ledu kvůli stabilitě BigDye Terminator v3.1. Výsledný mastermix byl řádně promíchán, krátce stočen a rozplněn do 96ti jamkové destičky, která je kompatibilní se sekvenátorem. Na každou sekvenační reakci byly použity 2 µl přečištěného PCR produktu. Program amplifikace je v Tabulce 11.

Tab. 10. Seznam a objem chemikálií použitých při sekvenační reakci.

Chemikálie	Objem/vzorek
Injekční voda	5,18 µl
BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	1,5 µl
BDX 64(BigDye® Enhancing Buffer)	0,875 µl
BigDye Terminator v3.1	0,125 µl
Primer	0,32 µl

Tab. 11. Program sekvenační reakce.

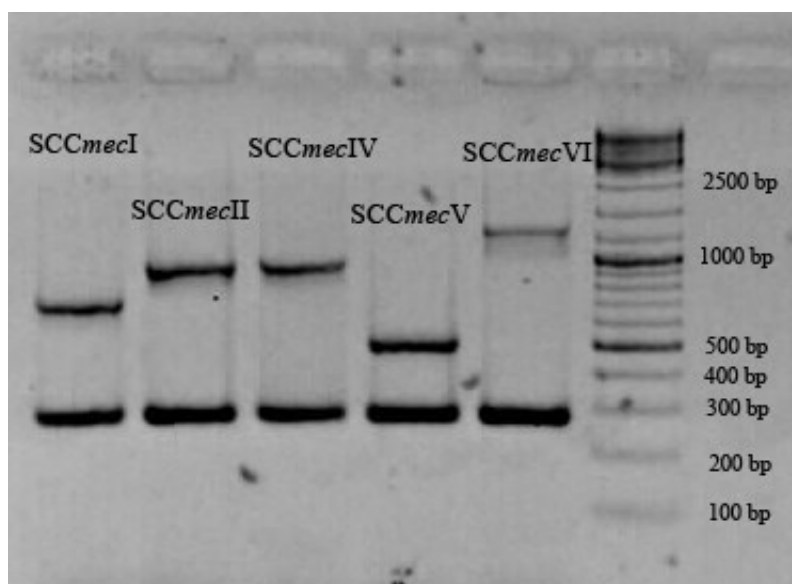
Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	3 min	1
96 °C	10 s	30
50 °C	5 s	
60 °C	2 min	

Po sekvenační reakci byly produkty přečištěny pomocí magnetických kuliček Agencourt® CleanSEQ, na které se navázala DNA. Zbytky mastermixu sekvenační reakce byly odmyty 85% roztokem etanolu. Po odsátí etanolu a vysušení vzorku následovala eluce DNA do 80 µl injekční vody. 96ti jamková deska byla vložena do sekvenátoru ABI 3130xl Genetic Analyzer a vzorky byly osekvenovány pomocí kapilární elektroforézy.

Výsledné sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu RidomStaphType, který na základě sekvence určil typ jednotlivých repetitivních sekvencí a dle jejich typu a pořadí určil, o jaký *spa*-typ se jednalo. Výsledné *spa*-typy pak byly rozřazeny do jednotlivých MLST klonálních komplexů na základě údajů dostupných v databázi <https://spaserver.ridom.de/>, nebo v odborné literatuře.

SCC*mec* typizace

Typizace SCC*mec* slouží k odlišení variant stafylokokové chromozomální kazety (SCC – Staphylococcal chromosomal cassette) *mec*, tj. mobilního genetického elementu nesoucího gen *mecA* zodpovědný za rezistenci k meticilinu u většiny kmenů MRSA. Typizace SCC*mec* byla prováděna kombinací PCR metod prokazujících specifické oblasti jednotlivých typů a subtypů kazety SCC*mec*. V první fázi byla provedena u všech vzorků PCR esej dle Kondo *et al.* (mastermix viz Tabulka 13, program PCR viz Tabulka 12). Ve druhé fázi byla provedena PCR esej dle Zhang *et al.* (mastermix viz Tabulka 13, program PCR viz Tabulka 12) k odlišení typů II a IV, a odlišení subtypu a-d u typu IV (Zhang *et al.* 2005). Vzorky, které vyšly v první fázi jako IV, ale nevyšly jako SCC*mec* II nebo IVa-d byly dourčeny jako typ IVh pomocí primerů ze studie Milheirico *et al.* (Milheirico *et al.* 2007). PCR protokol byl stejný jako od Zhang *et al.*, pouze s použitím jiných primerů.



Obr. 8. Ukázka typizace kazety SCC*mec* pomocí eseje dle Kondo *et al.* 2007

Tab. 12. Seznam použitých PCR pro stanovení jednotlivých typů SCC*mec*.

*60-65 °C rozmezí teplot kvůli rozdílné teplotě nasedání jednotlivých primerů.

Metoda	Použití	Pozn.	PCR protokol
(Kondo et al. 2007)	Rozlišení typů I – VI + <i>mecA</i>	Použitá reakce nerozliší typy II a IV	96 °C 15 min (96 °C 90 s, 60 °C 90 s, 72 °C 105 s) x 35 72 °C 5 min
(Zhang et al. 2005)	Odlišení typu II, a subtypizace typů IVa-IVd, konfirmace		96 °C 15 min (96 °C 60 s, 60-65* °C 90 s, 72 °C 90 s) x 35
(Milheiriço, Oliveira, and de Lencastre 2007)	Subtypizace IVg a IVh		72 °C 10 min

Tab. 13. Seznam a objem chemikálií použitých při typizaci SCC*mec* podle různých esejí. Kombinací primerů mA1 a mA2 vzniká produkt *mecA*; kombinací primerů Alfa1 a BetaC vzniká produkt SCC*mec*I (695 bp); kombinací primerů Alfa2 a BetaC vzniká produkt SCC*mec*II (937 bp); kombinací primerů Alfa3 a BetaC vzniká produkt SCC*mec*III (1791 bp); kombinací primerů Alfa4.2 a Beta4.2 vzniká produkt SCC*mec*VI (1287 bp); kombinací primerů gammaR a gammaF vzniká produkt SCC*mec*V (518 bp)

Chemikálie	Objem/vzorek	
	Kondo	Zhang/Milheirico
HotStart mix	6,25 µl	6,25 µl
Voda bez RNáz	1 µl	4,5 µl
Primer mA1	0,5 µl	-
Primer mA2	0,5 µl	-
Primer Alfa1	0,5 µl	-
Primer Alfa2	0,5 µl	-
Primer Alfa3	0,5 µl	-
Primer BetaC	0,5 µl	-
Primer Alfa4.2	0,5 µl	-
Primer Beta4.2	0,5 µl	-
Primer GammaR	0,5 µl	-
Primer GammaF	0,5 µl	-
Primer mix*	-	1 µl

Přítomnost a délka PCR produktů byly detekovány pomocí gelové elektroforézy ve 2% agarozovém gelu.

4.2.4 Analýza fyziologických vlastností studovaných kmenů

Stanovení růstové rychlosti

U vybraných izolátů (viz Kapitola 4.1.1) byla stanovena růstová rychlost. Každý izolát byl rozmražen a vyočkován na manitol salt agar. Po nárůstu byla 1 kolonie kultury přeočkována do sterilní kónické 50ml zkumavky Falcon (KARTELL) s 10 ml čerstvého sterilního trypton sójového bujónu (TSB) a kultivována v třepačce při 200 otáčkách za minutu a 37 °C přes noc. Vytemperované (37 °C) TSB medium bylo v triplicátu naočkováno z narostlé noční kultury na optickou denzitu OD₆₀₀ v rozmezí 0,05-0,09. Čisté médium sloužilo jako negativní kontrola. Kultury byly vloženy do třepačky a kultivovány při 200 otáčkách za minutu a 37 °C. Po dobu 8 hodin se každou hodinu měřila optická denzita (OD₆₀₀) rostoucích kultur. Poté se kultury třepaly až do dalšího dne, kdy bylo po 24 hodinách od naočkování provedeno poslední měření.

Studované kmeny byly kultivovány v čistém TSB médiu nebo v přítomnosti subinhibičních koncentrací antibiotik. Subinhibiční koncentrace byly použity s cílem simulovat prostředí znečištěné zbytkovým množstvím antibiotika, např. prostředí nemocnic, ve kterém probíhá selekce rezistentních kmenů. Použité koncentrace byly určeny pomocí dat o distribuci hodnot MIC pro daná antibiotika zaznamenaných u klinických izolátů *S. aureus* sbíraných Evropskou komisí pro testování citlivosti k antimikrobním látkám (dostupné na https://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/), vybrány byly koncentrace, pro něž nebyl zaznamenán izolát, jenž by byl takovou koncentrací inhibován (viz tabulka 14).

Tab. 14. Seznam použitých antibiotik při stanovení růstové rychlosti, s koncentrací, která byla použita v pokusech a s mezí pro určení rezistence.

Antibiotikum	Použitá koncentrace	Mez pro určení rezistence
Oxacilin	0,008 mg/l	0,25 mg/l
Azitromycin	0,016 mg/l	2 mg/l

Doba zdvojení jednotlivých izolátů byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$GT = \frac{t}{3,3 \log_2 (b/B)}$$

Obr. 8. Vzorec pro výpočet doby zdvojení. GT = doba zdvojení, t = interval mezi měřeními b a B , b = hodnota OD₆₀₀ bakteriální populace po čase t , B = počáteční hodnota OD₆₀₀ bakteriální populace.

Kvantifikace tvorby biofilmu

U vybraných izolátů (viz. Kapitola 4.1.1) byla kvantifikována produkce biofilmu s použitím modifikované Christensenovy metody (O'Toole 2010). Zamražené izoláty byly vyočkovány na Manitol salt agar. Po nárůstu byla 1 kolonie z každé kultury inokulována v 50ml zkumavce Falcon ve 3 ml čerstvě připraveného TSB média s 1% glukózou. Zkumavka byla kultivována v třepačce při 200 otáčkách za minutu a 37 °C po dobu 18 hodin. Noční kultura byla naředěna TSB médiem v poměru 1:100 a po 200 µl byla naočkována do mikrotitrační destičky. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen ATCC 25923, jako negativní kontrola sterilní TSB médium. Mikrotitrační destička byla kultivována staticky při 37 °C po dobu 24 h. Další den byla kultura opatrně slita a destička byla 3x propláchnuta ponořením do fosfátového pufru (PBS – phosphate buffered saline). Po okapání bylo do každé z jamek mikrotitrační destičky přidáno 200 µl 0,1% krystalové violeti. Po 15 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo barvivo slito, mikrotitrační deska byla 3x propláchnuta v PBS a přes noc vysušena dnem vzhůru. Další den byl obarvený biofilm rozpuštěn v 200 µl směsi etanol:aceton (80:20). Po 15 minutách bylo 100 µl suspenze přeneseno do čisté mikrotitrační destičky a změřila se absorbance při 620 nm. Vyhodnocování probíhalo porovnáním s pozitivní a negativní kontrolou.

Kvantifikace tvorby hemolýzy

Kvantifikace tvorby hemolýzy byla provedena u vybraných izolátů (viz. Kapitola 4.1.1) modifikací postupů Tsenga a Majerczyka (Majerczyk *et al.* 2008; Tseng *et al.* 2016). Každý izolát byl vyočkován na Manitol salt agar. Po nárůstu byla 1 kolonie z každé kultury inokulována ve 3 ml čerstvě připraveného sterilního TSB média v 50ml sterilní zkumavce Falcon a kultivována přes noc v třepačce při 200 otáčkách za minutu a 37 °C. Noční kultura byla naočkována do 10 ml sterilního TSB média v nové sterilní 50ml zkumavce Falcon na optickou denzitu $OD_{600} = 0,05$ a kultivována přes noc v třepačce při 200 otáčkách za minutu a teplotě 37 °C. Další den byla zkumavka s kulturou stočena po dobu 10 min při 5000 rcf a 4 °C, supernatant byl odebrán a sterilován filtrací. Byla připravena dvojnásobná ředící řada supernatantu v PBS. Jednotlivá ředění byla inkubována v poměru 1:1, 100 µl supernatantu se 100 µl 2% suspenzí krvinek v PBS při 37 °C po dobu 30 minut. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok 1% Triton X-100, negativní kontrola bylo sterilní PBS. Po inkubaci byla suspenze stočena 5 minut při 1000 rpm a supernatant byl opatrně (aby nedošlo k lýze peletovaných erytrocytů) přenesen do čisté mikrotitrační destičky s plochým dnem. Byla změřena optická denzita suspenze při OD_{540} . Hemolytická aktivita odpovídající změně optické denzity

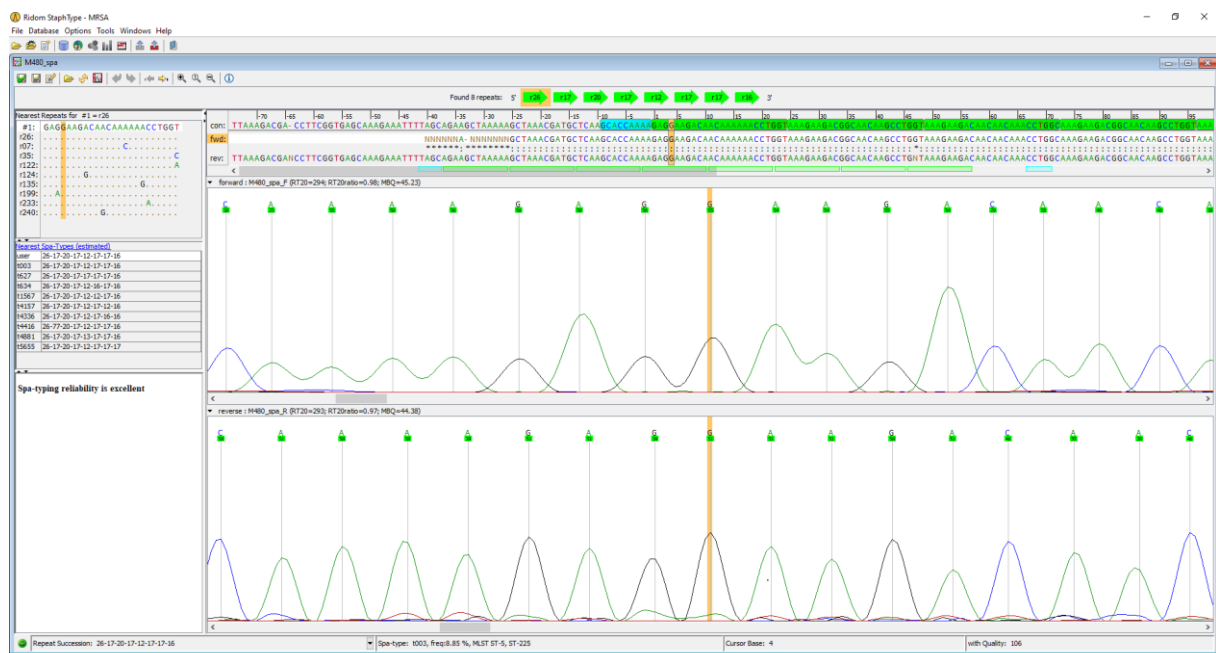
v důsledku uvolnění hemoglobinu z lyzovaných erytrocytů se vyjádřila v procentech podle následujícího vzorce:

$$\frac{(\text{test OD}_{540} - \text{negativní kontrola OD}_{540})}{(\text{pozitivní kontrola OD}_{540} - \text{negativní kontrola OD}_{540})}$$

Obr. 9. Vzorec pro výpočet hemolýzy.

4.2.5 Statistické a bioinformatické metody

Pro určení *spa*-typu byl využit software RidomStaph Type. Ten umožňuje automatické přiřazení analyzovaných sekvencí k existujícím repeticím, jejichž pořadí přiřadí sekvenci ke *spa*-typu. Také umožňuje klastrovací analýzu pomocí algoritmu BURP, který dokáže seskupit blízké příbuzné *spa*-typy (Harmsen *et al.* 2003).



Obr. 10. Snímek obrazovky zobrazující vyhodnocení *spa*-typu t003 v softwaru RidomStaph Type. DNA izolátu je osekvenována Sangerovým sekvenováním a tato data jsou vložena do softwaru. Program si podle sekvencí najde 3' a 5' konec, které mají shodné sekvence pro všechny *spa*-typy a poté přiřadí zbylé sekvence k jednotlivým repeticím. Podle typu a pořadí repetice je pak určen *spa*-typ, na obrázku v levé části jsou pak zobrazeny další možné *spa*-typy, které se oproti danému *spa*-typu liší pouze v jedné repetici.

5. Výsledky

5.1 Epidemiologie MRSA ve Fakultní nemocnici Motol 2018-2020

Od roku 2018 do konce roku 2020 probíhal ve Fakultní nemocnici Motol (FN Motol) sběr MRSA izolátů. Cílem tohoto sběru bylo monitorování epidemiologické situace MRSA ve FN Motol. Celkem bylo nasbíráno 347 neduplikovaných izolátů MRSA, jejichž druhová identifikace byla ověřena pomocí metody MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Rezistentní fenotyp MRSA byl ověřen pomocí testování citlivosti k oxacillinu a cefoxitinu a přítomnost genetické determinanty rezistence (gen *mecA*) byla ověřena pomocí PCR.

5.1.1 Izoláty MRSA

Izoláty MRSA pocházely z nemocničních ambulancí (n = 91), oddělení urgentního příjmu (n = 24), standardních lůžkových oddělení (n = 132) a z jednotek intenzivní péče (JIP, n = 100) FN Motol. Ambulance a urgentní příjem představují oddělení zabývající se pacienty přicházejícími z komunity, u izolátů MRSA od těchto pacientů je tedy větší šance, že se jedná o linii cirkulující mezi populací mimo nemocnice tzv. komunitní MRSA, naproti tomu lůžková oddělení a JIP jsou obvyklým místem výskytu nemocničních linií MRSA. Průměrný věk pacientů s MRSA byl 43 let a ze 347 izolátů 60,81 % pocházelo od mužů (n = 211). Nejčastější materiál, ze kterého byly izoláty MRSA vykultivovány, byl stěr z rány v počtu 139 izolátů (40,06 %), z toho 81 materiálů pocházelo z ortopedických a chirurgických klinik.

Tab. 15. Demografické srovnání původu izolátů, včetně průměrného věku, přítomnosti PVL a rozložení pohlaví pacientů.

	Ambulance + urgentní příjem	Standardní oddělení + JIP
Počet izolátů	116	229
Průměrný věk	43,18 let	42,85 let
Pohlaví	57,76 % mužů	62,45 % mužů
Přítomnost PVL	32 izolátů (27,59 %)	23 izolátů (10,04 %)

5.1.2 Antibiotická citlivost

U izolátů byla diskovou difuzní metodou testována citlivost k následujícím antistafylokokovým antibiotikům: oxacilin, sulfametaxazol-trimetoprim, erytromycin, klindamycin, cefoxitin, tetracyklin, rifampicin, gentamicin, vankomycin, teikoplanin, linezolid, ofloxacin, tigecyklin a ceftarolin.

Citlivost k těmto antibiotikům je rutinně testována v klinické praxi ve FN Motol. Z testovaných izolátů bylo 29 rezistentních pouze k oxacilinu a cefoxitinu. U 83 % izolátů se vyskytovala navíc rezistence k erytromycinu (n = 288), 81,56 % izolátů bylo rezistentních ke klindamycinu (n=283) a 74,35 % rezistentních k ofloxacinu (n=258). Pomocí D testu byla prokázána inducibilní rezistence ke klindamycinu u 7 izolátů. Dále byla prokázána rezistence ke gentamicinu u 46 izolátů (13,26 %) a k tetracyklinu u 45 izolátů (12,97 %).

Z 288 izolátů, které byly rezistentní k erytromycinu, bylo 280 zároveň rezistentní i ke klindamycinu. Rezistence k ofloxacinu byla ve 244 izolátech spojena s rezistencí k erytromycinu a klindamycinu. U 5 izolátů byla kromě rezistence k oxacilinu a cefoxitinu rezistence ke gentamicinu a tetracyklinu. Pouze 2 z izolátů byly rezistentní k sulfametaxazol-trimetoprimu, další dva k rifampicinu a pouze jeden izolát byl rezistentní k ceftarolinu. U žádného z izolátů se neprokázala rezistence k vankomycinu, teikoplaninu, linezolidu a tigecyklinu. Podrobnější kombinace rezistenci k antibiotikům je uvedena v Tabulce 16.

Tab. 16. Profily antibiotické rezistence u motolských izolátů MRSA v souvislosti s původem izolátů a jejich *spa*-typy. Tučně jsou zvýrazněny *spa*-typy, u nichž byl detekován PVL. Procenta u jednotlivých kombinací antibiotik značí podíl ambulantních/nemocničních izolátů, které byly touto kombinací zastoupeny. Ve sloupci celkový počet je uvedena procentuální hodnota v celkovém rozložení izolátů.

Vysvětlení zkratk: OXA = oxacilin; FOX = cefoxitin; ML = makrolidy (erytromycin) + linkosamidy (klindamycin); OFL = ofloxacin; GEN = gentamicin; TET = tetracyklin; RIF = rifampicin; SXT = sulfametaxazol-trimetoprim; CPT = ceftarolin

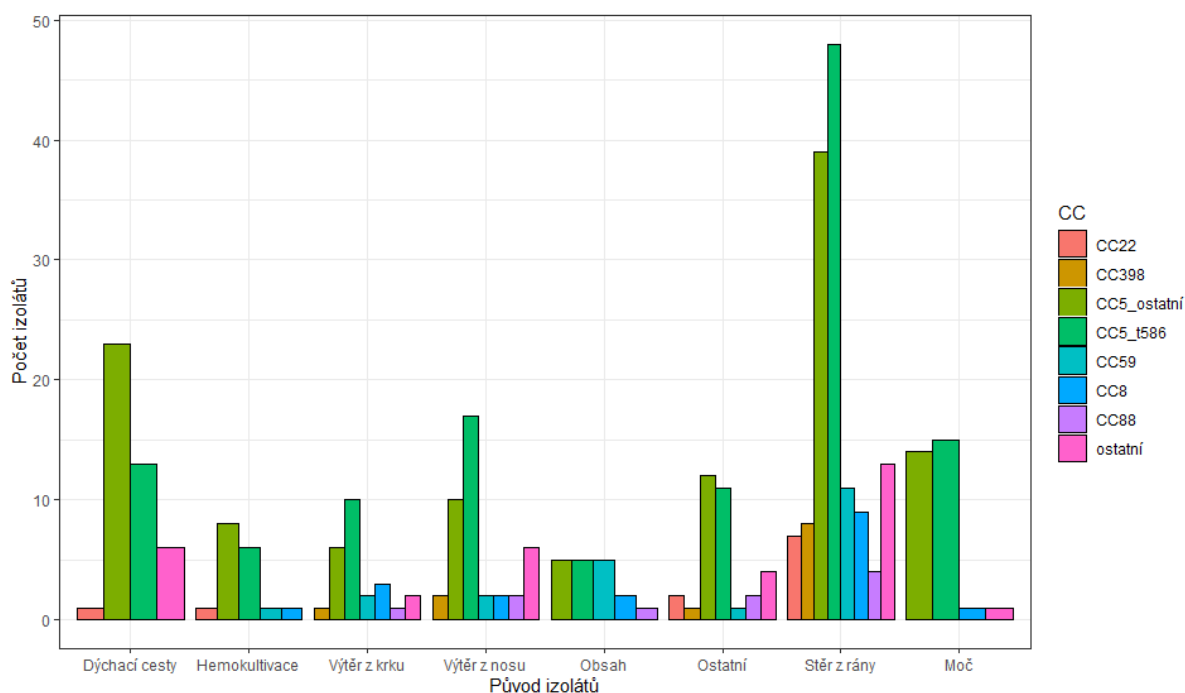
Ostatní kombinace: ML, GEN, TET (n = 1, t437, PVL+, ambulance/urgent); ML, SXT, OFL (n = 1, t586, JIP/Standard); ML, SXT, TET (n = 1, t437, ambulance/urgent), ERY, TET, OFL (n = 1, t345, PVL+, JIP/Standard), ERY (n = 1, t214, ambulance/urgent), ML, OFL, CPT (n = 1, t003, JIP/Standard)

Kombinace antibiotik	Ambulance + urgentní příjem (n=116)		Standardní oddělení + JIP (n=229)		Celkový počet
	Počet	<i>spa</i> -typy	Počet	<i>spa</i> -typy	
ML, OFL	52 (45,22 %)	t002, t003, t014, t045, t264, t586, t1282, t1623, t2379	153 (65,95 %)	t002, t003, t008 , t014, t045, t091, t151, t311, t437 , t586, t626, t1224, t1282, t1623, t2379, t3195	205 (59,09 %)
ML, OFL, GEN	8 (6,95 %)	t002, t005 , t014, t586, t7428	24 (10,35 %)	t002, t003, t014, t223 , t586	32 (9,22 %)
Pouze OXA, FOX	9 (7,82 %)	t002 , t008 , t019 , t091, t190 , t304, t8727	20 (8,63 %)	t002 , t008 , t026, t045 , t050, t091, t197 , t223, t304, t311, t437 , t728, t786, t2461	29 (8,36 %)
ML, TET	14 (12,17 %)	t011, t014, t034 , t437 , t441 , t1751 , t1950	7 (3,02 %)	t034 , t127, t437	21 (6,05 %)
TET	5 (4,35 %)	t044, t437 , t1339	8 (3,45 %)	t014, t376 , t954, t1339	13 (3,75 %)
ML	7 (6,09 %)	t008 , t026, t437 , t685, t1950	4 (1,72 %)	t024 , t311, t437 , t3401	11 (3,17 %)
OFL	3 (2,61 %)	t008 , t032, t550	1 (0,43 %)	t008	4 (1,15 %)
ERY, OFL	-	-	4 (1,72 %)	t008 , t032, t264	4 (1,15 %)
OFL, GEN	4 (3,48 %)	t005	-		4 (1,15 %)

ML, TET, GEN	1 (0,87 %)	t437	2 (0,86 %)	t437	3 (0,86 %)
CLI, TET	1 (0,87 %)	t571	2 (0,86 %)	t034	3 (0,86 %)
GEN	2 (1,74 %)	t355, t3092	1 (0,43 %)	t4019	3 (0,86 %)
TET, GEN	3 (2,61 %)	t127, t346, t359	-	-	3 (0,86 %)
ERY, OFL, GEN	1 (0,87 %)	t008	1 (0,43 %)	t008	2 (0,58 %)
ML, OFL, RIF	1 (0,87 %)	t003	1 (0,43 %)	t2379	2 (0,58 %)
ML, OFL, TET	1 (0,87 %)	t011	1 (0,43 %)	t034	2 (0,58 %)
Ostatní kombinace	3 (2,61 %)	t011, t214, t437 ,	3 (1,29 %)	t003, t345, t586	6 (1,73 %)
Celkem	115 (33,14 %)		232 (66,86 %)		347

5.1.3 Klonální struktura

Pro účely analýzy klonální struktury byla u všech 347 izolátů provedena *spa*-typizace, vyhodnocení sekvencí a přiřazení *spa*-typů k jednotlivým izolátům proběhlo pomocí softwaru Ridom StaphType. Většinu izolátů tvořily *spa*-typy t586 (n = 125), t003 (n = 34), t014 (n = 45) a t002 (n = 18) z klonálního komplexu 5 (CC5). Dalším častým *spa*-typem byl t437 (n = 17) z klonálního komplexu CC59. Čtrnáct izolátů *spa*-typů: t008, t024, t304, t197 patřilo do komplexu CC8.



Graf 1. Rozložení klonálních komplexů u izolátů z FN Motol. Vzhledem k vysokému zastoupení *spa*-typu t586, který patří do klonálního komplexu 5, byl tento *spa*-typ vyobrazen samostatně. Jako materiál z dýchacích cest byl považován aspirát dolních dýchacích cest, aspirát nasofaryngeální a sputum. Jako obsah byl považován tekutý materiál odebraný z primárně sterilních dutin a tkání. Za ostatní materiál byl považován katetr, dren, likvor, lochie, stěr z amnia, výtěr z rekta a stolice.

Nejvyšší počet z nasbíraných izolátů nesl *SCCmec* typu II, a to v počtu 236 izolátů (68,01 %). Tento *SCCmec* typ byl reprezentován hlavně *spa*-typy t003, t014 a t586, které všechny patří do klonálního komplexu 5. Druhé nejvyšší zastoupení měl *SCCmec*IV v počtu 66 izolátů (19,02 %). U tohoto *SCCmec* typu byly dále určeny podtypy. Nejvíce bylo podtypu IVa v počtu 39 izolátů, dále 16 izolátů podtypu IVc, 1 izolát IVd a 1 izolát IVh. U 9 izolátů nebyl podtyp *SCCmec*IV dourčen. Byl detekován 1 izolát typu *SCCmec*VI a zbylých 44 izolátů (12,68 %) neslo typ *SCCmec* V, z toho 2 izoláty nesly variantu *SCCmec* V_t.

Tab. 17. Rozložení typů SCCmec, jejich procentuální zastoupení u izolátů ve FN Motol a časté *spa*-typy, které se vyskytovaly u izolátů jednotlivých typů SCCmec.

SCCmec typ	Počet izolátů	Procentuální zastoupení	<i>spa</i> -typ	
II	236	68,01 %	t002, t003, t014, t045, t151, t264, t586, t626, t1224, t1282, t1623, t2379, t3195	
IV	a	39	11,24 %	t002, t005, t008, t024, t026, t127, t190, t214, t223, t304, t437, t728, t786, t1339
	c	16	4,61 %	t002, t008, t019, t044, t045, t197, t223, t376, t685, t2461, t7428
	d	1	0,29 %	t437
	h	1	0,29 %	t032
	nedourčeno	9	2,59 %	t032, t050, t091, t311, t3401, t8727
V	44	12,68 %	t011, t034, t091, t127, t345, t346, t355, t359, t437, t441, t550, t571, t1751, t1950, t3092, t4019	
VI	1	0,29 %	t954	

5.1.4 Panton-Valentinův leukocidin

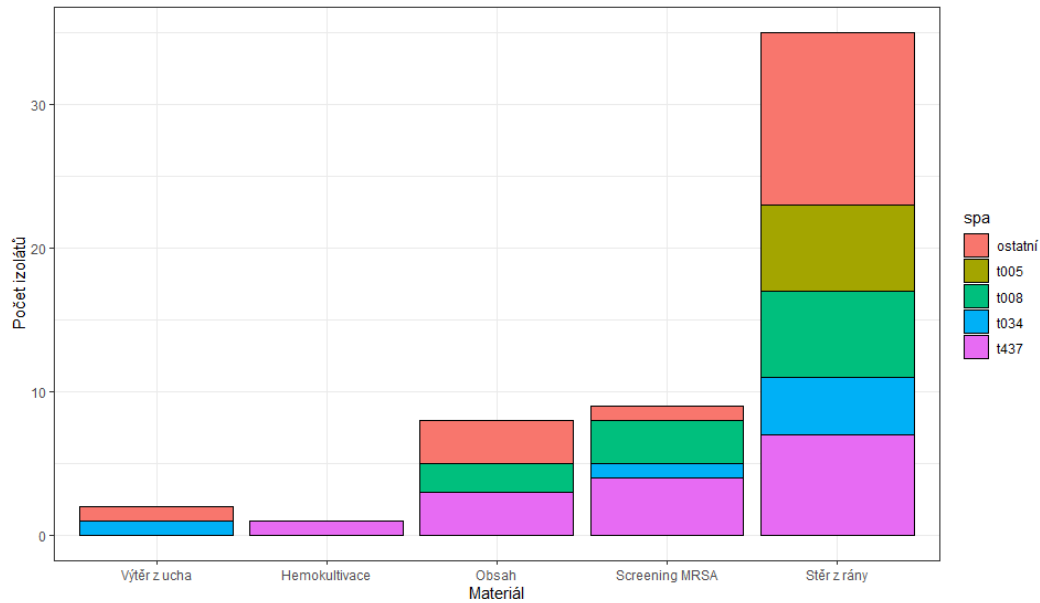
Panton-Valentinův leukocidin je významný faktor spojený s virulencí *S. aureus*. PVL pozitivní izoláty mohou způsobovat např. závažnou nekrotizující pneumonii, a i další infekce těmito izoláty mívají horší prognózu. Proto byla u izolátů provedena real-time PCR na detekci genu pro PVL toxin. PVL se detekuje častěji u některých linií CA-MRSA (Vandenesch *et al.* 2003). Izoláty těchto linií pochází ve většině případů z komunity, ale může dojít i k jejich výskytu v nemocnicích.

Celkem bylo detekováno 55 izolátů (15,85 %) s PVL toxinem. Průměrný věk pacientů s izolátem produkujícím PVL toxin (28,87 let) se signifikantně lišil ($p < 0,001$) od průměrného věku pacientů s izolátem bez PVL toxinu (45,73 let).

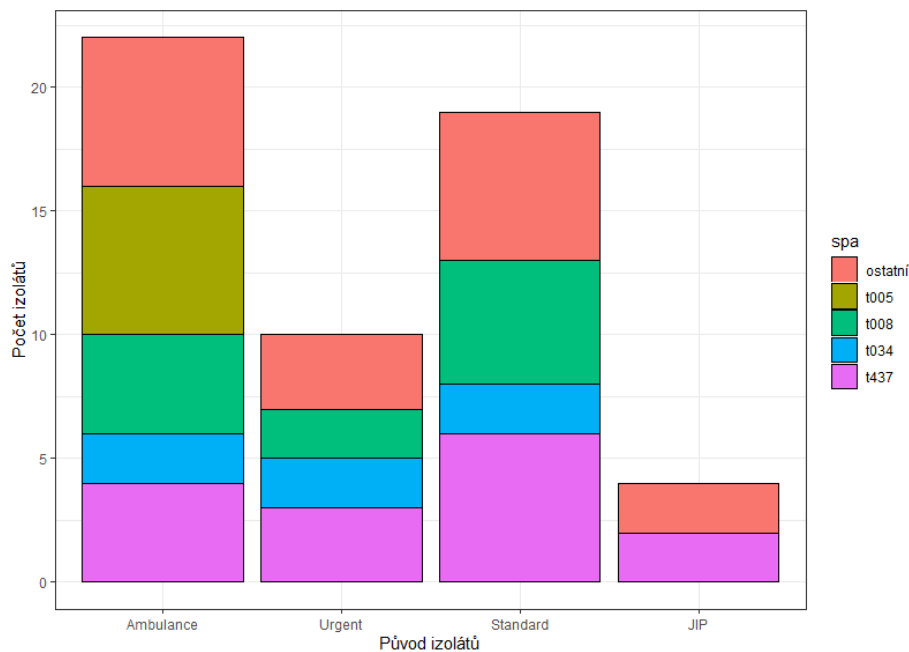
63,67 % ($n = 35$) PVL pozitivních izolátů pocházela ze stěru z rány, dále 8 izolátů z obsahu, 9 izolátů bylo zachyceno při screeningu nosičství MRSA (výtěr z nosu a krku), 2 ze stěru ucha a 1 vzorek z hemokultivace (viz Graf 2).

Tradiční genetické linie CA-MRSA nesoucí PVL byly zastoupeny *spa*-typy např. t008 (CC8), t005 (CC22), t437 (CC59) a t034 (CC398) (viz Grafy 2 a 3). *spa*-typ t005 s PVL toxinem se vyskytoval pouze u ambulantních pacientů ze stěru z rány, bližší souvislost mezi těmito izoláty však nebyla prokázána. Jedenáct z PVL pozitivních izolátů patřilo ke *spa*-typu t008 (CC8) a bylo tedy podezřelých na příslušnost k epidemickému klonu USA300 (t008-MRSA-

IVa; PVL+, ACME+). Sedm z izolátů bylo potvrzeno na základě průkazu *SCCmec* typu IVa a genu *arcC* (součást mobilního genetického elementu ACME) jako USA300. Tři ze zbylých izolátů nesly *SCCmec* IVc a u jednoho z izolátů nebyl prokázán ACME.



Graf 2. Rozložení *spa*-typů u jednotlivých materiálu v PVL pozitivních izolátů.



Graf 3. Zobrazení původu a rozložení *spa*-typů PVL pozitivních izolátů. Nejčastějšími zástupci PVL pozitivních izolátů jsou *spa*-typy t008 (n = 11) a t437 (n = 15).

5.2. Epidemiologie MRSA Slovensko leden-duben 2020

Další částí předkládané práce byla analýza Slovenských izolátů MRSA, která byla umožněna díky spolupráci se společností Unilabs Slovensko provozující síť mikrobiologických laboratoří na Slovensku. Sběr probíhal od ledna do dubna 2020. Izoláty pocházely z nemocnic (n = 167) a z ambulancí (n = 245) v osmi krajích na Slovensku (Banská Bystrica, Bratislava, Košice, Nitra, Prešov, Trenčín, Trnava a Žilina). Celkem bylo nasbíráno 413 neduplikátních izolátů MRSA, které byly ověřeny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

5.2.1 MRSA izoláty

Průměrný věk pacientů byl 42 let a 45,96 % bylo mužů (n = 199). Necelá třetina izolátů pocházela od pacientů s infekcí nebo kolonizací horních cest dýchacích (n = 130; 31,48 %) přibližně další třetina od pacientů s infekcí kůže a měkkých tkání (n = 117; 28,33 %). Zbylá třetina izolátů pocházela z hemokultivací, moče a různých výtěrů, jako např. výtěr z oka, uší, pochvy nebo uretry.

5.2.2 Antibiotická citlivost

Pomocí diskové difuzní metody byla testována citlivost k následujícím antibiotikům: oxacilin, sulfametaxazol-trimetoprim, erytromycin, klindamycin, cefoxitin, tetracyklin, rifampicin, gentamicin, vankomycin, teikoplanin, linezolid, tigecyklin, ceftarolin, norfloxacin, ciprofloxacin, kyselina fusidová a mupirocin.

U 54 izolátů byla prokázána rezistence pouze k oxacilinu a cefoxitinu. Stejně jako u českých izolátů byla u slovenských izolátů významná rezistence k makrolidům, linkosamidům a fluorochinolonům: 77,72 % izolátů bylo rezistentních k erytromycinu (n = 321), 64,9 % izolátů bylo rezistentních ke klindamycinu (n = 268), z toho u 119 z nich byla rezistence ke klindamycinu inducibilní, a 63,44 % izolátů bylo rezistentní k fluorochinolonům (v 261 případech rezistentních k ciprofloxacinu a v 247 případech rezistentních k norfloxacinu). U 18 izolátů byla prokázána rezistence k fusidové kyselině (4,36 %), 15 izolátů bylo rezistentní k tetracyklinu (3,63 %), 12 izolátů ke gentamicinu (2,9 %), 4 izoláty k rifampicinu (0,97 %) a 3 izoláty k mupirocinu (0,73 %). 1 izolát byl rezistentní k tigecyklinu, rezistence byla ověřena pomocí MIC (1 mg/l). U žádného z izolátů nebyla detekována rezistence k sulfametaxazol-trimetoprimu, vankomycinu, teikoplaninu, linezolidu a ceftarolinu.

Nejčastější kombinací antibiotik, ke kterým byly izoláty rezistentní, byla kombinace: erytromycin, klindamycin a fluorochinolony (ciprofloxacin a norfloxacin) v počtu 129 izolátů

(31,23 %). V této kombinaci nebyl detekován jediný izolát, který by měl PVL. Druhou nejčastější kombinací byla kombinace rezistence k erytromycinu s inducibilní rezistencí ke klindamycinu (n = 70; 16,95 %). V Tabulce 18 jsou rozepsány veškeré zbylé kombinace rezistencí. K oxacilinu a cefoxitinu byly rezistentní všechny izoláty, a proto nejsou, kromě případu, kdy byly izoláty rezistentní pouze k nim, zmíněny.

Tab. 18. Profily antibiotické rezistence u slovenských izolátů MRSA v souvislosti s původem izolátů a jejich *spa*-typy. Tučně jsou zvýrazněny *spa*-typy, u nichž byl detekován gen pro PVL toxin. Procenta u jednotlivých kombinací antibiotik značí podíl ambulantních/nemocničních izolátů, které byly touto kombinací zastoupeny. Ve sloupci celkový počet je uvedena procentuální hodnota v celkovém rozložení izolátů.

Vysvětlení zkratk: OXA = oxacilin; FOX = cefoxitin; ML = makrolidy (E = erytromycin) + linkosamidy (CLI = klindamycin); iCLI = indukovaná rezistence ke klindamycinu; F = fluorochinolony (CIP = ciprofloxacin, NOR = norfloxacin); GEN = gentamicin; TET = tetracyklin; TGC = tigeicyklin; RIF = rifampicin; CPT = ceftarolin; FA = fusidová kyselina

* U jednoho vzorku nebyl dohledatelný jeho původ

Ostatní kombinace: ML, F, FA (n = 1, t003, nemocnice); CLI, TET (n = 1, t034, ambulance); ML, GEN, F, MUP (n = 1, t032, nemocnice); ML, RIF, F (n = 2, t032, t014, ambulance); ML, RIF, F, FA (n = 1, t003, ambulance); ML, TET (n = 2, t034, ambulance, nemocnice); ML, TET, GEN, F (n = 1, t014, ambulance); E, GEN, F (n = 1, **t008**, ambulance); E, RIF, F, FA (n = 1, **t008**, nemocnice); E, TET (n = 1, t656, ambulance); E, iCLI, F, MUP (n = 1, **t008**, nemocnice); E, iCLI, FA (n = 2, t010, t330, nemocnice, ambulance); E, iCLI, TGC, F (n = 1, t032, ambulance); FA (n = 2, **t311**, nemocnice); MUP (n = 1, t311, nemocnice); TET (n = 1, t5163, ambulance); TET, F (n = 1, t4652, ambulance); TET, FA (n = 1, **t044**, nemocnice); TET, GEN, FA (n = 2, **t044**, **t314**, nemocnice, ambulance); ML, CIP (n = 1, t026, ambulance); E, NOR (n = 1, t19659, ambulance); CIP (n = 2, t010, t015, ambulance)

Kombinace antibiotik	Ambulance (n=245)		Nemocnice (n=167)		Celkový počet
	Počet	<i>spa</i> -typy	Počet	<i>spa</i> -typy	
ML, F	57 (23,27 %)	t002, t003, t014, t022, t032, t264, t1282, t19658, 19660	72 (43,11 %)	t003, t014, t025, t032, t535, t4232	129 (31,23 %)
E, iCLI	50 (20,41 %)	t008 , t010, t015, t026, t179, t311 , t330, t706, t1215, t1303, t1683, t2065, t4545, t9710, t11862, t19662	20 (11,98 %)	t010, t026, t179, t311, t855, t1683, t3235	70 (16,95 %)
OXA, FOX	37 (15,11 %)	t002, t010, t015, t024, t026, t065, t311, t548, t671, t880, t1265, t1345, t4264, t7603, t7768	17 (10,18 %)	t010, t026, t095, t179, t311 , t586, t761, t779, t12321, t19661	54 (13,07 %)
E, F	28 (11,43 %)	t008 , t622	12 (7,18 %)	t003, t008	40 + 1* (9,93 %)
E, iCLI, F	15 (6,12 %)	t003, t008 , t014, t020, t026, t032, t045, t910, t2892	13 (7,78 %)	t002, t014, t022, t032, t586, t10016	28 (6,78 %)

F	10 (4,08 %)	t008 , t032, t179, t6589, t19753	12 (7,18 %)	t003, t008 , t032, t1302, t6589	22 (5,33 %)
E, iCLI, CIP	10 (4,08 %)	t008, t010, t045, t330	2 (1,2 %)	t010, t19657	12 (2,9 %)
ML	5 (2,04 %)	t010, t065, t3235	-	-	5 (1,21 %)
ML, GEN, F	3 (1,22 %)	t003, t008	2 (1,2 %)	t003	5 (1,21 %)
E	4 (1,63 %)	t008, t311	1 (0,6 %)	t026	5 (1,21 %)
E, F, FA	4 (1,63 %)	t008 , t316	-	-	4 (0,97 %)
F, FA	1 (0,41 %)	t032	3 (1,8 %)	t026, t032	4 (0,97 %)
E, iCLI, TET	3 (1,22 %)	t127, t2393 , t17565	-	-	3 (0,73 %)
E, iCLI, TET, GEN, F	1 (0,41 %)	t008	2 (1,2 %)	t026, t032	3 (0,73 %)
Ostatní kombinace	17 (6,94 %)	t003, t008 , t010, t014, t015, t026, t032, t034, t314 , t656, t4562, t5163, t19659	11 (6,59 %)	t003, t008 , t010, t032, t034, t044 , t311	28 (6,78 %)
Celkem	245 (59,32 %)		167 (40,44 %)		412 + 1*

5.2.3 Klonální struktura

Za účelem studia klonální struktury MRSA cirkulujících na Slovensku byla u izolátů provedena *spa*-typizace. Hojně byly zastoupeny *spa*-typy t003 (n = 42), t014 (n = 55) a t311 (n = 29) reprezentující klonální komplex 5 (n = 192). Na rozdíl od FN Motol se na Slovensku často vyskytoval *spa*-typ t032 (n = 63) z klonálního komplexu 22. Z epidemiologického hlediska je významný výskyt *spa*-typu t008 (n = 61), u kterého byl ve většině případů detekován PVL toxin. Izoláty se *spa*-typem t008 byly dále pomocí PCR testovány na přítomnost ACME (arginine catabolic mobile element), mobilního genetického elementu zprostředkujícím lepší odolnost stafylokoků na povrchu kůže. Izoláty se *spa*-typem t008 a s přítomným ACME jsou známy jako klon USA300, který spadá pod CA-MRSA a je epidemiologicky významný hlavně v USA. Výskyt hlavních *spa*-typů dle krajů na Slovensku shrnuje Tabulka 19.

Tab. 19. Zastoupení *spa*-typů v jednotlivých krajích na Slovensku.

* U 1 izolátu *spa*-typu t008 nebyl dohledatelný jeho původ, celkem bylo nasbíráno 61 izolátů se *spa*-typem t008. Tento jeden izolát není zahrnut do celkového součtu v této tabulce, proto je celkem = 412.

Kraj	CC5				CC8		CC22		Ostatní CC	Celkem
	t003	t014	t311	Ostatní	t008	Ostatní	t032	ostatní		
Banská Bystrica	8	16	4	13	13	2	5	4	17	82
Bratislava	0	1	0	4	1	0	1	0	0	7
Košice	16	16	22	9	17	0	28	2	22	132
Nitra	1	4	0	13	8	0	4	0	1	31
Prešov	10	7	3	13	15	0	15	2	24	89
Trenčín	0	5	0	6	1	0	5	1	2	20
Trnava	4	1	0	0	4	1	5	2	4	21
Žilina	3	5	0	8	1	1	0	0	12	30
Celkem	42	55	29	66	60*	4	63	11	82	412

U izolátů MRSA bylo provedeno určení SCC*mec* typů. Největší podíl ze 413 nasbíraných izolátů tvořil SCC*mec* IV (61,26 %), z toho 67 izolátů neslo subtyp SCC*mec* IVa, 7 izolátů SCC*mec* IVb, 5 izolátů SCC*mec* IVc, 74 izolátů SCC*mec* IVh a u 101 izolátů se nepodařilo určit podtyp. Zastoupen byl také SCC*mec* typ II s počtem 106 izolátů (25,67 %). 9,69 % izolátů (n = 40) bylo určeno jako SCC*mec* I, 9 izolátů (2,18 %) neslo SCC*mec* V.

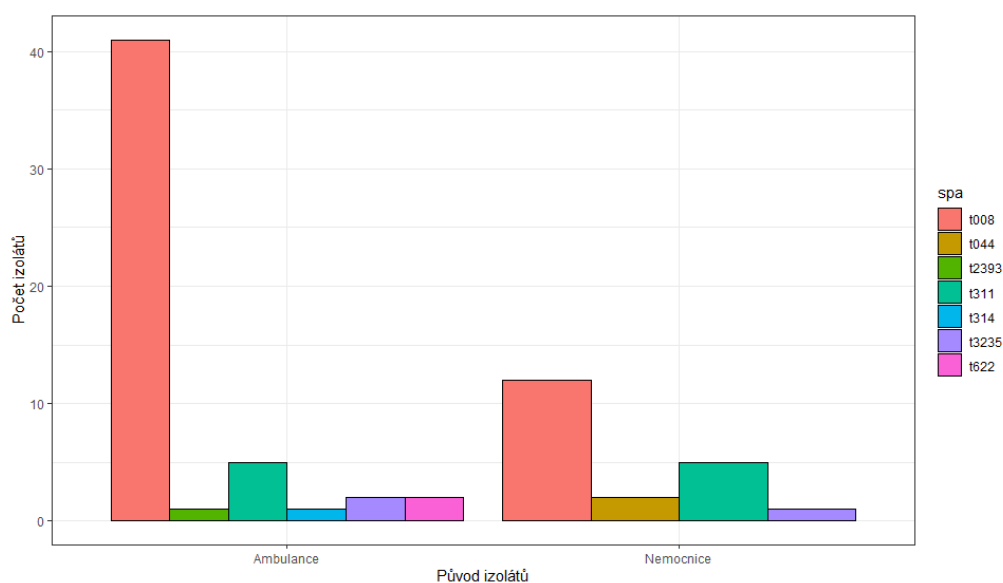
59 z 67 izolátů, které nesly SCCmec IVa, bylo typizováno jako *spa*-typ t008 (88,1 %). Ze 106 izolátů SCCmec II jich bylo 55 typizováno jako t014 (51,89 %) a 42 typizováno jako t003 (39,62 %). Korelace jednotlivých SCCmec a *spa*-typů je zobrazena v Tabulce 20.

Tab. 20. Rozložení SCCmec typů, jejich procentuální zastoupení u izolátů na Slovensku a *spa*-typy, které se vyskytovaly u jednotlivých SCCmec typů.

SCCmec typ	Počet izolátů	Procentuální zastoupení	<i>spa</i> -typ	
I	41	9,93 %	t010, t045, t855, t1683, t2065, t19657, t19662	
II	106	25,67 %	t002, t003, t014, t264, t535, t586, t1282, t19658, t19660	
IV	a	66	15,98 %	t008, t015, t179, t622, t1345, t9710, t12321, t19659
	b	7	1,69 %	t330, t706, t4545
	c	5	1,21 %	t002, t008, t044
	h	75	18,16 %	t020, t022, t025, t032, t910, t1302, t2892, t4232, t6589, t10016, t19753
	nedourčeno	101	24,45 %	t015, t024, t026, t095, t127, t179, t311, t330, t622, t656, t671, t779, t1215, t1265, t1282, t1303, t2393, t3235, t4264, t5163, t11862, t12321, t17565, t19661
V	9	2,18 %	t034, t065, t314, t316, t880, t4652	
Neurčeno	3	0,73 %	t548, t7603, t17768	

5.2.4 Panton-Valentinův leukocidin

Real-time PCR na detekci genu *mecA*, genu *spa* a genu *luksF* pro PVL potvrdila přítomnost PVL toxinu u 73 izolátů (17,68 %). Ve 49,3 % ze zmíněných 73 izolátů se jednalo o izoláty z infekce kůže a měkkých tkání (n = 36). Relativně vysoké procento přítomnosti PVL vysvětluje přítomnost *spa*-typu t008 (n = 54) a *spa*-typu t311 (n = 10) ve studovaném souboru. U obou těchto *spa*-typů se PVL často vyskytuje. Průměrný věk pacientů s PVL byl 27,87 let. Tento věkový průměr se signifikantně liší (p <0,001) od věkového průměru pacientů bez PVL (45,5 let). 71,23 % PVL pozitivních izolátů pocházelo z ambulantního prostředí (viz Graf 3).



Graf 3. Zobrazení původu a rozložení *spa*-typů PVL pozitivních izolátů. Jednotlivé *spa*-typy jsou zobrazeny barevně dle legendy vpravo od grafu. Nejčastějšími zástupci PVL pozitivních izolátů jsou *spa*-typy t008 (n = 54) a t311 (n = 10).

5.2.4 *mecC*

Nejčastější genetickou determinantou rezistence k meticilinu je gen *mecA*. Pomocí multiplexního real-time PCR byly detekovány PVL pozitivní izoláty a zároveň byla potvrzena přítomnost genu *mecA*. U jednoho z 413 izolátů nebyl gen *mecA* prokázán, dodatečným testem se u tohoto izolátu potvrdila přítomnost genu *mecC*. Tento izolát byl *spa*-typu t7603 a rezistentní byl pouze k oxacilinu a cefoxitinu. Vzorek pocházel z ambulantiho stěru z rány.

5.3 Fyziologické vlastnosti dominantních linií MRSA v ČR a na Slovensku

Fyziologické vlastnosti, jako je růstová rychlost, produkce biofilmu nebo virulence (reprezentovaná v této práci produkcí hemolytických exotoxinů) mohou být významné faktory ovlivňující úspěch odlišných linií dané patogenní bakterie. Proto jsme se rozhodli tyto vlastnosti zkoumat u izolátů reprezentující současné dominantní linie MRSA v ČR a na Slovensku a také u izolátů kmenů dominujících v ČR v nedávné minulosti. Byly vybrány takové izoláty, jejichž klonální linie se vyskytují v současné době v České republice a na Slovensku a z přechodných studií provedených v České republice byly vybrány kmeny, jejichž klony se v České republice vyskytovaly/vyskytují nejčastěji a hrály roli v epidemické situaci MRSA v ČR. Izoláty kmenů MRSA vyskytující se v devadesátých letech minulého století a v první dekádě nového tisíciletí byly získány laskavostí doc. Oto Meltera. U izolátů byla provedena podrobná charakterizace. Podrobnosti o typizaci těchto zástupců jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21. Klonální charakterizace testovaných kmenů.

Označení izolátu/kmene	<i>spa</i> -typ	ST	CC
M23	t586	ST225	CC5
M25	t003	ST225	CC5
M30	t034	ST398	CC398
M66	t032	ST22	CC22
M93	t014	ST225	CC5
M117	t011	ST398	CC398
M122	t008	ST8	CC8
M276	t005	ST22	CC22
M870	t008	ST8	CC8
M897	t032	ST22	CC22
M911	t311	ST5	CC5
IC	t051	ST247	CC8
BC	t037	ST239	CC239
CC	t030	ST239	CC239
EMRSA-15	t379	ST22	CC22

5.3.1 Stanovení MIC a PVL

U vybraných kmenů, které jsou shrnuty v Tabulce 21, byla otestována minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou. Testována byla MIC k následujícím antibiotikům: erytromycin, klindamycin, linezolid, chloramfenikol, tetracyklin, ciprofloxacin, sulfametaxazol-trimetoprim, gentamicin, vankomycin a nitrofurantoin. V Tabulce 22 jsou shrnuty hodnoty MIC u antibiotik, ke kterým byl minimálně jeden kmen rezistentní, kromě penicilinu a cefoxitinu. U těchto dvou antibiotik přesahovaly všechny kmeny maximální hodnotu testu, v případě penicilinu ≥ 4 mg/l, u cefoxitinu ≥ 16 mg/l.

Tyto izoláty byly také charakterizovány pomocí real-time PCR na přítomnost genů *mecA*, *spa* a *lukS* (gen pro PVL). Všechny testované izoláty měly pozitivní gen *spa*, který stanovuje druhovou specifikaci *S. aureus* i gen *mecA*. Z těchto testovaných izolátů měly 4 pozitivní výsledek na *lukFS* geny, a to konkrétně M122 (t008), M276 (t005), M870 (t008) a M911 (t311).

Tabulka 22. Hodnoty MIC testovaných kmenů. Rezistentní hodnoty jsou značeny červeně. Pod názvem antibiotika jsou uvedeny hraniční hodnoty rezistence podle EUCAST 2021 pro každé antibiotikum pro *S. aureus*. Vysvětlení zkratk: ERY = erytromycin, CLI = klindamycin, TET = tetracyklin, CIP = ciprofloxacin, GEN = gentamicin

Označení kmene	MIC (mg/l)				
	ERY	CLI	TET	CIP	GEN
	>2	>0,5	>2	>1	>1
M23	≥8	≥4	1	≥8	0,25
M25	≥8	≥4	1	≥8	0,5
M30	≥8	≥4	≥8	0,2	4
M66	0,25	0,06	4	≥8	0,25
M93	≥8	≥4	2	≥8	0,25
M117	1	≥4	≥8	0,5	0,5
M122	≥8	0,06	0,25	≥8	0,5
M276	1	0,12	4	≥8	≥16
M870	≥8	0,25	2	≥8	1
M897	≥8	≥4	4	≥8	0,5
M911	≥8	0,25	2	0,5	0,25
IC	≥8	≥4	2	≥8	≥16
BC	≥8	≥4	≥8	≥8	≥16
CC	≥8	≥4	≥8	≥8	16
EMRSA15	≥8	0,06	0,5	≥8	≤0,12

5.3.2 Růstová rychlost

U vybraných izolátů (viz Tabulka 21) byla testována růstová rychlost v různých podmínkách: v TSB mediu, v TSB mediu s oxacilinem (OXA) o koncentraci 0,001 mg/l a v TSB mediu s azitromycinem (AZI) o koncentraci 0,016 mg/l. Testované subinhibiční koncentrace byly vybrány jako koncentrace daných antibiotik, u kterých nebyla pozorována inhibice růstu *S. aureus* při testování mikrodiluční metodou, s přihlédnutím k distribuci hodnot MIC u izolátů *S. aureus* v databázi Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST; dostupné z <https://mic.eucast.org/>).

Všechny izoláty byly kultivovány v triplicátu. Růstová rychlost byla měřena každou hodinu po dobu 8 hodin a poslední měření bylo provedeno po 24 h od zaočkování kultury. Z naměřených hodnot byla vypočítána doba zdvojení, z těchto hodnot byla vypočítána průměrná doba zdvojení u jednotlivých kmenů, shrnutí dob zdvojení je v Tabulce 23.

Tab. 23. Přehled průměrných dob zdvojení u jednotlivých kmenů MRSA.

U každého kmene byl od průměrné doby zdvojení vypočítán rozdíl mezi dobami zdvojení. Pomocí Kruskal-Wallisova testu byla vypočítána statistická významnost rozdílu dob zdvojení. Červeně zvýrazněné rozdíly jsou statisticky signifikantní na hladině významnosti 0,05. Výpočet byl proveden z dob zdvojení každého triplikátu.

Izolát	Průměrná doba zdvojení (čas)			Rozdíl od kultivace bez ATB	
	Bez ATB	0,01 mg/l OXA	0,016 mg/l AZI	0,01 mg/l OXA	0,016 mg/l AZI
M23	34 min 23 s ± 15 s	31 min 42 s ± 43 s	32 min 49 s ± 13 s	-2 min 41 s	-1 min 34 s
M25	33 min 1 s ± 10 s	32 min 58 s ± 11 s	34 min 20 s ± 46 s	-3 s	1 min 19 s
M30	34 min 42 s ± 15 s	34 min 19 s ± 7 s	35 min 45 s ± 23 s	-23 s	1 min 3 s
M66	34 min 28 s ± 26 s	35 min 5 s ± 19 s	34 min 6 s ± 29 s	37 s	-22 s
M93	33 min 19 s ± 15 s	32 min 9 s ± 46 s	36 min 22 s ± 14 s	-1 min 10 s	3 min 3 s
M117	36 min 40 s ± 29 s	33 min 23 s ± 1 min 5 s	36 min 1 s ± 1 min	-3 min 17 s	-39 s
M122	36 min 2 s ± 36 s	33 min 26 s ± 29 s	35 min 22 s ± 6 s	-2 min 36 s	-40 s
M276	32 min 8 s ± 24 s	33 min 30 s ± 26 s	34 min 25 s ± 44 s	1 min 22 s	2 min 17 s
M870	29 min 41 s ± 31 s	31 min 44 s ± 23 s	31 min 43 s ± 32 s	2 min 3 s	2 min 2 s
M897	34 min 25 s ± 54 s	30 min 40 s ± 45 s	32 min ± 13 s	-3 min 45 s	-2 min 25 s
M911	33 min 6 s ± 1 min 15 s	35 min 32 s ± 38 s	35 min 33 s ± 35 s	2 min 26 s	2 min 27 s
IC	32 min 14 s ± 18 s	31 min 7 s ± 8 s	29 min 26 s ± 9 s	-1 min 7 s	-2 min 48 s
BC	37 min 48 s ± 51 s	32 min 40 s ± 22 s	30 min 15 s ± 8 s	-5 min 8 s	-7 min 33 s
CC	32 min 13 s ± 42 s	32 min 39 s ± 42 s	29 min 41 s ± 16 s	26 s	-2 min 32 s

EMRSA15	33 min 37 s ± 21 s	31 min 7 s ± 1 min 6 s	29 min 21 s ± 14 s	-2 min 30 s	-4 min 16 s
---------	-----------------------	---------------------------	-----------------------	-------------	-------------

V médiu bez přidaných antibiotik měl při vzájemném porovnání testovaných kmenů nejrychlejší průměrnou dobu zdvojení kmen komunitní MRSA M870 (t008, USA300) s časem 29 min a 41 s. Naopak nejpomalejším byl za těchto podmínek kmen nemocniční MRSA BC (ST239) s průměrným časem 37 min 48 s. V médiu s přidaným oxacilinem o výsledné koncentraci 0,01 mg/l byla nejrychlejší doba zdvojení pozorována u kmene nemocniční MRSA M897 (t032) s časem 30 min 40 s a nejpomalejší u kmene z komunitní linie MRSA M911 (t311) s časem 35 min 32 s. Kmen EMRSA15 (CC22) představující nemocniční MRSA vyskytující se na začátku tisíciletí měl nejrychlejší průměrnou dobu zdvojení v médiu s přidaným azitromycinem o výsledné koncentraci 0,016 mg/l, v těchto podmínkách rostl nejpomaleji kmen nemocniční MRSA M93 (t014) s časem 36 min 22 s. Nejvyšší rozdíl v průměrných dobách zdvojení vykazoval Brazílský klon (ST239), a to konkrétně 5 min 8 s mezi médii bez antibiotik a s přidaným oxacilinem a 7 min 33 s mezi médii bez antibiotik a s přidaným azitromycinem, přidání antibiotik paradoxně vedlo ke zkrácení doby zdvojení. Kmeny M25, M66, M117, M870, M911 a CC nevykazovaly signifikantní rozdíly hodnot doby zdvojení, a proto nebyly zahrnuty do dalších výpočtů srovnávacích podmínek jednotlivých kmenů.

Kmeny M23, M117, M122, M897, IC, BC a EMRSA15 vykazovaly paradoxně kratší dobu zdvojení po přidání antibiotika než při růstu v samotném médiu. Kmen M177 je *spa*-typ t011 a patří do klonálního komplexu CC398, ve kterém se vyskytuje také LA-MRSA, kmen M122 je *spa*-typ t008 (CC8) a vyskytuje se převážně v komunitě. Ostatní kmeny, u kterých byla pozorována kratší doba zdvojení patří mezi HA-MRSA (M23 – t586, M897 – t032, IC – ST247, BC – ST239, EMRSA15 – CC22).

Srovnání průměrných růstových rychlostí mezi všemi kmeny ukazovalo signifikantní odlišnost mezi kmeny jak v růstu bez antibiotik, tak při jejich přidání (viz Tabulka 24).

Tab. 24. Srovnání růstových rychlostí všech kmenů při růstu bez antibiotik, v přítomnosti oxacillinu nebo azitromycinu (TSB/OXA/AZI). Pomocí Kruskal-Wallisova testu byla vypočítána statistická významnost rozdílů dob zdvojení. Červeně zvýrazněné rozdíly jsou statisticky signifikantní na hladině významnosti 0,05. Kmeny jsou seřazeny v následujícím pořadí: M23, M25, M30, M66, M93, M117, M122, M276, M870, M897, M911, IC, BC, CC, EMRSA15.

Prostředí	Doba zdvojení (čas)	p-hodnota
TSB bez přidání antibiotik	34 min 23 s / 33 min 1 s / 34 min 42 s / 34 min 28 s / 33 min 19 s / 36 min 40 s / 36 min 2 s / 32 min 8 s / 29 min 41 s / 34 min 25 s / 33 min 6 s / 32 min 14 s / 37 min 48 s / 32 min 13 s / 33 min 37 s	<0,001
TSB s 0,01 mg/l OXA	31 min 42 s / 32 min 58 s / 34 min 19 s / 35 min 5 s / 32 min 9 s / 33 min 23 s / 33 min 26 s / 33 min 30 s / 31 min 44 s / 30 min 40 s / 35 min 32 s / 31 min 7 s / 32 min 40 s / 32 min 39 s / 31 min 7 s	<0,001
TSB s 0,016 mg/l AZI	32 min 49 s / 34 min 20 s / 35 min 45 s / 34 min 6 s / 36 min 22 s / 36 min 1 s / 35 min 22 s / 34 min 25 s / 31 min 43 s / 32 min / 35 min 33 s / 29 min 26 s / 30 min 15 s / 29 min 41 s / 29 min 21 s	<0,001

Kmeny, které shrnuje Tabulka 21, byly podrobeny dalšímu Kruskal-Wallis testu pro srovnání dob zdvojení v různých růstových podmínkách, a to konkrétně porovnání dob zdvojení v růstu v médiu bez přidaných antibiotik a v médiu s koncentrací oxacillinu 0,01 mg/l. V tomto případě se doba zdvojení signifikantně lišila u kmene M23 ($p = 0,011$), M122 ($p = 0,007$), M897 ($p = 0,007$). V případě srovnání dob zdvojení mezi růstem v médiu bez antibiotik a v médiu s koncentrací azitromycinu 0,016 mg/l byl pozorován signifikantní rozdíl v dobách zdvojení u kmenů IC ($p = 0,007$), BC ($p = 0,007$) a EMRSA15 ($p = 0,007$). Porovnávány byly také rozdíly v dobách zdvojení mezi médii s koncentrací 0,01 mg/l oxacillinu a médii s koncentrací 0,016 mg/l azitromycinu. Signifikantní rozdíl byl pozorován u kmenů M30 ($p = 0,007$), M93 ($p = 0,011$) a M276 ($p = 0,011$).

Tab. 25. Pomocí Kruskal-Wallisova testu byla vypočítána statistická významnost rozdílů dob zdvojení u jednotlivých kmenů. Červeně zvýrazněné rozdíly jsou statisticky signifikantní na hladině významnosti 0,05.

Izolát a doba zdvojení		M23	M122	M897	IC	BC	EMRSA15
Srovnávací podmínky	TSB vs TSB + OXA	0,011	0,007	0,007	0,180	0,180	0,180
	TSB vs TSB + AZI	0,136	0,180	0,180	0,007	0,007	0,007

Růstové rychlosti testovaných kmenů byly vzájemně porovnány, v podmínkách růstu bez antibiotik (Tabulka 26), v přítomnosti oxacillinu 0,01 mg/l (Tabulka 27) a v přítomnosti

azitromycinu 0,016 mg/l (Tabulka 28). V případě samotného média bez přidaných antibiotik kmen EMRSA15 (průměrná doba zdvojení 33 min 37 s) jako jediný nerostl signifikantně odlišně vůči žádnému kmenu. Přidání antibiotik způsobilo signifikantně rychlejší růst (kratší dobu zdvojení) EMRSA15 vůči kmenům: M30 (t034; OXA p = 0,010; AZI p = 0,002), M66 (t032; OXA p = 0,003; AZI p = 0,047), M276 (t005; OXA p = 0,047; AZI p = 0,025) a M911 (OXA p = 0,002, AZI p = 0,003). Ve všech těchto případech rostl kmen EMRSA15 signifikantně rychleji.

Kmen M870 (t008) vykazoval signifikantně kratší dobu zdvojení v porovnání s kmenem M30 (t034) ve všech třech testovaných podmínkách (TSB p = 0,006; OXA = 0,023; AZI = 0,047). Vůči kmenům M66 (t032) a M117 (t011) měl kmen M870 signifikantně kratší dobu zdvojení ve dvou podmínkách. U kmene M66 se jednalo o médium bez antibiotik (p = 0,010) a s přidaným oxacilinem (p = 0,008), u kmene M117 se jednalo o médium bez antibiotik (p <0,001) a o médium s přidaným azitromycinem (p = 0,030).

Při porovnání kmenů M93 (t014) a BC (ST239) se ukázalo, že v podmínkách bez antibiotik má M93 signifikantně kratší dobu zdvojení (p = 0,030), ale po přidání azitromycinu o koncentraci 0,016 mg/l má signifikantně kratší dobu zdvojení BC. Kmen BC vykazuje takovéto chování i při porovnání s kmenem M911 (t311), kdy v médiu bez antibiotik má dobu zdvojení signifikantně kratší než BC (p = 0,013), ale v případě přidání oxacilinu o koncentraci 0,01 mg/l (p = 0,047) nebo přidání azitromycinu o koncentraci 0,016 mg/l (p = 0,020) má signifikantně kratší dobu zdvojení BC.

Kmen IC (ST247) vykazoval signifikantně kratší dobu zdvojení ve všech třech testovaných podmínkách v porovnání s kmeny: M30 (t034; TSB p = 0,0037; OXA p = 0,005; AZI p = 0,003), M117 (t011; TSB p = 0,003; OXA p = 0,040; AZI p = 0,001) a M122 (t008; TSB p = 0,007; OXA p = 0,030; AZI p = 0,007). Dále kmen M276 (t005; OXA p = 0,025; AZI p = 0,027) a kmen M911 (t311; OXA p <0,001; AZI p = 0,003) měli signifikantně delší dobu zdvojení vůči IC ve dvou podmínkách, konkrétně v přítomnosti oxacilinu a azitromycinu.

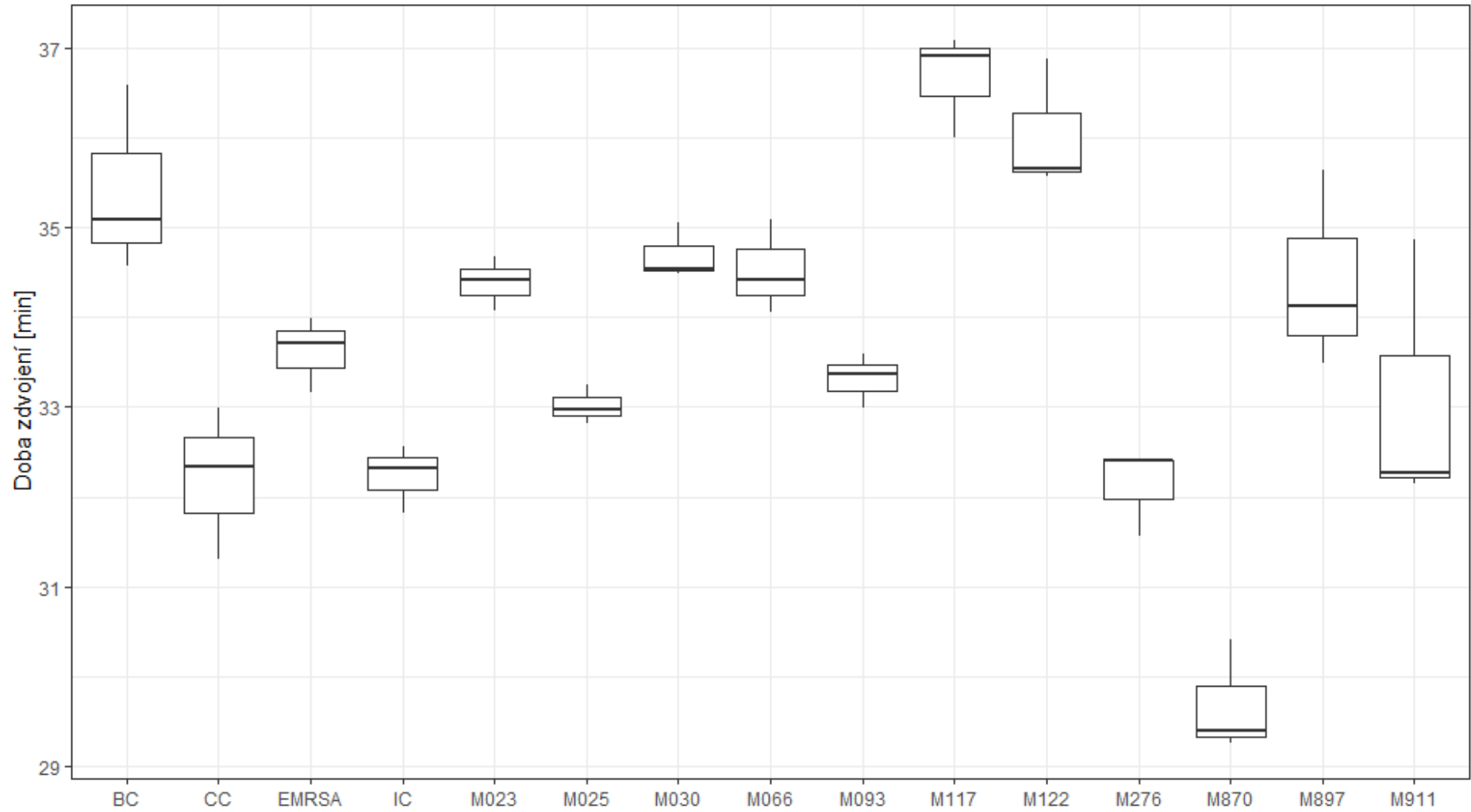
Kmeny M30 (t034), M117 (t011) a M122 (t008) měli signifikantně delší dobu zdvojení ve dvou podmínkách při porovnání s dobou zdvojení kmene CC. Jednalo se o podmínky v médiu bez přidaných antibiotik a v médiu s přidaným azitromycinem na finální koncentraci 0,016 mg/l (M30: TSB p = 0,047; AZI p = 0,005; M117: TSB p = 0,003; AZI p = 0,003; M122: TSB p = 0,009; AZI p = 0,013).

Shrnutí výsledků Kruskal-Wallisových testů dob zdvojení mezi izoláty v různých podmínkách je uvedeno v Tabulkách 26-28.

Tab. 26. Výsledky Kruskal-Willisova testu u doby zdvojení mezi izoláty v TSB mediu bez přidání antibiotik.

Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně. p-hodnoty byly vypočteny z jednotlivých časů

TSB	M23 (34 min 23 s)														
M25	0,238	M25 (33 min 1 s)													
M30	0,780	0,144	M30 (34 min 42 s)												
M66	0,926	0,203	0,852	M66 (34 min 28 s)											
M93	0,384	0,756	0,250	0,335	M93 (33 min 19 s)										
M117	0,225	0,017	0,351	0,263	0,037	M117 (36 min 40 s)									
M122	0,367	0,037	0,534	0,419	0,076	0,756	M122 (36 min 2 s)								
M276	0,071	0,534	0,037	0,058	0,351	0,003	0,007	M276 (32 min 8 s)							
M870	0,013	0,192	0,006	0,010	0,106	<0,001	<0,001	0,494	M870 (29 min 41 s)						
M897	0,975	0,250	0,756	0,901	0,401	0,214	0,351	0,076	0,014	M897 (34 min 25 s)					
M911	0,238	1,000	0,144	0,203	0,756	0,017	0,037	0,534	0,192	0,250	M911 (33 min 6 s)				
IC	0,071	0,534	0,037	0,058	0,351	0,003	0,007	1,000	0,494	0,076	0,534	IC (32 min 14 s)			
BC	0,192	0,013	0,305	0,225	0,030	0,926	0,686	0,002	<0,001	0,181	0,013	0,002	BC (37 min 48 s)		
CC	0,087	0,597	0,047	0,071	0,401	0,003	0,009	0,926	0,437	0,093	0,597	0,926	0,003	CC (32 min 13 s)	
EMRSA15	0,514	0,597	0,351	0,456	0,828	0,062	0,120	0,250	0,067	0,534	0,597	0,250	0,050	0,291	EMRSA15
	34 min 23 s	33 min 1 s	34 min 42 s	34 min 28 s	33 min 19 s	36 min 40 s	36 min 2 s	32 min 8 s	29 min 41 s	34 min 25 s	33 min 6 s	32 min 14 s	37 min 48 s	32 min 13 s	33 min 37 s

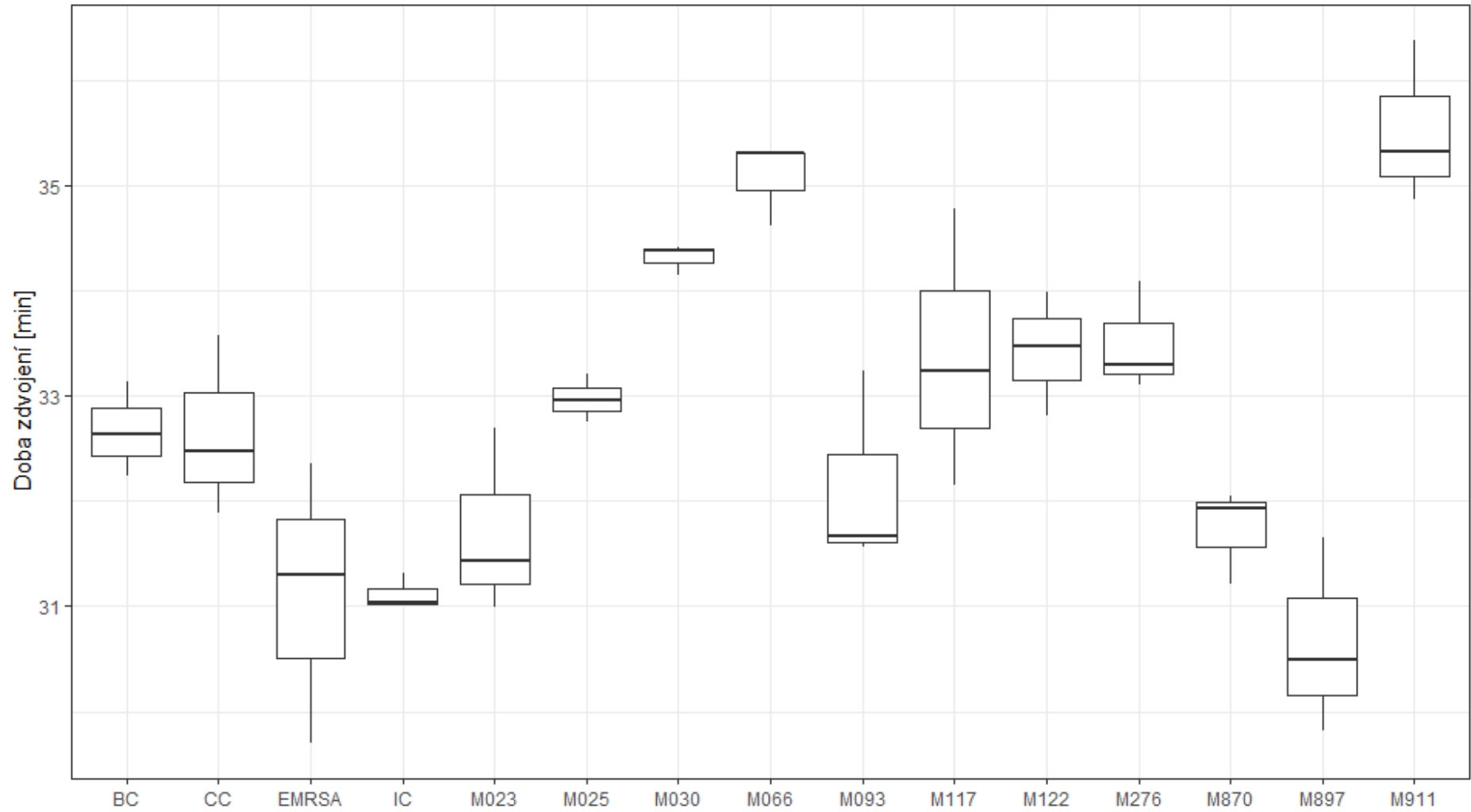


Graf 4. Časy zdvojení u jednotlivých kmenů v mediu bez přidaných antibiotik. Nejrychleji rostoucí kmen byl za těchto podmínek M870 s průměrnou dobou zdvojení 29 min 41 s.

Tab. 27. Výsledky Kruskal-Willisova testu u doby zdvojení mezi izoláty v TSB mediu s oxacilinem o koncentraci 0,01 mg/l.

Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně. p-hodnoty byly vypočteny z jednotlivých časů.

0,01 mg/l OXA	M23 (31 min 42 s)														
M25	0,456	M25 (32 min 58 s)													
M30	0,120	0,419	M30 (34 min 19 s)												
M66	0,619	0,804	0,291	M66 (35 min 5 s)											
M93	0,040	0,192	0,619	0,120	M93 (32 min 9 s)										
M117	0,082	0,320	0,852	0,214	0,756	M117 (33 min 23 s)									
M122	0,214	0,619	0,756	0,456	0,419	0,619	M122 (33 min 26 s)								
M276	0,456	1,000	0,419	0,804	0,192	0,320	0,619	M276 (33 min 30 s)							
M870	0,663	0,238	0,047	0,351	0,013	0,030	0,093	0,238	M870 (31 min 44 s)						
M897	0,686	0,250	0,050	0,367	0,014	0,032	0,099	0,250	0,975	M897 (30 min 40 s)					
M911	0,136	0,456	0,950	0,320	0,576	0,804	0,804	0,456	0,054	0,058	M911 (35 min 32 s)				
IC	0,144	0,027	0,003	0,050	<0,001	0,001	0,007	0,027	0,305	0,291	0,003	IC (31 min 7 s)			
BC	0,401	0,113	0,017	0,181	0,004	0,010	0,037	0,113	0,686	0,663	0,020	0,534	BC (32 min 40 s)		
CC	0,214	0,047	0,005	0,181	<0,001	0,003	0,013	0,047	0,419	0,401	0,006	0,828	0,686	CC (32 min 39 s)	
EMRSA15	0,136	0,025	0,002	0,047	<0,001	0,001	0,006	0,025	0,291	0,277	0,003	0,975	0,514	0,804	EMRSA
	31 min 42 s	32 min 58 s	34 min 19 s	35 min 5 s	32 min 9 s	33 min 23 s	33 min 26 s	33 min 30 s	31 min 44 s	30 min 40 s	35 min 32 s	31 min 7 s	32 min 40 s	32 min 39 s	15 31 min 7 s

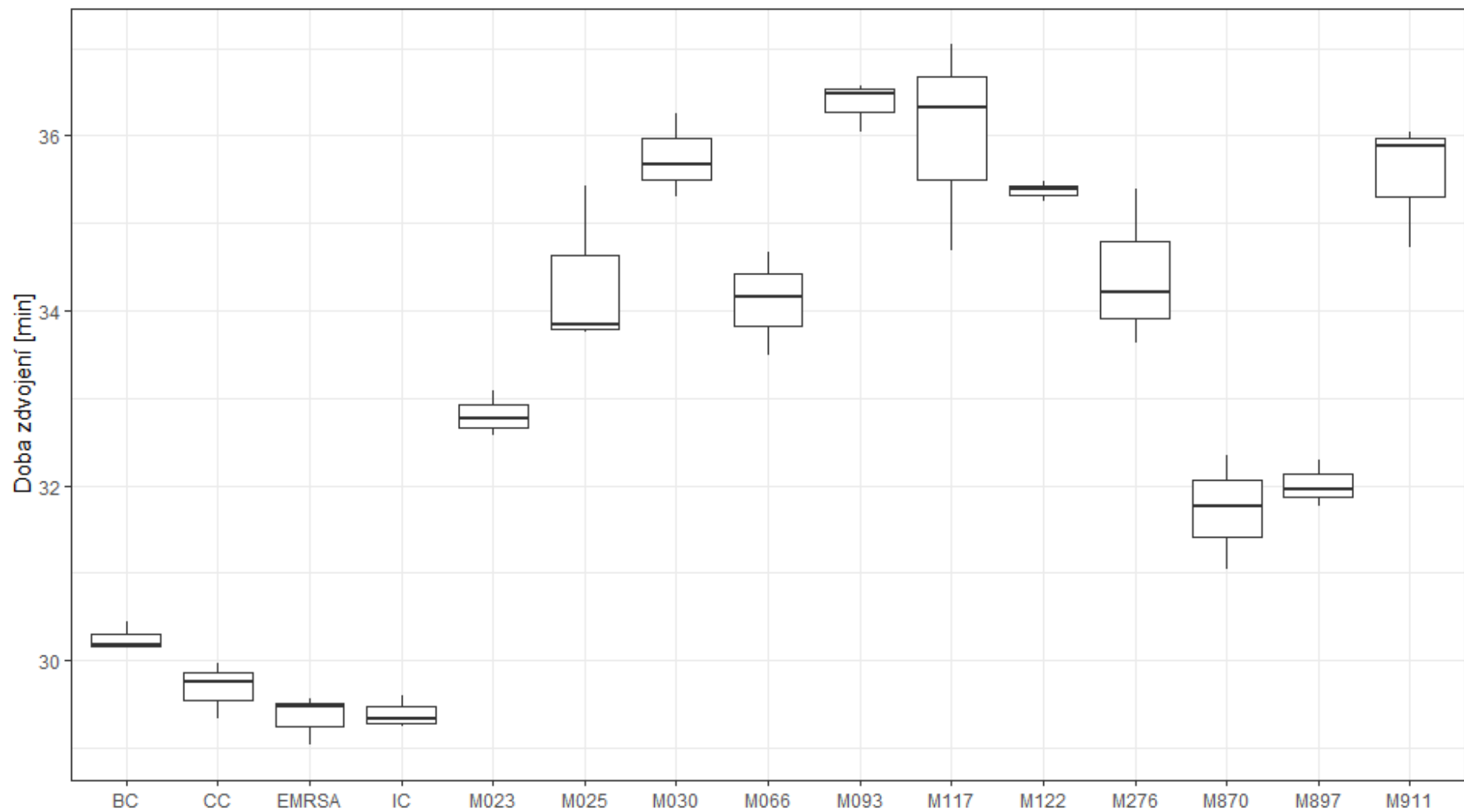


Graf 5. Časy zdvojení u jednotlivých kmenů v mediu s oxacilinem o koncentraci 0,01 mg/l.
 Za těchto podmínek byl nejrychleji rostoucí kmen M897 s průměrnou dobou zdvojení 30 min 40 s.

Tab. 28. Výsledky Kruskal-Willisova testu u doby zdvojení mezi izoláty v TSB mediu s azitromycinem o koncentraci 0,016 mg/l.

Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně. p-hodnoty byly vypočteny z jednotlivých časů.

0,016 mg/l AZI	M23 (32 min 49 s)														
M25	0,456	M25 (34 min 20 s)													
M30	0,120	0,419	M30 (35 min 45 s)												
M66	0,619	0,804	0,291	M66 (34 min 6 s)											
M93	0,040	0,192	0,619	0,120	M93 (36 min 22 s)										
M117	0,082	0,320	0,852	0,214	0,756	M117 (36 min 1 s)									
M122	0,214	0,619	0,756	0,456	0,419	0,619	M122 (35 min 22 s)								
M276	0,456	1,000	0,419	0,804	0,192	0,320	0,619	M276 (34 min 25 s)							
M870	0,663	0,238	0,047	0,351	0,013	0,030	0,093	0,238	M870 (31 min 43 s)						
M897	0,686	0,250	0,050	0,367	0,014	0,032	0,099	0,250	0,975	M897 (32 min)					
M911	0,136	0,456	0,950	0,320	0,576	0,804	0,804	0,456	0,054	0,058	M911 (35 min 33 s)				
IC	0,144	0,027	0,003	0,050	<0,001	0,001	0,007	0,027	0,305	0,291	0,003	IC (29 min 26 s)			
BC	0,401	0,113	0,017	0,181	0,004	0,010	0,037	0,113	0,686	0,663	0,020	0,534	BC (30 min 15 s)		
CC	0,214	0,047	0,005	0,181	<0,001	0,003	0,013	0,047	0,419	0,401	0,006	0,828	0,686	CC (29 min 41 s)	
EMRSA15	0,136	0,025	0,002	0,047	<0,001	0,001	0,006	0,025	0,291	0,277	0,003	0,975	0,514	0,804	EMRSA15
	32 min 49 s	34 min 20 s	35 min 45 s	34 min 6 s	36 min 22 s	36 min 1 s	35 min 22 s	34 min 25 s	31 min 43 s	32 min	35 min 33 s	29 min 26 s	30 min 15 s	29 min 41 s	29 min 21 s

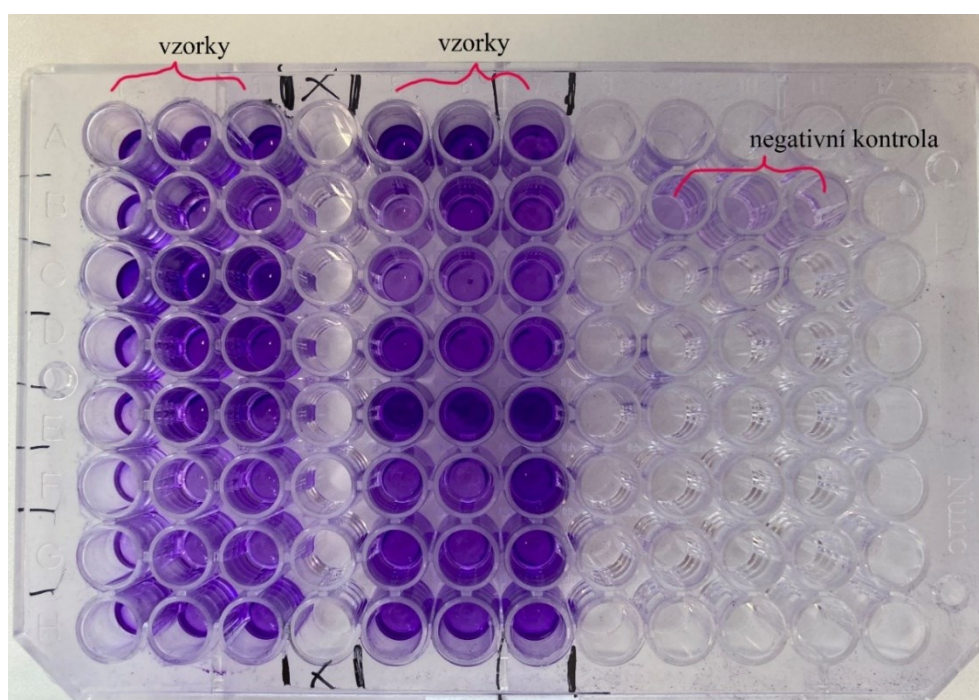


Graf 6. Časy zdvojení u jednotlivých kmenů v mediu s azitromycinem o koncentraci 0,016 mg/l.

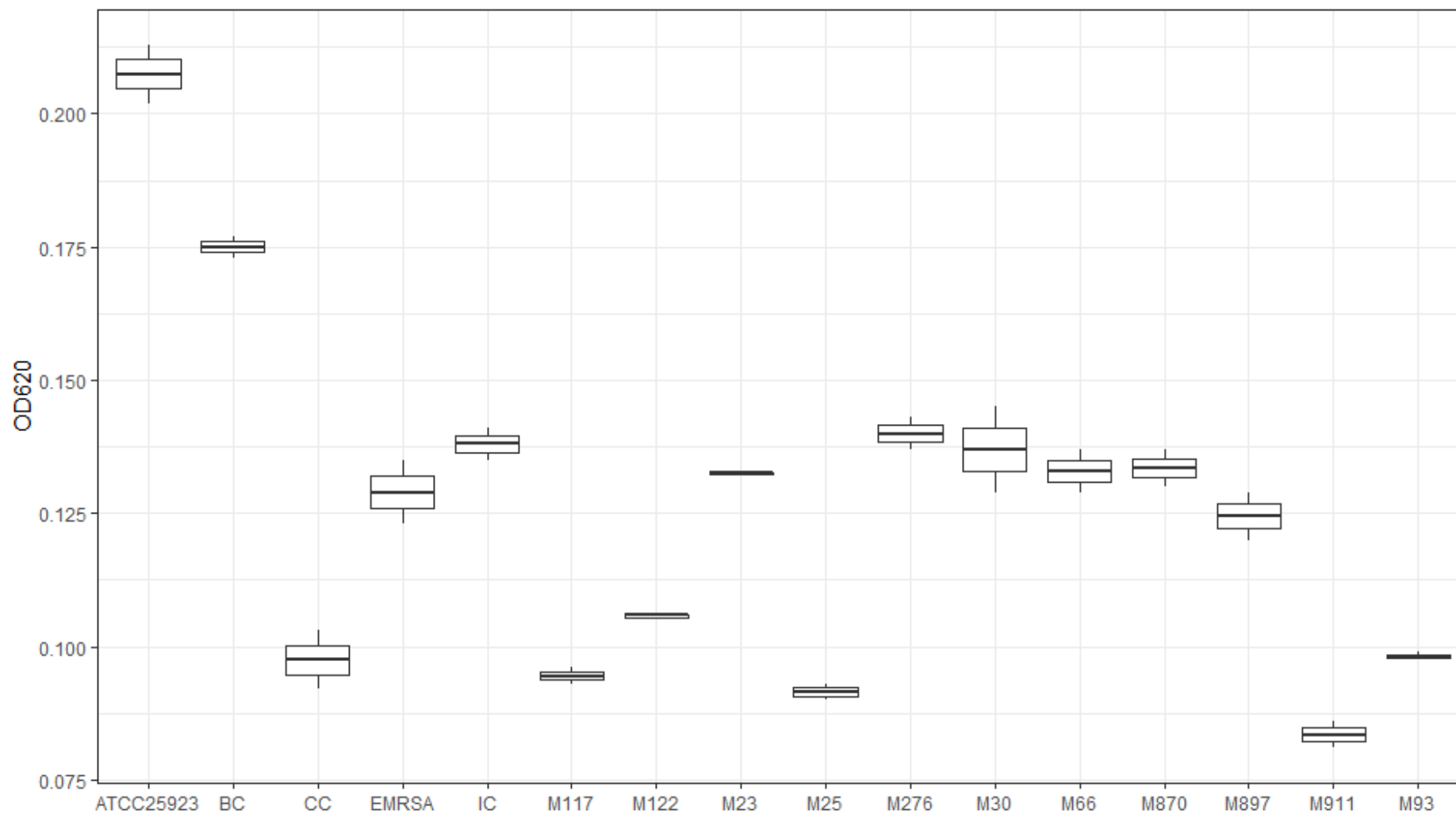
Za těchto podmínek byly nejrychleji rostoucí kmeny EMRSA-15 HN 729 a Iberijský klon 21 pl s průměrnými dobami zdvojení 29 min 21 s a 29 min 26 s.

5.3.2 Tvorba biofilmu

U vybraných kmenů (viz Kapitola 3.1.1) byla stanovena tvorba biofilmu pomocí modifikované Christensenovy metody (provedení na Obrázku 11). Jako referenční byl použit kmen ATCC 25923, u kterého je známa silná produkce biofilmu, po změření výsledných hodnot na spektrofotometru vykazoval tento kmen dle očekávání nejvyšší hodnoty OD. Z testovaných kmenů byly nejvyšší hodnoty naměřeny u kmene Brazílského klonu (BC). Nejnižší hodnoty byly naopak naměřeny u kmenů M25, M117, M911 a CC. Na Grafu 7 jsou zobrazeny boxploty znázorňující hodnoty OD naměřenými při délce 620 nm pro jednotlivé kmeny testované v triplikátech.



Obr. 11. Testování biofilmu, vzorky po obarvení 0,1% krystalovou violetí a opůsobení směsí etanol:aceton v poměru 80:20. Na tomto obrázku byly testovány tyto kmeny: levý sloupec shora dolů: M23, M25, M30, M66, M93, M117, M122 a M276, pravý sloupec shora dolů: M870, M897, M911, IC, BC, CC, EMRSA15 a referenční kmen ATCC 25923. Všechny tyto kmeny byly dělány v triplikátu. Lze vidět různé odstíny fialové v důsledku rozdílné tvorby biofilmu. Čím tmavší fialová, tím vyšší produkce biofilmu. Jako negativní kontrola bylo použito čisté TSB medium s 1% glukózou.

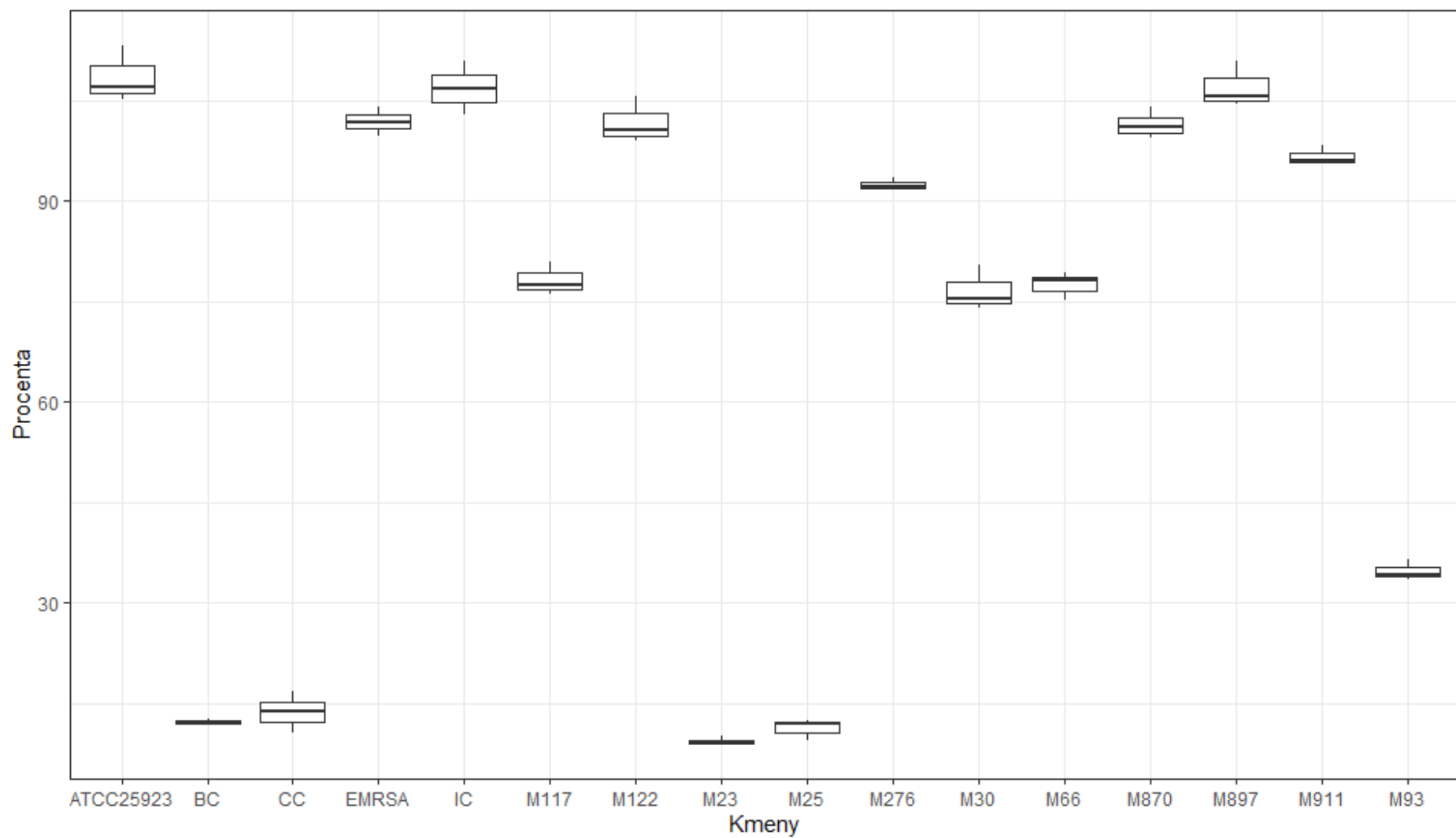


Graf 7. Zobrazení jednotlivých kmenů při OD₆₂₀ při stanovení tvorby biofilmu. Kmen ATCC 25923 byl použit jako referenční kmen tvořící biofilmu. Kmeny M25, M93, M117, M122, M911 a CC byly vyhodnoceny jako kmeny netvořící biofilm.

5.3.3 Hemolytická aktivita

V rámci testování fyziologických vlastností vybraných kmenů byla testována i hemolytická aktivita, a to podle modifikované metody vycházející z postupu Tsenga a Majerczyka.

Kmeny BC i CC, které mají stejný ST typ vykazovaly nízkou hemolytickou aktivitu. Stejně tak tomu bylo i u ST225 (CC5), kdy kmeny M23, M25 a M93 ukazovaly stejně vysokou až mírně vyšší hemolytickou aktivitu jako ST 247 (kmen BC a CC). U ostatních kmenů byla naměřena vysoká hemolytické aktivita.



Graf 8. Znáznornění procentuálního zastoupení tvorby hemolýzy u testovaných kmenů. Kmeny BC, CC, M23 a M25 byly vyhodnoceny jako kmeny bez hemolytické aktivity.

6. Diskuze

6.1 MRSA Fakultní nemocnice v Motole 2018–2020

Prvním cílem této diplomové práce bylo analyzovat izoláty MRSA, které byly nasbírány v období let 2018–2020 ve FN Motol. Tyto izoláty pocházely od pacientů ambulancí, oddělení urgentního příjmu, standardních oddělení a jednotek intenzivní péče FN Motol.

Klonální analýza prokázala dominanci klonálního komplexu 5 ($n = 241$) mezi izoláty MRSA z FN Motol, proporce CC5 byla ale nižší oproti studiím epidemiologie MRSA v ČR z minulých let (69,45 % vs 81,41 % a 91,7 %) (Pomorska *et al.* 2021; Tkadlec *et al.* 2021).

Ze všech *spa*-typů byl nejvíce zastoupen *spa*-typ t586 s 125 izoláty. Všechny izoláty t586 byly rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a ofloxacinu, 4 izoláty byly navíc rezistentní ke gentamicinu a 1 k sulfametaxazol-trimetoprimu. Většina izolátů t586 ($n = 93$) pocházela ze standardních oddělení nebo z jednotek intenzivní péče. Kromě studie od Tkadlec a *et al.*, kde byl zachycen zvýšený výskyt *spa*-typu t586 a Pomorské a *et al.*, která analyzovala izoláty MRSA z hemokultur a *spa*-typ t586 byl zastoupen u 129 izolátů z 618 izolátů, se t586 v Evropě vyskytuje velmi ojediněle. Studie z ostatních evropských zemí nachází tento *spa*-typ pouze u jednotlivých vzorků, ať už se jedná o izoláty od pacientů (Blumental *et al.* 2013; Fenner *et al.* 2008) nebo ze vzorků odpadních vod (Börjesson *et al.* 2010). Další hojně zastoupený *spa*-typ, který se také řadí do CC5 byl t014 ($n = 45$). Kromě jednoho izolátu, který byl rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a tetracyklinu, byly všechny izoláty patřící k tomuto *spa*-typu rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a ofloxacinu. Oproti t586, u kterého byly ke gentamicinu rezistentní pouze 4 izoláty (3,2 %), bylo u t014 ke gentamicinu rezistentních 18 izolátů (40 %).

Třetím nejčastějším *spa*-typem byl t003, všechny izoláty t003 byly stejně jako t014 a t586 rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a ofloxacinu, ale žádný z těchto izolátů nebyl rezistentní ke gentamicinu. *spa*-typ t003 je významným zástupcem CC5, který dominuje ve střední Evropě (Chmielarczyk *et al.* 2017; Grundmann *et al.* 2014; Zarfel *et al.* 2016), ale tato práce a další recentní studie naznačují, že v Praze a středních Čechách ho začíná postupně nahrazovat t586 (Pomorska *et al.* 2021; Tkadlec *et al.* 2021).

U izolátů HA-MRSA se vyskytují hlavně SCC*mec*I-III (Ma *et al.* 2002). *spa*-typy t003, t014 a t586 ve většině případů nesou SCC*mec*II, což vysvětluje vysoký podíl SCC*mec*II (68,01 %) u izolátů z FN Motol. Nebyl zachycen žádný izolát, který by nesl SCC*mec*I nebo SCC*mec*III. Tyto dva typy SCC*mec* kazety se v České republice vyskytovaly hlavně v 90. letech a na začátku 21. století, hlavními zástupci byl Iberijský klon (ST247-I), Brazílský klon

(ST239-IIIa) a Český klon (ST239-III) (Melter *et al.* 1999; 2003), postupně ale z České republiky vymizely a byly nahrazeny jinými úspěšnějšími klony, což vysvětluje postupné vymizení SCCmecI a III.

Nejčastější CA-MRSA byl CC59 (n = 22) reprezentovaný hlavně *spa*-typem t437 (n = 17). Většina izolátů CC59 byla pozitivní na PVL. Dva izoláty t437 nesly SCCmecV, který odpovídá Taiwanskému klonu (Monecke *et al.* 2011), další 2 izoláty nesly SCCmecIV, a to konkrétně podtyp SCCmecIVa a SCCmecIVd. Zbytek izolátů t437 nesl SCCmecV. Kromě tří izolátů, z nichž 2 byly rezistentní pouze k oxacilinu a cefoxitinu, třetí z nich byl rezistentní i k tetracyklinu, byly všechny izoláty CC59 rezistentní k erytromycinu a klindamycinu. 14 izolátů, včetně již zmíněného, bylo rezistentní mimo jiné i k tetracyklinu. Rezistence k erytromycinu a klindamycinu byla detekována u většiny izolátů t437 zachycených v desetiletém evropském sběru (Glasner *et al.* 2015). Klonální komplex 59 je dominantní CA-MRSA v Číně (Chen *et al.* 2021), ale záchyty byly reportovány i v Evropě (Glasner *et al.* 2015). Tkadlec *et al.* zachytili 10 izolátů spadajících do CC59 a Pomorská *et al.* zachytili 6 izolátů t437, což by naznačovalo vzrůstající tendenci výskytu t437, na takto malém vzorku se to ale nedá stanovit.

Druhým klonálním komplexem, jehož izoláty se řadí mezi CA-MRSA byl CC8 s 16 izoláty. Tento klonální komplex byl reprezentován hlavně *spa*-typem t008 (ST8-IV). Epidemiologicky významný klon spadající do CC8 je USA300 (t008-ST8-IVa), který se postupně rozšířil v Severní a Jižní Americe, v Evropě jsou ale reportovány pouze raritní záchyty (Brauner *et al.* 2013; Kaïret *et al.* 2017). Tento klon se vyznačuje přítomností PVL a v severoamerické variantě je nositelem ACME (arginine catabolic mobile element), mobilního genetického elementu kódujícího katabolismus argininu a zlepšující přežívání stafylokoků na povrchu kůže. Z 12 izolátů t008 jich 7 neslo zároveň ACME, PVL i SCCmecIVa, charakteristiky odpovídající epidemickému kmenu USA300. 1 izolát t008 nebyl PVL pozitivní, další tři izoláty nesly SCCmecIVc a u posledního nebyl detekován ACME. Antibiotický profil byl u t008 rozmanitý. Pouze k oxacilinu a cefoxitinu byly rezistentní 2 izoláty, rezistence k erytromycinu se prokázala u 8 izolátů, ale ke klindamycinu byly rezistentní pouze 4 izoláty. Rezistence k ofloxacinu byla detekována u 7 izolátů a 2 izoláty byly rezistentní ke gentamicinu. Pomorská *et al.* nezachytili žádný izolát USA300 a Tkadlec *et al.* detekovali 6 izolátů USA300 (Pomorska *et al.* 2021; Tkadlec *et al.* 2021).

Ve FN Motol bylo za tři roky také zachyceno 12 izolátů linie CC398, livestock-associated (LA) MRSA, z toho bylo 9 izolátů *spa*-typu t034 a u 6 z nich byl přítomen PVL. Izoláty MRSA z tohoto klonálního komplexu jsou spojovány s osobami v kontaktu s hospodářskými zvířaty,

hlavně s prasaty (Santos *et al.* 2020; Sieber *et al.* 2018). Všechny izoláty patřící do CC398 zachycené ve FN Motol nesly SCCmec V a byly rezistentní k tetracyklinu. Rezistence k tetracyklinu je u MRSA CC398 jednou z vlastností, kterou získaly u hospodářských zvířat a tato rezistence je brána jako marker pro detekci LA-CC398-MRSA (Ceballos *et al.* 2019; Price *et al.* 2012). Mimo rezistenci k oxacilinu, cefoxitinu a tetracyklinu byly všechny tyto izoláty rezistentní ke klindamycinu, 9 z těchto izolátů bylo rezistentní ještě k erytromycinu a 2 k ofloxacinu.

Průměrný věk pacientů s MRSA byl 43,06 let, na rozdíl od studie Tkadlec *et al.*, kde byl průměrný věk pacienta s MRSA 67,06 let (Tkadlec *et al.* 2021). Tak velký rozdíl vysvětluje vysoký podíl dětí do 1 roku věku v roce 2018, kdy bylo nasbíráno 48 takových izolátů v souvislosti s lokálním rozšířením MRSA mezi pacienty novorozeneckých a dětských oddělení (Brown *et al.* 2019). V dalších letech byly nasbírány již jen dva a jeden izolát od dětí do 1 roku. Průměrný věk pacienta s MRSA ve FN Motol v roce 2018 byl 34,69 let, na rozdíl od roku 2020, kdy byl průměrný věk 56,01 let.

Pomocí real-time PCR bylo detekováno 55 izolátů s PVL. V roce 2018 a 2020 bylo detekováno 11-12 % PVL pozitivních izolátů (10,88 a 11,86 %). Tyto hodnoty také přibližně odpovídají studii od Tkadlec *et al.*, kde byla prevalence PVL 8,6 %. Za rok 2019 bylo nasbíráno 32 PVL pozitivních izolátů, což odpovídá dvojnásobnému množství jako za rok 2018 (22,7 % vs 10,88 %). Častěji byly PVL pozitivní kmeny zachyceny u pacientů v ambulancích/na oddělení urgentního příjmu ve srovnání s pacienty standardních oddělení a JIP (32 vs 23). PVL se vyskytuje u komunitní MRSA, a proto je toto logické vysvětlení. Zároveň byl průměrný věk pacientů s PVL (28,87 let) signifikantně nižší ($p < 0,001$) než průměrný věk pacientů bez PVL (45,73 let). Stejně tak tomu bylo ve studii od Tkadlece *et al.*, kdy průměrný věk pacienta s PVL byl 31,5 let a průměrný věk pacienta bez PVL 69 let (Tkadlec *et al.* 2021). Všechny izoláty s PVL nesly SCCmecIV (konkrétně SCCmecIVa/IVc) nebo SCCmecV, nebyl detekován žádný PVL pozitivní izolát s SCCmecII.

6.2 MRSA Slovensko, leden – duben 2020

Tato část diplomové práce byla iniciována na základě toho, že neexistují veřejně dostupná data o epidemiologické situaci MRSA na Slovensku a díky spolupráci se společností Unilabs Slovensko provozující síť mikrobiologických laboratoří, se naskytla příležitost charakterizovat MRSA cirkulující na Slovensku. Ze slovenského sběru bylo celkem nasbíráno 413 neduplikovaných izolátů, ty pocházely z ambulancí a nemocnic všech osmi slovenských krajů.

Geografické rozložení izolátů není rovnoměrné, a zatímco nejvíce izolátů bylo nasbíráno z Košického kraje (n = 132), z Prešovského kraje (n = 89) a z Banskobystrického kraje (n = 82), tak například z Bratislavy bylo získáno pouze 7 izolátů. V porovnání se sběrem ve FN Motol, která představuje terciární zdravotnické zařízení soustřeďující vysoce odbornou péči o pacienty z celé ČR, byly ve Slovenské studii zahrnuty spíše lokální zdravotnická zařízení (okresní nemocnice), nebo dokonce zařízení primární péče (praktičtí lékaři a polikliniky). Nelze tedy jednoznačně srovnávat.

Nicméně podobně jako ve FN Motol byly nejčastějšími *spa*-typy t014 (n = 55; 13,32 %) a t003 (n = 42; 10,17 %) z klonálního komplexu 5. Tyto počty jsou srovnatelné s počty izolátů *spa*-typu t003 (n = 34; 9,80 %) a t014 (n = 45; 12,97 %) ve FN Motol. U slovenských izolátů t014 nebyla prokázána rezistence ke gentamicinu, naopak ve FN Motol bylo 18 ze 45 (40 %) izolátů t014 rezistentní ke gentamicinu. Na Slovensku byl CC5 dále reprezentován *spa*-typem t311 (ST5-IV). Na Slovensku bylo celkem zachyceno 29 izolátů, 10 z nich bylo pozitivní na PVL. Tkadlec *et al.* zachytil celkem 2 izoláty t311, jeden izolát PVL pozitivní a jeden PVL negativní. Ve FN Motol (2018-2020) byly zachyceny 3 izoláty, všechny bez PVL. Oproti *spa*-typům t003, t014 a t586, které patří do ST225 a nesou SCCmecII, t311 patří do ST5 a nese SCCmecIV. Podtyp tohoto SCCmec se však nepodařilo dourčit. Od ST225 *spa*-typů t003, t014 apod. typicky s rezistencí k erytromycinu, klindamycinu a fluorochinolonům se izoláty *spa*-typu t311 liší i absencí fluorochinolonové rezistence a pouze 18 z 29 izolátů t311 bylo rezistentních k erytromycinu, 17 z nich i inducibilně ke klindamycinu. Navíc některé izoláty t311 byly rezistentní pouze k oxacilinu a cefoxitinu (n = 8).

Další zajímavostí ve srovnání s FN Motol a Českou republikou je téměř úplná absence t586, který patří ve FN Motol a dalších českých nemocnicích k dominantním *spa*-typům a na Slovensku byly zachyceny pouze 2 izoláty *spa*-typu t586. Ve studii od Tkadlec *et al.* v Olomouckém, Zlínském a Moravskoslezském kraji, které sousedí se Slovenskem, nebyl zachycen žádný izolát *spa*-typu t586, ten se vyskytoval hlavně v Praze, Středočeském a Libereckém kraji. Ve Zlínském kraji patřila většina izolátů *spa*-typu t003, v Moravskoslezském kraji byl také dominantní *spa*-typ t003, byl detekován i t014. V Trenčinském kraji, který sousedí se Zlínským krajem, ale nebyl detekován ani jeden izolát t003, zato bylo zachyceno 5 izolátů t014 a dalších 6 izolátů patřící do CC5. V Žilinském kraji, který sousedí s Moravskoslezským krajem byly zachyceny 3 izoláty t003 a 5 izolátů t014. Rozdíl v těchto záchytech může být vysvětlen tím, že většina slovenských izolátů z těchto krajů pocházela z ambulantního prostředí, zatímco izoláty ze Zlínského a Moravskoslezského kraje pocházely z nemocnic (Tkadlec *et al.* 2021).

Dalším významným klonálním komplexem byl CC22 (n = 74) s vysokým zastoupením *spa*-typu t032 (n = 63). Všechny izoláty t032 nesly SCCmec IVh a byly rezistentní k fluorochinolonům, k erytromycinu bylo rezistentních 52 izolátů, z toho 12 izolátů bylo indukovaně rezistentních ke klindamycinu, 40 izolátů, které byly rezistentní k erytromycinu bylo také rezistentních ke klindamycinu. Tento *spa*-typ se řadí mezi významné zástupce HA-MRSA známý jakožto epidemický klon EMRSA-15 nebo také Barnim klon, Tento klon patří mezi hlavní linie MRSA v Evropě, s výskytem v Německu (Grundmann *et al.* 2014), Rakousku (Zarfel *et al.* 2016), v Maďarsku tvoří většinu izolátů (66,67 %) z hemokultur (Horváth *et al.* 2020), ale v České republice, kde se ve vyšší frekvenci vyskytoval kolem roku 2006 (Grundmann *et al.* 2010) postupně vymizel. Recentně Tkadlec *et al.* zachytili pouze 1 izolát t032 ze 441 izolátů a Pomorská *et al.* zachytili 2 takovéto izoláty (Pomorska *et al.* 2021; Tkadlec *et al.* 2021). Ve studii izolátů FN Motol byl pouze jeden izolát t032.

Třetím významně zastoupeným klonálním komplexem byl CC8 (n = 64) reprezentovaný *spa*-typem t008 (n = 60). U 54 izolátů t008 byla zjištěna přítomnost genu *lukSF* pro PVL současně s přítomností ACME. Tyto izoláty patří k epidemickému kmeni USA300, který se ale v okolních evropských zemích příliš nevyskytuje a významný je hlavně v USA a v Jižní Americe (Gustave *et al.* 2020; Nurjadi *et al.* 2019; Reyes *et al.* 2009; Tenover *et al.* 2006). Klon komunitní MRSA USA300 je kromě rezistence k β -laktamovým antibiotikům rezistentní k erytromycinu a fluorochinolonům (Tenover *et al.* 2006). Kromě 4 izolátů byly všechny slovenské izoláty rezistentní k fluorochinolonům a 54 izolátů bylo rezistentní k erytromycinu. Relativně častý výskyt USA300 na Slovensku je významný objev z epidemiologického hlediska. Slovensko může představovat potenciální rezervoár USA300 v Evropě. V budoucnu plánujeme provést bližší charakterizaci těchto izolátů včetně celogenomového sekvenování, které by umožnilo zasadit Slovenské izoláty USA300 do globální epidemiologie tohoto významného kmenu komunitní MRSA.

Dalším představitelem komunitní MRSA v Evropě je tzv Evropský klon CA-MRSA CC80, který patří mezi dominantní zástupce CA-MRSA v Evropě (Rolo *et al.* 2012). Z tohoto klonálního komplexu byly ale zachyceny pouze dva izoláty *spa*-typu t044. Systematické review studií reportující výskyt CC80 naznačuje, že tento kmen CA-MRSA je v řadě Evropských zemí postupně nahrazován jinými kmeny (Mairi *et al.* 2020).

Z 413 Slovenských izolátů bylo zachyceno 5 izolátů patřící do CC398 LA-MRSA, z toho 3 izoláty patřily do *spa*-typu t034. Kromě jednoho izolátu *spa*-typu t779, který byl rezistentní pouze k oxacilinu a cefoxitinu a nesl SCCmecIV, byly všechny izoláty CC398 rezistentní k tetracyklinu a nesly SCCmecV, stejně jako tomu bylo u izolátů CC398 z FN Motol.

Překvapivě byl na Slovensku, v zemi s tradicí chovu dobytka, detekován nižší počet izolátů CC398 (5 z 413 izolátů; 1,2 %) než ve FN Motol (12 z 347 izolátů; 3,46 %).

Z izolátů pocházejících ze Slovenska byl detekován 1 izolát patřící do ST130 (*spa*-typ t7603, CC130), u kterého byl detekován gen *mecC*, který je homologem genu *mecA* a také zajišťuje rezistenci k β -laktamovým antibiotikům. První záchyt genu *mecC* byl v roce 2011 z kravského mléka a byl detekován u několika linií – CC130, CC705, ST245 (García-Álvarez *et al.* 2011). Ve stejném roce byl tento gen detekován také u dvou pacientů z nemocnic v Irsku (Shore *et al.* 2011). V obou těchto studiích byl gen *mecC* nesen na SCC*mec*XI (García-Álvarez *et al.* 2011; Shore *et al.* 2011). Vzhledem k absenci primerů pro SCC*mec*VII – SCC*mec*XIV, v PCR esaji použité v této studii, nebyl u tohoto izolátu stanoven SCC*mec* typ. Jedná se o první záchyt *mecC* na Slovensku. V České republice byl detekován první případ *mecC* v roce 2010 (Mališová *et al.* 2018). V roce 2020 byl reportován případ izolátu MRSA u závodního koně v Japonsku, který nesl 2 geny způsobující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům – *mecA* i *mecC*. Tento izolát byl *spa*-typu t127 (CC1) (Sekizuka *et al.* 2020). Z izolátů na Slovensku byl detekován jeden izolát se *spa*-typem t127, tento izolát ovšem nesl pouze gen *mecA*.

Přestože spolu Česká republika se Slovenskem sousedí a dochází mezi nimi k aktivnímu přesunu osob i zboží, zastoupení jednotlivých *spa*-typů je mezi těmito zeměmi odlišné. Jedním z faktorů ovlivňujících toto porovnání může být rozdílné zaměření sběru izolátů MRSA, Tkadlec *et al.* i tato studie z FN Motol cílily hlavně na izoláty pocházející z nemocničního prostředí, sběr izolátů na Slovensku probíhal více jak z poloviny v ambulancích. Nelze tedy přímočaře srovnávat výsledky charakterizace Slovenských MRSA se situací ve FN Motol, potažmo ani v ČR (Tkadlec *et al.* 2021). Nicméně přesto věřím, že naše studie reflektuje významné rozdíly v epidemiologii MRSA mezi oběma zeměmi a je v tomto směru důležitým počinem.

6.3 Fyziologické vlastnosti dominantních linií MRSA v ČR a na Slovensku

Staphylococcus aureus, respektive MRSA, je jedna z předních patogenních bakterií reprezentující celosvětový problém antimikrobiální rezistence. Všestrannost a schopnost adaptace MRSA se projevuje variabilitou prostředí, do nichž kmeny MRSA pronikly, ať už se jedná o prostředí nemocničních zařízení, komunity, nebo chovu hospodářských zvířat. Od prvních zaznamenaných případů v 60. letech 20. století byly zdokumentovány vzestupy a pády řady linií MRSA, které se v určité oblasti nebo i globálně staly dominantními a po určité době byly vystřídány jinou linií MRSA. Tak tomu bylo např. v Portugalsku s Iberijským a Brazílským klonem (Aires-de-Sousa a De Lencastre 2004). Nebo přímo v případě České

republiky, kde dominanci Iberijského a Brazílského klonu vystřídal kmen EMRSA-15, který byl posléze nahrazen klonálním komplexem 5 se *spa*-typy t002, t003, t014 a nejnovějším t586 (Grundmann *et al.* 2010; Melter *et al.* 1999; 2003; Pomorska *et al.* 2021; Tkadlec *et al.* 2021). CC5 dosud přetrvává v České republice jako dominantní linie MRSA, jak potvrdila i první část této diplomové práce monitorující epidemiologii MRSA ve FN Motol.

Mezi jednotlivými liniemi MRSA existují významné rozdíly ovlivňující schopnost dané linie uspět v kompetici s jinými kmeny MRSA v daném prostředí. Rychlost růstu, která reprezentuje efektivitu využívání dostupných zdrojů, může být zásadní výhodou selektujícím mezi kmeny. Vzhledem k exponenciálnímu růstu bakterií i drobný rozdíl v době zdvojení může vést k rychlému převládnutí rychleji rostoucího kmene. Přítomnost antibiotik je významným faktorem ovlivňující kompetici bakterií. Zatímco vliv vysoké koncentrace antibiotika na kompetici citlivého a rezistentního kmene je zřejmý, při kompetici rezistentních kmenů není výsledek takto snáze předpověditelný. Navíc prostředí s antibiotiky v koncentrací vyšší, než je minimální inhibiční koncentrace existuje víceméně pouze po přechodnou dobu u pacienta na dané antibiotické terapii, mnohem častěji spolu bakterie kompetují v prostředí kontaminovaném subinhibičním množstvím antibiotik. Inspirací pro tuto studii byla práce Gustave *et al.*, ve které autoři porovnávali růstovou rychlost a prováděli kompetiční pokusy mezi izoláty kmene USA300 a jeho předchůdci, z nichž se tento kmen vyvinul. Akvizice genů rezistence předchůdci kmene USA300 měla při růstu v čistém médiu za následek prodloužení doby zdvojení vůči citlivým izolátům bazální linie kmene, výsledky kompetičních pokusu v médiu bez antibiotika potvrdily růstovou výhodu citlivého kmene, nicméně při přidání subinhibičního množství ceftriaxonu (0,125 mg/l) nebo ofloxacinu (0,003 mg/l) vycházely kompetiční pokusy ve prospěch rezistentních kmenů (Gustave *et al.* 2018). Drobným nedostatkem studie je, že autoři nestanovili růstovou rychlost i v prostředí s koncentracemi antibiotik testovanými v kompetičních pokusech.

V této diplomové práci bylo cílem srovnat obdobným způsobem dominantní klonální linie MRSA v ČR, byly proto sledovány rozdíly v růstové rychlosti (průměrná doba zdvojení) mezi izoláty reprezentující významné linie MRSA v ČR za podmínek růstu v čistém médiu (TSB), ale i v médiích s přídatkem subinhibiční koncentrace oxacilinu (0,001 mg/l) nebo azitromycinu (0,016 mg/l). Tato antibiotika byla vybrána dle údajů o spotřebě antibiotik v Evropě (Plachouras *et al.* 2018) a také vzhledem k tomu, že testované kmeny byly k těmto látkám rezistentní.

V prostředí bez antibiotik vykazoval izolát reprezentující CA-MRSA kmen USA300 nejkratší dobu zdvojení a rostl tedy rychleji než porovnávané izoláty HA-MRSA i LA-MRSA,

v polovině případů dosáhl rozdíl statistické významnosti. Tento výsledek odpovídá dřívějším studiím, které prokázaly nižší negativní dopad na rychlost růstu u menšího SCCmec elementu typu IV, typicky pro CA-MRSA, v porovnání s větším typem II běžným u HA-MRSA (Collins *et al.* 2010).

V prostředí s oxacilinem a azitromycinem měli nejkratší dobu zdvojení izoláty reprezentující HA-MRSA: EMRSA-15 a Iberijský klon, respektive ty, které rostly signifikantně rychleji než většina ostatních CA-MRSA a HA-MRSA klonů. Kmeny LA-MRSA patřily při všech podmínkách mezi izoláty s nejdelší dobou zdvojení, což pravděpodobně souvisí s relativně vzácnou detekcí těchto kmenů jak u hospitalizovaných pacientů, tak v komunitě (Voss *et al.* 2005).

Zajímavým zjištěním naší studie bylo, že u řady kmenu přítomnost antibiotik v subinhibiční koncentraci vedla paradoxně ke zkrácení doby zdvojení.

Nicméně je možné, že výsledky mohly být ovlivněny zvolenou metodou stanovení růstové rychlosti, případně nereflektovanou změnou – například změnou šarže kultivačního média apod. Proto plánujeme již mimo rámec diplomové práce pokusy zopakovat s využitím přístroje umožňujícím kontinuální měření optické density při kultivaci v 96 jamkové destičce. Tento přístroj bude v nejbližších týdnech instalován na pracovišti školitele.

Kompetiční esej mezi studovanými kmeny, která se z časových důvodů nestihla, by mohla také pomoci potvrdit výsledky testování růstové rychlosti.

7. Souhrn

- U izolátů MRSA pocházejících z FN Motol za období 2018-2020 byla potvrzena stávající dominance CC5 reprezentovaného hlavně *spa*-typem t586.
- Byla vyvrácena hypotéza předpokládající stejné rozložení *spa*-typů u slovenských izolátů pocházejících z období leden-duben 2020. Přestože je, stejně jako v České republice, dominantní CC5, jsou bohatě zastoupeny i další klonální komplexy, např. CC8 a CC22.
- Ve FN Motol jednoznačně dominuje CC5 se *spa*-typem t586, na Slovensku byl tento *spa*-typ zachycen pouze ve dvou případech. Přesto se tam CC5 vyskytuje, a to hlavně t003 a t014, mimo těchto *spa*-typů je významný výskyt t311, v některých případech PVL pozitivní. t311 se řadí do ST5 (t003 a t014 spadají pod ST225). Významný je také podíl HA-MRSA t032 (SCC*mecIVh*), jak již bylo zmíněno výše. Oproti FN Motol, kde byly detekovány 2 izoláty t026 z CC45 a Tkadlec *et al*, kde detekovali 1 izolát t026, bylo na Slovensku detekováno 21 izolátů t026 (SCC*mecIV*). Pro longitudinální trend by byla potřeba tento sběr zopakovat a rozšířit.
- Byl objeven výskyt epidemického klonu USA300 na Slovensku v celkovém počtu 54 izolátů. Jedná se o jedinečný evropský záchyt.
- Byl zachycen izolát s genem *mecC*, jedná se o první záchyt *mecC* na Slovensku.

8. Seznam literatury

- AGAR. 2017. "The Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Staphylococcal Sepsis Outcome Program (ASSOP)."
- Aiello, A. E., F. D. Lowy, L. N. Wright, and E. L. Larson. 2006. "Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* among US Prisoners and Military Personnel: Review and Recommendations for Future Studies." *Lancet Infectious Diseases* 6 (6): 335–41.
- Aires-de-Sousa, M. 2017. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* among Animals: Current Overview." *Clinical Microbiology and Infection* 23 (6): 373–80.
- Aires-de-Sousa, M., and H. De Lencastre. 2004. "Bridges from Hospitals to the Laboratory: Genetic Portraits of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 40 (2): 101–11.
- Aires-de-Sousa, M., I. Santos Sanches, M. L. Ferro, M. J. Vaz, Z. Saraiva, T. Tendeiro, J. Serra, and H. De Lencastre. 1998. "Intercontinental Spread of a Multidrug-Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Clone." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (9): 2590–96.
- Badarau, A., N. Trstenjak, and E. Nagy. 2017. "Structure and Function of the Two-Component Cytotoxins of *Staphylococcus Aureus* – Learnings for Designing Novel Therapeutics." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 966: 15–35.
- Bartels, M. D., A. Petersen, P. Worning, J. B. Nielsen, H. Larner-Svensson, H. K. Johansen, L. P. Andersen, et al. 2014. "Comparing Whole-Genome Sequencing with Sanger Sequencing for *Spa* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Clinical Microbiology* 52 (12): 4305–8.
- Begier, E. M., K. Frenette, N. L. Barrett, P. Mshar, S. Petit, D. J. Boxrud, K. Watkins-Colwell, et al. 2004. "A High-Morbidity Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* among Players on a College Football Team, Facilitated by Cosmetic Body Shaving and Turf Burns." *Clinical Infectious Diseases* 39 (10): 1446–53.
- Blumental, S., A. Deplano, S. Jourdain, R. De Mendonça, M. Hallin, C. Nonhoff, S. Rottiers, A. Vergison, and O. Denis. 2013. "Dynamic Pattern and Genotypic Diversity of *Staphylococcus Aureus* Nasopharyngeal Carriage in Healthy Pre-School Children." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (7): 1517–23.
- Börjesson, S., A. Matussek, S. Melin, S. Löfgren, and P. E. Lindgren. 2010. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Municipal Wastewater: An Uncharted Threat?" *Journal of Applied Microbiology* 108 (4): 1244–51.
- Bos, M. E. H., K. M. Verstappen, B. A.G.L. Van Cleef, W. Dohmen, A. Dorado-García, H. Graveland, B. Duim, J. A. Wagenaar, J. A.J.W. Kluytmans, and D. J.J. Heederik. 2016. "Transmission through Air as a Possible Route of Exposure for MRSA." *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 26 (3): 263–69.
- Brauner, J., M. Hallin, A. Deplano, R. De Mendonça, C. Nonhoff, R. De Ryck, S. Roisin, M. J. Struelens, and O. Denis. 2013. "Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones Circulating in Belgium from 2005 to 2009: Changing Epidemiology." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32 (5): 613–20.
- Brown, N. M., M. Reacher, W. Rice, I. Roddick, L. Reeve, N. Q. Verlander, S. Broster, et al. 2019. "An Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit: Use of a Case–Control Study to Investigate and Control It and Lessons Learnt." *Journal of Hospital Infection* 103 (1): 35–43.
- Buck, J. M., K. Como-Sabetti, K. H. Harriman, R. N. Danila, D. J. Boxrud, A. Glennen, and R. Lynfield. 2005. "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, Minnesota, 2000–2003." *Emerging Infectious Diseases* 11 (10): 1532–38.

- Campanile, F., D. Bongiorno, S. Borbone, and S. Stefani. 2009. "Hospital-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (HA-MRSA) in Italy." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8 (22): 1–10.
- Castillo-Ramírez, S., J. Corander, P. Marttinen, M. Aldeljawi, W. P. Hanage, H. Westh, K. Boye, et al. 2012. "Phylogeographic Variation in Recombination Rates within a Global Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Genome Biology* 13 (1): R126.
- Ceballos, S., C. Aspiroz, L. Ruiz-Ripa, E. Reynaga, J. M. Azcona-Gutiérrez, A. Rezusta, C. Seral, et al. 2019. "Epidemiology of MRSA CC398 in Hospitals Located in Spanish Regions with Different Pig-Farming Densities: A Multicentre Study." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (8): 2157–61.
- Chambers, H. F., and F. R. Deleo. 2009. "Waves of Resistance: *Staphylococcus Aureus* in the Antibiotic Era." *Nat Rev Microbiol* 7 (5): 30.
- Chen, Y., L. Sun, X. Ba, S. Jiang, H. Zhuang, F. Zhu, H. Wang, et al. 2021. "Epidemiology, Evolution and Cryptic Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in China: A Whole-Genome-Based Survey." *Clinical Microbiology and Infection*.
- Cheung, G.Y.C., R. Wang, B. A. Khan, D. E. Sturdevant, and M. Otto. 2011. "Role of the Accessory Gene Regulator *agr* in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Pathogenesis." *Infection and Immunity* 79 (5): 1927–35.
- Chmielarczyk, A., M. Pomorska-Wesołowska, A. Szczypta, D. Romaniszyn, M. Pobiega, and J. Wójkowska-Mach. 2017. "Molecular Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Different Types of Infections from Patients Hospitalized in 12 Regional, Non-Teaching Hospitals in Southern Poland." *Journal of Hospital Infection* 95 (3): 259–67.
- Collins, J., J. Rudkin, M. Recker, C. Pozzi, J. P. O’Gara, and R. C. Massey. 2010. "Offsetting Virulence and Antibiotic Resistance Costs by MRSA." *ISME Journal* 4 (4): 577–84.
- Conceição, T., M. Aires-de-sousa, M. Füzi, Á Tóth, J. Pászti, E. Ungvári, W. B. Van Leeuwen, A. Van Belkum, H. Grundmann, and H. De Lencastre. 2007. "Replacement of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones in Hungary over Time: A 10-Year Surveillance Study." *Clinical Microbiology and Infection* 13 (10): 971–79.
- Coombs, G., K. Christiansen, J. Pearson, F. O’Brien, G. Nimmo, and P. Collignon. 2004. "*Staphylococcus Aureus* Programme 2003 (SAP 2003) Hospital/Community Survey." http://www.agargroup.org/files/SAP09_MRSA_TYPING_REPORT_FINAL
- Crisóstomo, M. I., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, and H. De Lencastre. 2001. "The Evolution of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Similarity of Genetic Backgrounds in Historically Early Methicillin-Susceptible and -Resistant Isolates and Contemporary Epidemic Clones." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9865–70.
- Cui, S., J. Li, C. Hu, S. Jin, F. Li, Y. Guo, L. Ran, and Y. Ma. 2009. "Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* from Swine and Workers in China." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (4): 680–83.
- Degnan, B. A., M. C. Fontaine, A. H. Doebereiner, J. J. Lee, P. Mastroeni, G. Dougan, J. A. Goodacre, and M. A. Kehoe. 2000. "Characterization of an Isogenic Mutant of *Streptococcus Pyogenes* Manfredo Lacking the Ability to Make Streptococcal Acid Glycoprotein." *Infection and Immunity* 68 (5): 2441–48.
- Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M.G. Davidson, F. Lin, et al. 2006. "Complete Genome Sequence of USA300, an Epidemic Clone of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Lancet* 367 (9512): 731–39.
- Drougka, E., A. Foka, A. Liakopoulos, A. Doudoulakakis, E. Jelastopulu, V. Chini, A. Spiliopoulou, et al. 2014. "A 12-Year Survey of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Greece: ST80-IV Epidemic?" *Clinical Microbiology and Infection* 20 (11): O796–803.

- Durand, G., F. Javerliat, M. Bes, J.-B. Veyrieras, G. Guigon, N. Mugnier, S. Schicklin, et al. 2018. "Routine Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of *Staphylococcus Aureus* in a National Reference Center" 9 (March): 1–12.
- Enright, M. C., N. P.J. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt. 2000. "Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3): 1008–15.
- EUCAST. 2020. "Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters." https://www.Eucast.Org/Ast_of_Bacteria/, 0–77. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- Fang, H., G. Hedin, G. Li, and C. E. Nord. 2008. "Genetic Diversity of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Southern Stockholm, 2000-2005." *Clinical Microbiology and Infection* 14 (4): 370–76.
- Fang, H. W., P. H. Chiang, and Y. C. Huang. 2014. "Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST9 in Pigs and Related Personnel in Taiwan." *PLoS ONE* 9 (2).
- Feil, E. J., J. E. Cooper, H. Grundmann, D. A. Robinson, M. C. Enright, T. Berendt, S. J. Peacock, et al. 2003. "How Clonal Is *Staphylococcus Aureus*?" *Journal of Bacteriology* 185 (1): 3307–16.
- Fenner, L., A. F. Widmer, M. Dangel, and R. Frei. 2008. "Distribution of Spa Types among Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates during a 6 Year Period at a Low-Prevalence University Hospital." *Journal of Medical Microbiology* 57 (5): 612–16.
- García-Álvarez, L., M. T.G. Holden, H. Lindsay, C. R. Webb, D. F.J. Brown, M. D. Curran, E. Walpole, et al. 2011. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with a Novel *mecA* Homologue in Human and Bovine Populations in the UK and Denmark: A Descriptive Study." *The Lancet Infectious Diseases* 11 (8): 595–603.
- Glasner, C., G. Pluister, H. Westh, J. P. Arends, J. Empel, E. Giles, F. Laurent, et al. 2015. "*Staphylococcus Aureus* Spa Type t437: Identification of the Most Dominant Community-Associated Clone from Asia across Europe." *Clinical Microbiology and Infection* 21 (2): 163.e1-163.e8.
- Graveland, H., J. A. Wagenaar, K. Bergs, H. Heesterbeek, and D. Heederik. 2011. "Persistence of Livestock Associated MRSA CC398 in Humans Is Dependent on Intensity of Animal Contact." *PLoS ONE* 6 (2): 1–7.
- Grøntvedt, C. A., P. Elstrøm, M. Stegger, R. L. Skov, P.S. Andersen, K. W. Larssen, A. M. Urdahl, et al. 2016. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* CC398 in Humans and Pigs in Norway: A 'One Health' Perspective on Introduction and Transmission." *Clinical Infectious Diseases* 63 (11): 1431–38.
- Grundmann, H., D. M. Aanensen, C. C van den Wijngaard, B. G. Spratt, D. Harmsen, and A. W. Friedrich. 2010. "Geographic Distribution of *Staphylococcus Aureus* Causing Invasive Infections in Europe : A Molecular-Epidemiological Analysis." *PLOS* 7 (1).
- Grundmann, H., L. M. Schouls, D. M. Aanensen, G. N. Pluister, A. Tami, M. Chlebowicz, and C. Glasner. 2014. "The Dynamic Changes of Dominant Clones of *Staphylococcus Aureus* Causing Bloodstream Infections in the European Region : Results of a Second Structured Survey." *Eurosurveillance*, 1–10.
- Gustave, C. A., J. P. Rasigade, P. M. Simões, F. Couzon, C. Bourg, A. Tristan, F. Laurent, T. Wirth, and F. Vandenesch. 2020. "Potential Role of Mercury Pollutants in the Success of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* USA300 in Latin America." 44 (0): 1–24.
- Gustave, C. A., A. Tristan, P. Martins-Simões, M. Stegger, Y. Benito, P. S. Andersen, M. Bes, et al. 2018. "Demographic Fluctuation of Community-Acquired Antibiotic-Resistant *Staphylococcus Aureus* Lineages: Potential Role of Flimsy Antibiotic Exposure." *ISME Journal* 12 (8): 1879–94.

- Hanssen, A. M., A. Fossum, J. Mikalsen, D. S. Halvorsen, G. Bukholm, and J. U. E. Sollid. 2005. "Dissemination of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones in Northern Norway: Sequence Types 8 and 80 Predominate." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5): 2118–24.
- Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothgänger, H. Claus, D. Turnwald, and U. Vogel. 2003. "Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *Spa* Repeat Determination and Database Management." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (12): 5442–48.
- Harris, S. R., E. J. Feil, M.T.G. Holden, M. A. Quail, E. K. Nickerson, N. Chantratita, S. Gardete, et al. 2010. "Evolution of MRSA during Hospital Transmission and Intercontinental Spread." *Science* 327 (5964): 469–74.
- Harrison, E. M., G. K. Paterson, M. T.G. Holden, J. Larsen, M. Stegger, A. R. Larsen, A. Petersen, et al. 2013. "Whole Genome Sequencing Identifies Zoonotic Transmission of MRSA Isolates with the Novel *MecA* Homologue *MecC*." *EMBO Molecular Medicine* 5 (4): 509–15.
- Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, and R. S. Daum. 1998. "Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Children with No Identified Predisposing Risk." *Journal of the American Medical Association* 279 (8): 593–98.
- Holochová, Pavla, Vladislava Růžičková, Roman Pantůček, Petr Petráš, Roman Janisch, and Jiří Doškař. 2010. "Genomic Diversity of Two Lineages of Exfoliative Toxin A-Converting Phages Predominating in *Staphylococcus Aureus* Strains in the Czech Republic." *Research in Microbiology* 161 (4): 260–67.
- Horváth, A., O. Dobay, J. Sahin-Tóth, E. Juhász, J. Pongrácz, M. Iván, E. Fazakas, and K. Kristóf. 2020. "Characterisation of Antibiotic Resistance, Virulence, Clonality and Mortality in MRSA and MSSA Bloodstream Infections at a Tertiary-Level Hospital in Hungary: A 6-Year Retrospective Study." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19 (1): 1–11.
- Ito, T., K. Kuwahara-Arai, Y. Katayama, Y. Uehara, X. Han, Y. Kondo, and K. Hiramatsu. 2014. "Staphylococcal Cassette Chromosome *Mec* (*SCCmec*) Analysis of MRSA." *Methods in Molecular Biology* 1085: 131–48.
- Ito, T., X. X. Ma, F. Takeuchi, K. Okuma, H. Yuzawa, and K. Hiramatsu. 2004. "Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *Mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *CcrC*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2637–51.
- Johnson, A., H. M. Aucken, S. Cavendish, M. Ganner, M. C. J. Wale, M. Warner, D. M. Livermore, and B. D. Cookson. 2001. "Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA Causing Nosocomial Bacteraemia in the UK: Analysis of Isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 141–56.
- Jones, M. B., C. P. Montgomery, S. Boyle-Vavra, K. Shatzkes, R. Maybank, B. C. Frank, S. N. Peterson, and R. S. Daum. 2014. "Genomic and Transcriptomic Differences in Community Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* USA300 and USA400 Strains." *BMC Genomics* 15 (9): 1–10.
- Kaïret, K., E. Ho, D. Van Kerkhoven, J. Boes, S. Van Calenbergh, L. Pattyn, and P. Lemay. 2017. "USA300, A Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, Crossing Belgium's Borders: Outbreak of Skin and Soft Tissue Infections in a Hospital in Belgium." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 36 (5): 905–9.
- Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. "A New Class of Genetic Element, Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (6): 1549–55.
- Kondo, Y., T. Ito, X. X. Ma, S. Watanabe, B. N. Kreiswirth, J. Etienne, and K. Hiramatsu. 2007. "Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *Mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *Mec*, *Ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (1): 264–74.

- Kong, H., F. Yu, W. Zhang, X. Li, and H. Wang. 2017. "Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains in a Tertiary Hospital in China." *Frontiers in Microbiology* 8 (MAY): 838.
- Larsen, J., M. Imanishi, S. Hinjoy, P. Tharavichitkul, K. Duangsong, M. F. Davis, K. E. Nelson, A. R. Larsen, and R. L. Skov. 2012. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST9 in Pigs in Thailand." *PLoS ONE* 7 (2): 9–11.
- Larsen, Mette V., Salvatore Cosentino, Simon Rasmussen, Carsten Friis, Henrik Hasman, Rasmus Lykke Marvig, Lars Jelsbak, et al. 2012. "Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (4): 1355–61.
- Lee, A. S., H. De Lencastre, J. Garau, J. Kluytmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, and S. Harbarth. 2018. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Nature Reviews Disease Primers* 4 (May): 1–23.
- Li, M., B. A. Diep, A. E. Villaruz, K. R. Braughton, X. Jiang, F. R. DeLeo, H. F. Chambers, Y. Lu, and M. Otto. 2009. "Evolution of Virulence in Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14): 5883–88.
- Liu, C., C. J. Graber, M. Karr, B. A. Diep, L. Basuino, B. S. Schwartz, M. C. Enright, et al. 2008. "A Population-Based Study of the Incidence and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Disease in San Francisco, 2004–2005." *Clinical Infectious Diseases* 46 (11): 1637–46.
- Loftus, R. W., F. Dexter, A. D. M. Robinson, and A. R. Horswill. 2018. "Desiccation Tolerance Is Associated with *Staphylococcus Aureus* Hypertransmissibility, Resistance and Infection Development in the Operating Room." *Journal of Hospital Infection* 100 (3): 299–308.
- Loncaric, I., A. Kübber-Heiss, A. Posautz, G. L. Stalder, D. Hoffmann, R. Rosengarten, and C. Walzer. 2013. "Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Spp. Carrying the *mecC* Gene, Isolated from Wildlife." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (10): 2222–25.
- Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daun, and K. Hiramatsu. 2002. "Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strain Isolated in Sweden." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (4): 1147–52.
- Magiorakos, A., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, and J. F. Hindler. 2012. "Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 18: 268–81.
- Mairi, A., A. Touati, and J. P. Lavigne. 2020. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST80 Clone: A Systematic Review." *Toxins* 12 (2): 1–21.
- Majerczyk, C. D., M. R. Sadykov, T. T. Luong, C. Lee, G. A. Somerville, and A. L. Sonenshein. 2008. "*Staphylococcus Aureus* *CodY* Negatively Regulates Virulence Gene Expression." *Journal of Bacteriology* 190 (7): 2257–65.
- Mališová, L., M. Fridrichová, V. Jakubů, J. Kekláková, P. Petráš, and H. Žemličková. 2018. "Záchyt *mecC* Pozitivních MRSA (Meticilin Rezistentní *Staphylococcus Aureus*) v České Republice." *Zprávy CEM* 27 (2): 56–57.
- Mama, O. M., C. Aspiroz, L. Ruiz-Ripa, S. Ceballos, M. Iñiguez-Barrio, E. Cercenado, J. M. Azcona, et al. 2021. "Prevalence and Genetic Characteristics of *Staphylococcus Aureus* CC398 Isolates From Invasive Infections in Spanish Hospitals, Focusing on the Livestock-Independent CC398-MSSA Clade." *Frontiers in Microbiology* 12 (February).
- Mato, R., I. Santos Sanches, M. Venditti, D. J. Platt, A. Brown, M. Chung, and H. De Lencastre. 1998. "Spread of the Multiresistant Iberian Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) to Italy and Scotland." *Microbial Drug Resistance* 4 (2): 107–12.

- McCarthy, A. J., A. S. Breathnach, and J. A. Lindsay. 2012. "Detection of Mobile-Genetic-Element Variation between Colonizing and Infecting Hospital-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (3): 1073–75.
- McCarthy, A. J., and J. A. Lindsay. 2010. "Genetic Variation in *Staphylococcus Aureus* Surface and Immune Evasion Genes Is Lineage Associated: Implications for Vaccine Design and Host-Pathogen Interactions." *BMC Microbiology* 10 (173).
- McCarthy, A. J., and J. A. Lindsay. 2012. "The Distribution of Plasmids That Carry Virulence and Resistance Genes in *Staphylococcus Aureus* Is Lineage Associated." *BMC Microbiology* 12 (104).
- McCarthy, A. J., and J. A. Lindsay. 2013. "*Staphylococcus Aureus* Innate Immune Evasion Is Lineage-Specific: A Bioinformatics Study." *Infection, Genetics and Evolution* 19: 7–14.
- McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, and F. C. Tenover. 2003. "Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (11): 5113–20.
- Mellmann, A., T. Weniger, C. Berssenbrügge, J. Rothgänger, M. Sammeth, J. Stoye, and D. Harmsen. 2007. "Based Upon Repeat Pattern (BURP): An Algorithm to Characterize the Long-Term Evolution of *Staphylococcus Aureus* Populations Based on *spa* Polymorphisms." *BMC Microbiology* 7 (98).
- Melter, O., M. Aires-de-Sousa, P. Urbášková, V. Jakubů, H. Žemličková, and H. De Lencastre. 2003. "Update on the Major Clonal Types of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in the Czech Republic." *Journal of Clinical Investigation* 41 (11): 4998–5005.
- Melter, O., I. Santos Sanches, J. Schindler, M. Aires-de-Sousa, R. Mato, V. Kovárova, H. Zemlicková, and H. De Lencastre. 1999. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clonal Types in the Czech Republic." *Journal of Clinical Microbiology* 37 (9): 2798–2803.
- Milheiro, C., D. C. Oliveira, and H. de Lencastre. 2007. "Multiplex PCR Strategy for Subtyping the Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Type IV in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: 'SCCmec IV Multiplex.'" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (1): 42–48.
- Monecke, S., G. Coombs, A. C. Shore, D. C. Coleman, P. Akpaka, M. Borg, H. Chow, et al. 2011. "A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *PLoS ONE* 6 (4).
- Monecke, S., P. Slickers, D. Gawlik, E. Müller, A. Reissig, A. Ruppelt-Lorz, P. E. Akpaka, et al. 2018. "Molecular Typing of ST239-MRSA-III from Diverse Geographic Locations and the Evolution of the SCCmec III Element during Its Intercontinental Spread." *Frontiers in Microbiology* 9 (JUL).
- Murra, M., K. L. Mortensen, and M. Wang. 2019. "Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (Clonal Complex 398) Causing Bacteremia and Epidural Abscess." *International Journal of Infectious Diseases* 81: 107–9.
- Nakagawa, S., I. Taneike, D. Mimura, N. Iwakura, T. Nakayama, T. Emura, M. Kitatsuji, A. Fujimoto, and T. Yamamoto. 2005. "Gene Sequences and Specific Detection for Pantone-Valentine Leukocidin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (4): 995–1002.
- Neradova, K., M. Fridrichova, V. Jakubu, K. Pomorska, and H. Zemlickova. 2020. "Epidemiological Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates from Bloodstream Cultures at University Hospital in the Czech Republic." *Folia Microbiologica* 65 (3): 615–22.
- Nurjadi, D., R. Fleck, A. Lindner, J. Schäfer, M. Gertler, A. Mueller, H. Lagler, et al. 2019. "Import of Community-Associated, Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* to Europe through Skin and Soft-Tissue Infection in Intercontinental Travellers, 2011–2016." *Clinical Microbiology and Infection* 25 (6): 739–46.
- O'Toole, G. A. 2010. "Microtiter Dish Biofilm Formation Assay." *Journal of Visualized Experiments*, no. 47: 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>.

- Oliveira, D. C., Al. Tomasz, and H. De Lencastre. 2001. "The Evolution of Pandemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Identification of Two Ancestral Genetic Backgrounds and the Associated Mec Elements." *Microbial Drug Resistance* 7 (4): 349–61.
- Plachouras, D., T. Kärki, S. Hansen, S. Hopkins, O. Lyytikäinen, M. L. Moro, J. Reilly, et al. 2018. "Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals: Results from the Second Point Prevalence Survey (PPS) of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use, 2016 to 2017." *Eurosurveillance* 23 (46).
- Planet, P. J., A. Narechania, L. Chen, B. Mathema, S. Boundy, G. Archer, and B. Kreiswirth. 2017. "Architecture of a Species: Phylogenomics of *Staphylococcus Aureus*." *Trends in Microbiology* 25 (2): 153–66.
- Pomorska, K., V. Jakubu, L. Malisova, M. Fridrichova, M. Musilek, and H. Zemlickova. 2021. "Antibiotic Resistance, *Spa* Typing and Clonal Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Isolates from Blood of Patients Hospitalized in the Czech Republic." *Antibiotics* 10 (395).
- Price, L. B., M. Stegger, H. Hasman, M. Aziz, J. Larsen, P. S. Andersen, T. Pearson, et al. 2012. "*Staphylococcus Aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock." *MBio* 3 (1): 1–6.
- Reyes, J., S. Rincón, L. Díaz, D. Panesso, G. A. Contreras, J. Zurita, C. Carrillo, et al. 2009. "Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA), USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin-America." *Clin Infect Dis.* 49 (12): 1861–67.
- Robinson, D. A., and M. C. Enright. 2004. "Multilocus Sequence Typing and the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Clinical Microbiology and Infection* 10 (2): 92–97.
- Rolo, J., M. Miragaia, A. Turlej-Rogacka, J. Empel, O. Bouchami, N. A. Faria, A. Tavares, W. Hryniewicz, A. C. Fluit, and H. de Lencastre. 2012. "High Genetic Diversity among Community-Associated *Staphylococcus Aureus* in Europe: Results from a Multicenter Study." *PLoS ONE* 7 (4).
- Sanches, I. S., M. Ramirez, H. Troni, M. Abecassis, M. Padua, A. Tomasz, and H. De Lencastre. 1995. "Evidence for the Geographic Spread of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clone between Portugal and Spain." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5): 1243–46.
- Santos-Júnior, C. D., A. Veríssimo, and J. Costa. 2016. "The Recombination Dynamics of *Staphylococcus Aureus* Inferred from *Spa* Gene." *BMC Microbiology* 16 (143): 1–16.
- Santos, V., A. Gomes, L. Ruiz-Ripa, O. M. Mama, C. Sabença, M. Sousa, V. Silva, et al. 2020. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* CC398 in Purulent Lesions of Piglets and Fattening Pigs in Portugal." *Microbial Drug Resistance* 26 (7): 850–56.
- Saravolatz, L. D., D. J. Pohlod, and L. M. Arking. 1982. "Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections: A New Source for Nosocomial Outbreaks." *Annals of Internal Medicine* 97 (3): 325–29.
- Schulte, B., G. Bierbaum, K. Pohl, C. Goerke, and C. Wolz. 2013. "Diversification of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains (Rhine-Hesse Clone) within Germany." *Journal of Clinical Microbiology* 51 (1): 212–16.
- Sekizuka, T., H. Niwa, Y. Kinoshita, E. Uchida-Fujii, Y. Inamine, M. Hashino, and M. Kuroda. 2020. "Identification of a *mecA/mecC*-Positive Mrsa ST1-t127 Isolate from a Racehorse in Japan." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (2): 292–95.
- Shore, A. C., E. C. Deasy, P. Slickers, G. Brennan, B. O'Connell, S. Monecke, R. Ehricht, and D. C. Coleman. 2011. "Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Type XI Carrying Highly Divergent *MecA*, *MecI*, *MecR1*, *BlaZ*, and *Ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (8): 3765–73.
- Sieber, R. N., R. L. Skov, J. Nielsen, J. Schulz, L. B. Price, F. M. Aarestrup, A. R. Larsen, M. Stegger, and J. Larsen. 2018. "Drivers and Dynamics of Methicillin-Resistant Livestock-Associated *Staphylococcus Aureus* CC398 in Pigs and Humans in Denmark." *MBio* 9 (6): 1–12.

- Stam-Bolink, E. M., D. Mithoe, W. H. Baas, J. P. Arends, and A. V. M. Möller. 2007. "Spread of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST80 Strain in the Community of the Northern Netherlands." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26 (10): 723–27.
- Stegger, M., T. Wirth, P. S. Andersen, R. L. Skov, A. De Grassi, P. M. Simões, A. Tristan, et al. 2014. "Origin and Evolution of European Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *MBio* 5 (5): 1–12.
- Strommenger, B., C. Bräulke, D. Heuck, C. Schmidt, B. Pasemann, U. Nübel, and W. Witte. 2008. "Spa Typing of *Staphylococcus Aureus* as a Frontline Tool in Epidemiological Typing." *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2): 574–81.
- SZÚ. 2014. "Stafylokoky - Průkaz Indukované Rezistence Ke Klindamycinu (D)," no. Mic: 1–5.
- Tenover, F. C., L. K. McDougal, R. V. Goering, G. Killgore, S. J. Projan, J. B. Patel, and P. M. Dunman. 2006. "Characterization of a Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant." *Microbiology* 44 (1): 108–18.
- Tkadlec, J., V. Capek, M. Brajerova, E. Smelikova, O. Melter, T. Bergerova, S. Polivkova, et al. 2021. "The Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in the Czech Republic." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–10.
- Tseng, S. P., W.C. Hung, C. Y. Huang, Y. S. Lin, M. Y. Chan, P. Li. Lu, L. Lin, and J. H. Sheu. 2016. "5-Episinuleptolide Decreases the Expression Of the Extracellular Matrix in Early Biofilm Formation of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Marine Drugs* 14 (8).
- Urushibara, N., M. S. Aung, M. Kawaguchiya, and N. Kobayashi. 2020. "Novel Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (SCCmec) Type XIV (5A) and a Truncated SCCmec Element in SCC Composite Islands Carrying SpeG in ST5 MRSA in Japan." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (1): 46–50.
- Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, M.-E. Reverdy, and J. Etienne. 2003. "Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes : Worldwide Emergence" 9 (8).
- Voss, A., F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen, and M. Wulf. 2005. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Pig Farming." *Emerging Infectious Diseases* 11 (12): 1965–66.
- Waldron, D. E., and J. A. Lindsay. 2006. "Saul: A Novel Lineage-Specific Type I Restriction-Modification System That Blocks Horizontal Gene Transfer into *Staphylococcus Aureus* and between *S. Aureus* Isolates of Different Lineages." *Journal of Bacteriology* 188 (15): 5578–85.
- Witte, W., C. Bräulke, C. Cuny, B. Strommenger, G. Werner, D. Heuck, U. Jappe, C. Wendt, H. J. Linde, and D. Harmsen. 2005. "Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with Panton-Valentine Leukocidin Genes in Central Europe." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24 (1): 1–5.
- Witte, W., B. Strommenger, C. Stanek, and C. Cuny. 2007. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST398 in Humans and Animals, Central Europe." *Emerging Infectious Diseases* 13 (2): 255–58.
- Zarfel, G., J. Luxner, B. Folli, E. Leitner, G. Feierl, C. Kittinger, and A. Grisold. 2016. "Increase of Genetic Diversity and Clonal Replacement of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains in South-East Austria." *FEMS Microbiology Letters* 363 (14): 1–6.
- Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie, and J. M. Conly. 2005. "Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 5026–33.

9. Přílohy

Příloha 1. Publikace článku charakterizující epidemiologickou situaci v 11 českých nemocnicích v ČR, kde je autorka diplomové práce spoluautorkou.

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkaa404

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Czech Republic

Jan Tkadlec^{1*}, Vaclav Capek², Marie Brajerova¹, Eva Smelikova¹, Oto Melter¹, Tamara Bergerova³, Sylvia Polivkova⁴, Magda Balejova⁵, Marketa Hanslianova⁶, Daniela Fackova⁷, Katerina Neradova⁸, Renata Tejkalova⁹, Iva Vagnerova¹⁰, Natasa Bartonikova¹¹, Eva Chmelarova¹², Pavel Drevinek¹ and Marcela Krutova¹

¹Department of Medical Microbiology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic; ²Bioinformatics Centre, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ³Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic; ⁴Department of Infectious Diseases, Charles University, 3rd Faculty of Medicine and Bulovka Teaching Hospital, Prague, Czech Republic; ⁵Department of Medical Microbiology, Hospital Ceske Budejovice, Czech Republic; ⁶Department of Medical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic; ⁷Department of Medical Microbiology and Immunology, Hospital Liberec, Czech Republic; ⁸Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic; ⁹Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Masaryk University and St Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic; ¹⁰Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, University Hospital Olomouc, Czech Republic; ¹¹Department of Medical Microbiology, Tomas Bata's Hospital Zlin, Czech Republic; ¹²Department of Microbiology, Agel Laboratories a.s., Ostrava-Vitkovice, Czech Republic

*Corresponding author. E-mail: jan.tkadlec@fmotol.cuni.cz

Received 9 April 2020; accepted 30 August 2020

Objectives: To gain data on the current molecular epidemiology and resistance of MRSA in the Czech Republic.

Methods: Between September 2017 and January 2018, a total of 441 single-patient MRSA isolates were collected from 11 Czech hospitals and analysed by *spa* typing, SCCmec typing, antibiotic susceptibility testing, detection of the PVL toxin and the *arcA* gene.

Results: Of all MRSA isolates, 81.41% ($n = 359$) belonged to the CC5-MRSA clone represented by the *spa* types t003 ($n = 136$), t586 ($n = 92$), t014 ($n = 81$), t002 ($n = 20$) and other *spa* types ($n = 30$); a majority of the CC5 isolates ($n = 348$, 96.94%) carried SCCmec type II. The occurrence of CC5-MRSA was more likely in older inpatients and associated with a healthcare origin ($P < 0.001$). The CC5-MRSA isolates were resistant to more antimicrobial drugs compared with the other MRSA ($P < 0.001$). Interestingly, t586 was detected in blood samples more often than the other *spa* types and, contrary to other *spa* types belonging to CC5-MRSA, t586 was not associated with patients of advanced age. Other frequently found lineages were CC8 ($n = 17$), CC398 ($n = 11$) and CC59 ($n = 10$). The presence of the PVL was detected in 8.62% ($n = 38$) of the MRSA isolates.

Conclusions: The healthcare-associated CC5-MRSA-II lineage (t003, t586, t014) was found to be predominant in the Czech Republic. t586 is a newly emerging *spa* type in the Czech Republic, yet reported rarely in other countries. Our observations stress the need for MRSA surveillance in the Czech Republic in order to monitor changes in MRSA epidemiology.

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the leading causes of healthcare-associated infections in Europe¹ and MRSA has become a substantial burden in terms of healthcare costs, morbidity and mortality.^{2,3}

Since 2000, the Czech Republic has been actively participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), which collects data on the prevalence of MRSA isolates

cultured from blood and CSF. The EARS-Net data showed an overall increase in the prevalence of MRSA among invasive isolates from 4% in 2000 to 13% in 2005 in the Czech Republic (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, EARSS Annual Report 2005, <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/210624001.pdf>). Since then, the prevalence of MRSA in the Czech Republic has remained at the same level, which is slightly lower than the EU population-weighted mean of 16.9%.⁴

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

1 of 10

Downloaded from <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaa404/5942696> by guest on 06 November 2020

The characterization of MRSA isolates is not included in the EARS-net reporting so data on the molecular epidemiology of MRSA are available only from a few time-limited studies. Between 1996 and 1997, the ST239-MRSA-III (Brazilian/Hungarian) clone was found to predominate (80%), followed by the ST247-MRSA-I (Iberian) clone (12%) in 59 isolates investigated.⁵ In a follow-up study conducted in 21 Czech hospitals between 2001 and 2002, from 100 characterized MRSA isolates, ST239-MRSA-III still predominated (74%).⁶

In 2006, the European multicentre study observed a decline in ST239-MRSA-III and CC5/ST225-MRSA-II (t003) was found to be the new dominant clone in the Czech Republic, accounting for 34 (66.67%) of 51 invasive MRSA isolates followed by 7 (13.7%) isolates of t032 (CC22-MRSA-IV, EMRSA-15).⁷ In a subsequent study in 2011, among the 49 submitted MRSA isolates, t003 (61.2%) was still found to be dominant, followed by t014 (14.3%), and both belonged to the same CC5/ST225-MRSA-II clone.⁸

To map the current epidemiology of MRSA in the Czech Republic, MRSA isolates from 11 hospitals were collected. They were characterized by *spa* typing, SCCmec typing, assessed for Panton-Valentine leucocidin (PVL) genes and subject to antimicrobial susceptibility testing.

Materials and methods

Ethics

Ethics approval and informed consent were not required for this study since it was laboratory based. MRSA isolates were obtained as part of routine diagnostic testing and the data were anonymized. The results of the study had no impact on the patients' care.

Study design

Between September 2017 and January 2018, 11 microbiological departments, of six tertiary and five secondary care hospitals, collected non-duplicated (single-patient) MRSA isolates. Both groups of MRSA isolates that were cultured either from the site of infection or from nasal, throat or skin screening swabs (asymptomatic colonization) of inpatients and outpatients were included. The MRSA screening of patients with risk factors for developing an MRSA infection (history of MRSA infection/colonization, ICU admission, surgery, hospitalization abroad or in hospital with high MRSA prevalence) was based on the national standard operating procedure.⁹

The following anonymized data were collected: age, gender, source of isolation and diagnosis associated with MRSA isolation. The origin of the MRSA isolate was defined as hospital associated (HA-MRSA) when the symptoms of an infection and the collection of an MRSA-positive sample happened more than 48h after admission, or, if in the year before MRSA isolation, the patient was hospitalized; any infections that did not meet these criteria were classified as community associated (CA-MRSA).^{7,10}

Identification of isolates

The identification of *S. aureus* isolates was confirmed using a MALDI-TOF mass spectrometer Biotyper v 3.1 (Bruker Daltonics). The presence of the *mecA* gene was determined by quantitative PCR (qPCR) in order to confirm the genetic base of methicillin resistance. Moreover, the genes *lukSF-PV*, encoding PVL, and the gene *arcA*, specific for the arginine catabolic mobile element (ACME), were also detected.^{11,12}

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility to oxacillin, cefoxitin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, tetracycline, rifampicin, ofloxacin, vancomycin, teicoplanin, trimethoprim/sulfamethoxazole, linezolid, tigecycline and ceftaroline was determined by the disc diffusion method and/or the broth microdilution method, depending on the routine practice of the participating microbiological laboratories. Resistance to teicoplanin and linezolid, which was detected by disc diffusion, was confirmed by MIC determination using the gradient diffusion (Oxoid) or broth microdilution method (Erba Lachema). The current EUCAST breakpoints were applied.¹³ Inducible clindamycin resistance was tested by D-test.¹³

Clonal analysis

spa typing was performed according to the protocol published on the website of the European Network of Laboratories for sequence-based typing of microbial pathogens (<http://www.seqnet.org>).¹⁴ To increase the discriminatory power of *spa* typing, PCR-based SCCmec typing was performed as described previously.^{15,16} The *spa* types were assigned using the Ridom StaphType software (Ridom, Germany). To assess the relatedness of detected *spa* types, the BURP (Based Upon Repeat Pattern) algorithm was used. The MLST STs were inferred from the *spa* type using information available in the SpaServer database (<http://spaserver.ridom.de>) or from previously published studies.¹⁷ Information about STs and the relatedness of the *spa* types was used to assign isolates to MRSA clonal complexes (CCs). For 12 selected isolates, MLST was performed as described previously.¹⁸

Statistical analysis

Differences between groups were evaluated using the χ^2 test for categorical variables and the Wilcoxon test for continuous variables. The Spearman correlation coefficient was used to determine the correlation between the age of the patient and the level of resistance of the MRSA isolates (i.e. the number of antimicrobial drugs to which the isolate was resistant). The *P*-values were adjusted for multiple comparisons using the Holm-Bonferroni method and a *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were conducted using the R statistical software version 3.5.1.

Results

Patient data

During a 5 month study, 441 non-duplicated MRSA isolates from 11 hospitals were collected. The geographical location of the participating hospitals and the numbers of MRSA isolates submitted from each hospital are shown in Figure 1 and Table 1.

The median age of patients was 67.06 years (range 1 day to 107 years), 284 (64.40%) of patients were male, 303 (68.71%) were inpatients and 136 (30.84%) were outpatients. For two isolates, the inpatient/outpatient origin was unknown. Inpatients were older than outpatients (median 69 versus 62 years; *P* = 0.006).

MRSA isolates were derived most frequently from skin and soft tissue infections (SSTIs; *n* = 222), asymptomatic colonization (MRSA carriage; *n* = 112), respiratory tract infections (RTIs; *n* = 53), bloodstream infections (BSIs; *n* = 20), urinary tract infections (*n* = 20) and bone and joint infections (*n* = 14). Patients with MRSA asymptomatic colonization were significantly younger compared with patients with MRSA infection (median age 60.5 versus 69 years; *P* < 0.001); there was no significant difference in the origin (*P* = 0.329), inpatient/outpatient setting (*P* = 0.063), level of resistance (*P* = 0.749) or patient's gender (*P* = 0.886). The detailed epidemiological characteristics of the MRSA isolates cultured from

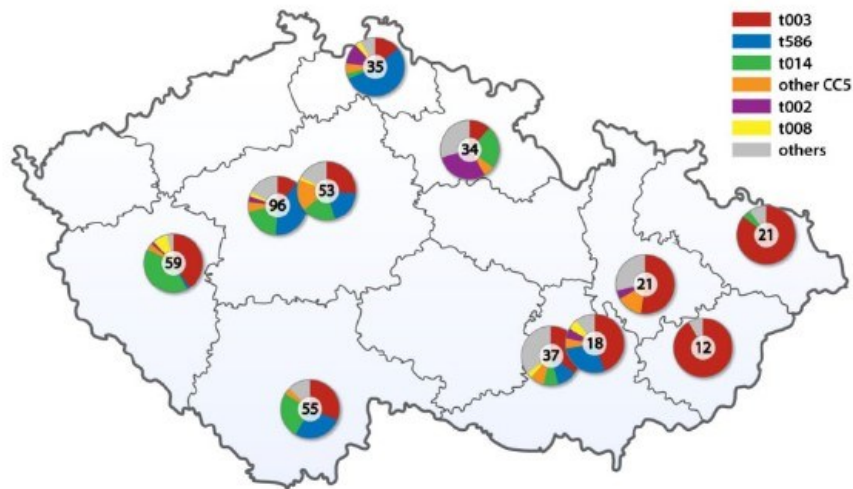


Figure 1. The distribution of participating hospitals in the study. The pie charts show the most common *spa* types identified per hospital. The numbers in the centre represent the number of MRSA isolates sent for molecular characterization. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Table 1. Distribution of MRSA *spa* types and CCs in 11 participating hospitals in the Czech Republic between September 2017 and January 2018

Hospital	CC5					CC8									
	t002	t003	t014	t586	other CC5	t008	other CC8	CC398	CC59	CC30	CC1	CC22	CC20	CC97	Other CCs
A (n=96)	3	11	20	38	5	2	3	2	0	2	1	1	2	1	5
B (n=53)	0	14	10	10	9	1	0	0	3	1	1	0	1	0	3
C (n=18)	1	8	0	5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
D (n=37)	0	13	3	4	3	1	1	2	2	2	1	1	0	0	4
E (n=55)	0	17	14	15	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	3
F (n=34)	10	4	8	0	3	0	1	4	0	1	0	2	0	1	0
G (n=35)	4	5	1	19	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0
H (n=21)	1	11	0	0	3	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0
I (n=59)	1	24	24	1	2	5	0	0	0	0	0	0	1	0	1
J (n=12)	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
K (n=21)	0	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Total (n=441)	20	136	81	92	30	11	6	11	10	7	6	5	5	4	17

infections by CC are shown in Table S1 (available as [Supplementary data](#) at *JAC* Online).

By origin, 70.52% of isolates were HA-MRSA ($n=311$) and 16.78% were CA-MRSA ($n=74$); in 12.70% ($n=56$) the origin of the isolates was unknown. Patients with HA-MRSA were older compared with patients with CA-MRSA ($P<0.001$; median 69 versus 33.5 years) (Table 2).

Antimicrobial susceptibility testing

Except for oxacillin and ceftazidime, the MRSA isolates were found to be frequently resistant to erythromycin (87.98%), clindamycin

(84.81%) and ofloxacin (82.77%). The resistance to clindamycin was inducible in 51 isolates. The resistance of the MRSA isolates to other antimicrobials did not reach 10% except for gentamicin (14.51%) and tetracycline (10.43%). Linezolid resistance, detected by disc diffusion ($n=1$), was confirmed by the gradient diffusion method (MIC=6 mg/L). For the isolate resistant to teicoplanin ($n=1$), an MIC determination by broth microdilution (MIC=0.5 mg/L) did not confirm a resistant phenotype. On average, the isolates were resistant to three of all the tested antimicrobials (excluding ceftazidime and oxacillin) and a highly MDR phenotype was observed in 13 (2.95%) isolates; these isolates were resistant to five or more different antibiotics, including combinations of

Table 2. Statistical analysis of the correlation between MRSA type and patients' characteristics (Czech Republic between September 2017 and January 2018) (n=441)

	CC5 (n=359)		spa type t003 (n=136)		spa type t014 (n=81)		spa type t586 (n=92)		PVL (n=38)	
		P value		P value		P value		P value		P value
Age, years (median)	70	<0.001	71.5	<0.001	72	0.002	67	0.666	31.5	<0.001
infection	71	<0.001	72	0.002	74	0.003	68.5	1.000	31.5	<0.001
colonization	66	0.023	67.5	0.030	69	0.039	12.5	0.009	32	0.354
No. of males (%)	226 (62.95)	0.669	85 (62.50)	1.000	49 (60.49)	0.494	59 (64.13)	1.000	25 (65.79)	0.992
infection	168 (62.67)	0.137	66 (61.11)	0.801	29 (58.00)	0.356	44 (64.71)	1.000	23 (67.65)	0.853
colonization	58 (63.74)	1.000	19 (67.86)	1.000	20 (64.52)	1.000	15 (62.50)	1.000	2 (50.00)	0.623
% of dominant MRSA origin ^a	91.53 (HA)	<0.001	89.42 (HA)	0.054	97.33 (HA)	<0.001	93.83 (HA)	0.008	83.33 (CA)	<0.001
infection	90.63 (HA)	<0.001	88.46 (HA)	0.060	97.83 (HA)	0.003	93.44 (HA)	0.013	84.38 (CA)	<0.001
colonization	93.98 (HA)	<0.001	92.31 (HA)	1.000	96.55 (HA)	0.317	95.00 (HA)	0.591	75.00 (CA)	0.037
% of inpatients	75.49	<0.001	66.91	1.000	90.12	<0.001	82.22	0.018	21.05	<0.001
infection	73.31	<0.001	63.89	0.801	90.00	0.001	78.79	0.074	20.59	<0.001
colonization	83.52	0.031	78.57	1.000	90.32	0.317	91.67	0.471	25.00	0.091
Resistance (median) ^b	3	<0.001	3	0.007	3	<0.001	3	0.111	2	<0.001
infection	3	<0.001	3	0.012	3	<0.001	3	0.315	2	<0.001
colonization	3	<0.001	3	1.000	3	0.098	3	0.471	1	0.037
MRSA colonization isolates (%)	91 (25.35)	0.753	28 (20.59)	0.458	31 (38.27)	0.010	24 (26.09)	1.000	4 (10.53)	0.089

Groups of isolates, determined by molecular characteristics (top row), were compared separately against all remaining isolates for selected demographical characteristics (first column). Differences between groups were evaluated using the χ^2 test for categorical variables and the Wilcoxon test for continuous variables.

$P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Isolates of unknown origin (n=56), age (n=1) and inpatient/outpatient setting (n=2) were excluded from calculation.

^aDominant origin in parentheses.

^bMedian number of antimicrobials to which the isolate was resistant.

erythromycin, clindamycin, gentamicin, ofloxacin, tetracycline, rifampicin, trimethoprim/sulfamethoxazole and linezolid (Table 3). The mean number of antibiotics to which the isolates were resistant differed significantly between HA-MRSA and CA-MRSA (two versus three, $P < 0.001$). The mean number of antimicrobial drugs to which the isolate was resistant also correlated with the patients' advanced age (Spearman's correlation coefficient $\rho = 0.237$; $P < 0.001$). No difference was observed ($P = 0.749$) in antibiotic resistance between colonizing and infecting MRSA isolates (Table 2).

Clonal analysis

For 343 MRSA isolates, the MLST CC was inferred from the spa type using the SpaServer database or taken from previously published data. The designation of the MLST CC could not be determined in 92 isolates of spa type t586, due to an insufficient number of repeats for BURP analysis in this spa type. Thus, we performed MLST in four randomly chosen isolates representing t586 and the results confirmed that t586 belongs to ST225, which is a single-locus variant of ST5 and belongs to CC5. MLST was also performed for six singleton spa types: t073 (CC45/ST45), t457 (CC5/ST225), t665 (CC30/ST1472), t7093 (CC8/ST5712), t16230 (CC88/ST88) and t17929 (CC30/ST1472).

The following SCCmec types were detected through SCCmec typing: I (n=2), II (n=350), IVa (n=23), IVb (n=4), IVc (n=16), IVd (n=1), V (n=22), V_r (n=8) and VI (n=1). Four isolates possessed an unspecified type IV and 10 isolates were non-typeable (Table 4 and Table S2).

CC5-MRSA lineage

From 441 MRSA isolates, 58 different spa types belonging to 18 MLST CCs were identified (Table 4 and Table S2). The clonal structure of the MRSA isolates in our study was dominated by spa types belonging to CC5-MRSA, which constituted 81.41% (n=359) of isolates; CC5-MRSA was represented mainly by the ST225 spa types t003 (n=136; 30.84%; all hospitals), t586 (n=92; 20.86%; 7/11 hospitals), t014 (n=81; 18.37%; 8/11 hospitals) and ST5 spa type t002 (n=20; 4.54%; 6/11 hospitals) (Figure 1). An SCCmec type II was detected in a majority of the CC5-MRSA isolates (n=348), although two isolates were non-typeable. The age of the patients infected or colonized by CC5-MRSA strains was significantly higher than that of patients with MRSA belonging to other CCs ($P < 0.001$; median age 70 versus 33 years). The same pattern was observed when comparing the age of the patients infected or colonized with t003 or t014 only with the age of patients infected or colonized by all other spa types (71.5 versus 64.5 years;

Table 3. Antimicrobial resistance profiles of MRSA isolates according to isolate origin (Czech Republic between September 2017 and January 2018)

Additional resistance to oxacillin and cefoxitin ^a	HA-MRSA		CA-MRSA		Unknown origin		Total (%)
	no. (%)	spa types	no. (%)	spa types	no. (%)	spa types	
ML, OFX	223 (78.25)	t002, t003, t014, t045, t264, t586, t626, t893, t1623, t2379, t3195	19 (6.67)	t003, t008, t457, t586	43 (15.09)	t003, t014, t586, t1282	285 (64.63)
ML, OFX, GEN	37 (86.05)	t002, t003, t014, t586, t3195	4 (9.30)	t002, t005, t014	2 (4.65)	t003, t014	43 (9.75)
No additional resistance	7 (26.92)	t019, t026, t073, t091, t2461	18 (69.23)	t015, t019, t044, t091, t105, t197, t267, t311, t359, t437, t586, t701, t1576, t4179, t17930	1 (3.85)	t148	26 (5.90)
ML, TET	10 (45.45)	t011, t024, t034, t437, t898, t4087	11 (50.00)	t034, t127, t437, t665, t13245, t17929	1 (4.55)	t127	22 (4.99)
ML	6 (40.00)	t008, t664, t1954, t7093	8 (53.33)	t008, t010, t330, t437, t441, t622	1 (6.67)	t002	15 (3.40)
OFX	4 (44.44)	t003, t032, t586, t1282	3 (33.33)	t008, t311, t747	2 (22.22)	t008, t1282	9 (2.04)
TET, GEN	2 (33.33)	t011, t127	3 (50.00)	t011, t084	1 (16.67)	t085	6 (1.36)
ML, OFX, TET	4 (66.67)	t002, t003, t586	0	-	2 (33.33)	t003	6 (1.36)
ML, OFX, RIF	3 (60.00)	t003	0	-	2 (40.00)	t003	5 (1.13)
TET	2 (50.00)	t011, t786	2 (50.00)	t688, t16230	0	-	4 (0.91)
ML, OFX, GEN, RIF, SXT	4 (100.00)	t586	0	-	0	-	4 (0.91)
ML, OFX, TET, GEN	2 (50.00)	t003, t586	2 (50.00)	t127, t014	0	-	4 (0.91)
ML, OFX, SXT	3 (100.00)	t003, t014, t045	0	-	0	-	3 (0.68)
ML, OFX, GEN, RIF	1 (50.00)	t014	0	-	1 (50.00)	t586	2 (0.45)
ML, GEN, RIF	1 (100.00)	t355	0	-	0	-	1 (0.23)
Other combinations ^b	2 (33.33)	t003, t045	4 (66.67)	t005, t037, t127, t267	0	-	6 (1.36)
Total ^c (%)	311 (70.52)		74 (16.78)		56 (12.70)		441 (100.00)

ML, macrolides (erythromycin) and lincosamides (clindamycin); GEN, gentamicin; TET, tetracycline; RIF, rifampicin; OFX, ofloxacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; LZD, linezolid. ^aOf the 393 ML-resistant isolates, 369 were resistant to both erythromycin and clindamycin, and of these 51 showed inducible resistance to clindamycin; 19 isolates were resistant to erythromycin and 5 to clindamycin only. ^bGEN (n = 1; t267; CA-MRSA); ML, OFX, TET, LZD (n = 1; t003; HA-MRSA); ML, OFX, TET, SXT (n = 1; t045; HA-MRSA); ML, TET, GEN (n = 1; t127; CA-MRSA, PVL+); OFX, TET, GEN, RIF (n = 1; t037, CA-MRSA). ^cSpa types of corresponding origin of isolates carrying the genes for PVL toxin are in bold.

Table 4. Clonal structure of MRSA isolates (Czech Republic between September 2017 and January 2018)

CC	No. (%)	Origin ^a (%)	SCCmec types (no.)	Most frequent <i>spa</i> types			Other (no.)
				1st (no.)	2nd (no.)	3rd (no.)	
CC5	359 (81.41)	HA-MRSA (78.27)	II (348); I (2); IV (1); IVa (1), IVc (3); V (1); VI (1); NT (2)	t003 (136)	t586 (92)	t014 (81)	t002 (20); t010 (1); t045 (7); t105 (2); t264 (2); t311 (2); t457 (1); t626 (2); t688 (1); t893 (1); t1282 (3); t1623 (5); t1954 (1); t3195 (2)
CC8	17 (3.85)	CA-MRSA (64.71)	IVa (7); IVc (4); IVd (1), NT (5)	t008 (11)	–	–	t024; t197; t622; t1576; t7093; t17930
CC398	11 (2.49)	HA-MRSA (63.64)	IVa (2); V (9)	t034 (6)	t011 (4)	t898 (1)	–
CC59	10 (2.27)	CA-MRSA (70.00)	IV (1); V (1); V ₁ (8)	t437 (8)	t441 (1)	t13245 (1)	–
CC30	7 (1.59)	CA-MRSA (71.43)	IVa (2); IVb (1); IVc (4)	t019 (4)	–	–	t665; t4179; t17929
CC1	6 (1.36)	CA-MRSA (66.67)	IVa (3); V (3)	t127 (6)	–	–	–
CC22	5 (1.13)	CA-MRSA (80.00)	IVa (3); IV (2)	t005 (3)	t032 (1)	t747 (1)	–
CC20	5 (1.13)	HA-MRSA (80.00)	IVc (4); V (1)	t2461 (2)	–	–	t148; t664; t4087
CC97	4 (0.91)	CA-MRSA (100.00)	IVa (2); IVb (1); V (1)	t267 (2)	t359 (2)	–	–
Other CC ^b	17 (3.85)	–	II (2); IVa (3); IVb (2); IVc (1); V (6); NT (3)	–	–	–	–

NT, non-typeable.

For 343 MRSA isolates the MLST CC was inferred from the *spa* type using the SpaServer database or taken from previously published data. The designation of the MLST CC could not be determined in 92 isolates of *spa* type t586, due to an insufficient number of repeats for BURP analysis in this *spa* type. Thus, we performed the MLST in four randomly chosen isolates representing t586 and the results confirmed that t586 belongs to ST225, which is a single-locus variant of ST5 and belongs to CC5. The MLST was also performed for six singleton *spa* types: t073 (CC45/ST45), t457 (CC5/ST225), t665 (CC30/ST1472), t7093 (CC8/ST5712), t16230 (CC88/ST88) and t17929 (CC30/ST1472).

^aPrevailing origin of isolates from corresponding CC; percentage of isolates with predominant origin stated in parentheses.

^bOther CCs included (no. of isolates; *spa* types): CC6 (1; t701), CC7 (2; t091), CC15 (3; t084, t085), CC45 (4; t015, t026, t073, t330), CC80 (1; t044), CC88 (2; t786, t16230), CC133 (2; t2379), CC152 (1; t355), ST239 (1; t037). For details see Table S2.

$P < 0.001$; 72 versus 66 years; $P = 0.002$, respectively). No significant difference was found between the age of patients with t586 MRSA and the age of patients infected or colonized by other *spa* types (67 versus 67.5 years; $P = 0.666$) (Table 2). Of note, a collection of t586 isolates ($n = 92$) included 14 isolates (11 isolates from colonization, 2 isolates from RTI and 1 isolate from SSTI) from the neonatology department of a single hospital.

In the CC5-MRSA isolates, an HA origin was more frequent than a CA origin ($P < 0.001$; 281/311 of HA-MRSA isolates) and the CC5-MRSA isolates were more often derived from inpatients ($P < 0.001$); CC5-MRSA also formed a significant part of the CA-MRSA cases (35.14%; 26/74). Compared with other *spa* types, the CC5-MRSA *spa* type t014 was associated with asymptomatic colonization ($P = 0.010$; 38.27%; 31/81 isolates versus 22.50%; 81/360 isolates). In addition, no correlations were found for t003 or t586 *spa* types ($P = 0.458$ and 1.000, respectively) (Table 2).

In 268 (81.46%) cases, CC5-MRSA isolates were isolated from an infection; *spa* types t003, t014 and t586 were the cause of 108 (32.83%), 50 (15.20%) and 68 (20.67%) infections, respectively. The distribution of these *spa* types in different kinds of infections corresponded to their relative abundance, except for a notable increase in the frequency of t586 (40%; 8 of 20 BSI isolates) and the absence of t014 among BSI isolates (Table S2).

Other MRSA lineages

The remaining 41 *spa* types (82 isolates) belonged to 17 different CCs. Of the non-CC5 lineages, the most frequently identified was CC8-MRSA (t008, t024, t197, t622, t1576, t7093, t17930), represented by 17 isolates; the CC8-MRSA included 10 PVL-positive isolates; six (t008, t622) of them were also ACME positive and SCCmec type IVa, one t008-MRSA-IVa (PVL+) isolate lacked ACME; three PVL-positive isolates (t008, t197, t17930) carried SCCmec type IVc. Other lineages were represented by 10 isolates (t437, t441, t13245) belonging to CC59-MRSA (SCCmec types IV, V and V₁) and seven isolates belonged to CC30 (t019, t665, t4179, t17929). The ST80-MRSA-IVc was represented by one isolate (t044) and lineages CC398-MRSA-IVa/V ($n = 11$) and CC1-MRSA-IVa/V ($n = 6$) were also identified; other lineages were represented by five or fewer isolates (Table 4).

Collectively, non-CC5 isolates were identified in 48 cases as CA-MRSA (58.54%) and in 30 cases as HA-MRSA (36.59%); in 4 of the isolates (4.88%) the origin was unknown. The CC398-MRSA (2.25%; 7/311) was the second most frequent cause of HA-MRSA cases after the CC5-MRSA isolates. In CA-MRSA, the most frequent non-CC5 lineages were CC8-MRSA (14.86%; 11/74) and CC59-MRSA (9.46%; 7/74). In addition, 12 lineages (CC1, CC6, CC7, CC15,

CC22, CC30, CC45, CC80, CC88, CC97, ST239 and CC398) caused five or fewer CA-MRSA infections each, but together represented a significant portion of the CA-MRSA cases (40.54%; 30/74). In the non-CC5 lineages, the outpatients (60.98%, 50 isolates) were found to be more affected than inpatients ($P < 0.001$).

PVL

The presence of PVL was detected in 38 isolates. Of these, 31 were from SSTIs, 4 were detected through screening, 2 originated from blood cultures and 1 originated from an RTI (pneumonia). The age of the patients from whom the PVL-positive isolates were recovered differed significantly from the age of patients infected by PVL-negative isolates (median 31.5 versus 69 years; $P < 0.001$). PVL-positive isolates were more frequently CA-MRSA ($P < 0.001$; 30/38 isolates) and demonstrated resistance to fewer antimicrobial drugs ($P < 0.001$; two antibiotics on average) (Table 2). There was no significant difference in the gender distribution between PVL-positive and -negative isolates ($P = 0.992$). In PVL-positive MRSA, the most frequently identified clones were t008-CC8-MRSA-IVa/IVc ($n = 7$) and t437-CC59-MRSA-V/V_T ($n = 7$) and these were detected in 6 and 5 of 11 participating hospitals, respectively. SCCmec types detected among PVL-positive isolates included IV ($n = 1$; t311), IVa ($n = 12$; t005, t008, t622, t665, t17929), IVb ($n = 2$; t019, t701), IVc ($n = 11$; t002, t008, t019, t044, t105, t197, t4179, t17930), V ($n = 4$; t034, t127, t355, t437) and V_T ($n = 8$; t437, t441, t13245). The spa types of all PVL-positive isolates are summarized in Table 3.

Discussion

Our study aimed to gain data on the clonal structure of MRSA circulating in the Czech Republic. This study presents a large collection of 441 MRSA isolates collected by 11 hospitals covering a substantial area of the country during a 5 month period.

Our results confirmed the continuing dominance of CC5/ST225-MRSA-II (mainly t003, t586 and t014) in Czech hospitals in 2017 and patterns of MRSA epidemiology similar to other Central European countries. In our study, the prevalence of t003 (up to 90% of isolates) was found to be the highest in the Moravian/Silesian regions (East, North East) and, given that t003 was found recently to be the most common spa type among MRSA isolates in southern Poland,¹⁹ it suggests that there may be some cross-border transmission. The CC5-MRSA-II clone (t002, t003, t014, t626, t10303), which makes up 37.2% of all MRSA isolates, was dominant in south-east Austria in 2012.²⁰ In a study investigating ICU patients from eight European countries, the spa types t003 and t002 were also found frequently among isolates from Slovenia, Luxemburg and Greece²¹ as well as in patients in the Czech Republic suffering from cystic fibrosis.²² A recent study of 62 invasive MRSA isolates, collected between 2010 and 2016 in one Czech tertiary hospital, confirmed the continuing presence of the clone in Czech healthcare facilities since all but one isolate belonged to CC5/ST225-MRSA-II (t002, t003, t014 and related).²³

When the data on the epidemiology of MRSA were compared with those of countries neighbouring the Czech Republic, the CC22-MRSA (t032) clone was found to be predominant in a tertiary hospital in Saxony, Germany, where it constituted almost 50% of MRSA isolates in 2015 and 2016,²⁴ and in Austria, where a

significant increase of this clone was detected in 2012;²⁰ in our study only one isolate of CC22 MRSA (t032) was found.

In our study, we identified an emergence of the spa type t586 that belongs to the CC5/ST225-MRSA clone; it is an interesting observation since until now isolates of t586 were reported rarely in MRSA isolates from studies conducted in other countries, such as Germany, Belgium, Sweden, New Zealand, the USA and China.²⁵⁻³⁰ In 2012, a single t586 was identified among 38 isolates during an investigation into an outbreak of MRSA cases in a Czech secondary hospital.³¹ In our current study, the occurrence of t586 was highly variable among hospitals. Even though t586 was not detected in eastern and western parts of the country, it was frequently found in central Bohemia and in neighbouring southern and northern regions of the country. We suggest that the t586 is probably a descendant of t003, t014 or a genetically related spa type, because they belong to the same ST225 and possess the same SCCmec type II; however, the independent introduction of t586 from abroad and its subsequent spread cannot be ruled out without the use of highly discriminatory methods like WGS. Similar to t003 and t014, t586 was associated with an HA origin or inpatients, but it is worth noting that its association with patients of a higher age was not confirmed. This could be explained, in part, by an endemic presence of t586 in the neonatology department in one of the participating hospitals. Moreover, t586 was also the most frequent cause of BSIs (8 from 20 cases), underlining its possible higher virulence; however, the total number of BSI isolates was low and further epidemiological monitoring is needed.

Eleven isolates belonged to the CC398 (t011, t034). CC398 was reported previously in more than 10% of MRSA cases in European countries with a high livestock density, such as Belgium, Denmark, Spain, the Netherlands and Slovenia,³² although data from the Czech Republic were not included. However, the later Czech study identified CC398 as dominant (150 of 159 isolates) in MRSA collected from livestock and food of animal origin.³³ CC398 isolates are frequently resistant to tetracycline, a drug used frequently in the veterinary sector,³⁴ and this was also found in all CC398 isolates in this study, but CC398 isolates are increasingly being detected in people who have had no contact with livestock.³⁵

In our analysis of CA-MRSA, the isolates belonged more frequently to the CC8-MRSA lineage. A variant of this lineage, known as the USA300 clone, often carries PVL genes, SCCmec type IV and ACME and, after its emergence in the 1990s, completely changed MRSA epidemiology in the USA. An epidemic of USA300 led to an increase in MRSA infections of community origin in the USA³⁶ and within a few years USA300 replaced older HA-MRSA clones and, in different US medical centres, became the leading cause of SSTIs and invasive infections caused by MRSA.³⁷ In our study, CC8-MRSA was the most frequent non-CC5 lineage found in 7 of 11 participating hospitals. In the 10 PVL-positive CC8-MRSA isolates identified in our study, four different resistance profiles were detected and 6 isolates (originating from five hospitals) had the characteristics of USA300 (PVL+, SCCmec type IVa, ACME+). Observed variability suggests independent introduction rather than epidemic spread of CC8-MRSA. The repeated introduction of the USA300 clone into Europe from North America, where its prevalence is high, was also suggested by a study analysing the genetic relatedness of USA300 isolates collected across Europe.³⁸ From 2002 to 2009, 21 CA-MRSA isolates were collected in the Czech Republic and CC8-MRSA ($n = 13$) was found to be the most frequent clone. The same study

also reported that ST80-MRSA (i.e. the European CA-MRSA) was the second most frequent, with a total of five isolates; however, in our study ST80-MRSA-IVc was only found in one isolate (t044).³⁹

CC59-MRSA was the second most frequent CA-MRSA lineage, with 10 isolates that were collected in five different hospitals; in 7 isolates, CA origin was recorded. CC59-MRSA is represented by the Asian CA-MRSA (t437 and related, PVL+, SCCmec type V or V₇), a high-risk epidemic clone with a high prevalence of CA-MRSA in China,⁴⁰ but it has also been detected globally.¹⁷ The occurrence of CC59 across Europe was confirmed by a study of t437 (n = 147) isolates from 11 European countries collected during a 10 year period. The high genetic similarity between t437 isolates from Europe and China, where this strain is endemic, pointed to the recent introduction of CC59 from Asian countries to Europe, and its rapid spread.⁴¹

The CA-MRSA cases in our study were, in general, associated with patients of a lower age, the outpatient setting, a lower number of tested antibiotics to which the isolate was resistant, and the presence of PVL. Similar findings were reported previously by David and Daum.³⁷

It is worth noting that a significant portion of the CA-MRSA cases in our study were caused by HA-MRSA lineage CC5-MRSA, which could be explained partly, in some cases, by an unreported link to healthcare exposure. However, the blurring of the lines between classical HA-MRSA and CA-MRSA lineages has already been reported to be the result of an increasing exposure of the general population to healthcare.⁴² On the other hand, detection of CC8-MRSA, CC59-MRSA and CC398-MRSA clones in our study could indicate the successful establishment of these epidemic clones in in both a community and a healthcare environment in the Czech Republic. The replacement of HA-MRSA clones by clones of CA origin in hospitals was observed in multiple studies and was followed by changes in MRSA epidemiology that affect the severity and types of infections, age groups, antibiotic treatment, etc.^{36,43,44} This trend is supported theoretically by mathematical modelling and takes into account the growing reservoir of CA-MRSA in the community and the constant influx of CA-MRSA clones into hospitals.⁴⁵ Further, it stresses the need for the regular surveillance of the clonal structure of MRSA on a national and international level in order to track and analyse epidemiological changes that could have a significant impact on infection prevention and treatment strategies.

Limitations of the study

This study has a number of potential limitations. The susceptibility of isolates to glycopeptide antibiotics (vancomycin and teicoplanin) was tested using the disc diffusion method and only isolates showing a resistant phenotype were retested by the gradient diffusion method. Although glycopeptide resistance is rare in *S. aureus*, the use of the disc diffusion method is no longer recommended since the method cannot reliably detect glycopeptide resistance.³³ Isolates were assigned to *S. aureus* CCs based on the detected *spa* type; however, in cases of rare *spa* types and STs, or in lineages where large genome recombination has occurred, such as in ST239, ST2249, ST34 and ST42,^{46,47} the CC assignment based on *spa* type may be less reliable. In addition, SCCmec typing was performed in order to increase the discriminatory power of *spa* typing. The results of our study could have been influenced by the

indiscriminate inclusion of isolates, including those originating from possible outbreaks, which led to an overrepresentation of specific strains in our data. However, based on the available data, an accurate exclusion of outbreak isolates was not possible.

Conclusions

The healthcare-associated CC5-MRSA lineage (t003, t586, t014) was found to be predominant in the Czech Republic. Interestingly, t586 is a newly emerging *spa* type that so far has been reported only rarely in the Czech Republic and other countries. Our observations stress the need for MRSA surveillance in the Czech Republic in order to monitor changes in MRSA epidemiology.

Acknowledgements

Preliminary results of this study were presented at the Eighteenth International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections in Copenhagen, 2018 (abstract no. P034), and the Twenty-Ninth European Congress of Clinical Microbiology in Amsterdam, 2019 (abstract no. L0062).

We would like to thank to Dr Lenka Havlinova from the Liberec Hospital for her support in this study.

We would also like to acknowledge the ESCMID study group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS) for continuing to increase our knowledge and awareness of infections caused by *S. aureus*.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant no. 17-30460A). All rights reserved.

Transparency declarations

All authors: none to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Suetens C, Latour K, Kärki T et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill* 2018; **23**: pii=1800516.
- Köck R, Becker K, Cookson B et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 2010; **15**: pii=19688.
- Cassini A, Högberg LD, Plachouras D et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: 56–66.
- ECDC. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017>.

- 5 Melter O, Santos Sanches I, Schindler J et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2798–803.
- 6 Melter O, Aires De Sousa M, UP et al. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4998–5005.
- 7 Grundmann H, Aanensen DM, Van Den Wijngaard CC et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010; **7**: 1–15.
- 8 Grundmann H, Schouls LM, Aanensen DM et al. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *Euro Surveill* 2014; **19**: pii=20987.
- 9 Bergerova T, Hedlova D, Jindrak V et al. Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních. *Zpravy ČEM* 2006; **15**Suppl 1: 1–16.
- 10 Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S et al. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 236–42.
- 11 Okalie CE, Wooldridge KG, Turner DP et al. Development of a new pentaplex real-time PCR assay for the identification of poly-microbial specimens containing *Staphylococcus aureus* and other staphylococci, with simultaneous detection of staphylococcal virulence and methicillin resistance markers. *Mol Cell Probes* 2015; **29**: 144–50.
- 12 Diep BA, Gill SR, Chang RF et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006; **367**: 731–9.
- 13 EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 9.0, 2019.
- 14 Hamsen D, Claus H, Witte W et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5442–8.
- 15 Kondo Y, Ito T, Ma XX et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *car*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 264–74.
- 16 Zhang K, McClure JA, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 2012; **26**: 218–21.
- 17 Monecke S, Coombs G, Shore AC et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; **6**: 1–24.
- 18 Enright MC, Day NPJ, Davies CE et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1008–15.
- 19 Chmielarczyk A, Pomorska-Wesolowska M, Szczypka A et al. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from different types of infections from patients hospitalized in 12 regional, non-teaching hospitals in southern Poland. *J Hosp Infect* 2017; **95**: 259–67.
- 20 Zarfel G, Luxner J, Folli B et al. Increase of genetic diversity and clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in South-East Austria. *FEMS Microbiol Lett* 2016; **363**: 1–6.
- 21 Hetem DJ, Derde LPG, Enpel J et al. Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 45–52.
- 22 Tkadlec J, Vařeková E, Pantuček R et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Czech cystic fibrosis patients: high rate of ribosomal mutation conferring resistance to MLSB; antibiotics as a result of long-term and low-dose azithromycin treatment. *Microb Drug Resist* 2015; **21**: 416–23.
- 23 Neradova K, Fridrichova M, Jakubu V et al. Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream cultures at University Hospital in the Czech Republic. *Folia Microbiol* 2020; **65**: 615–22.
- 24 Monecke S, Jatzwauk L, Müller E et al. Diversity of SCCmec elements in *Staphylococcus aureus* as observed in south-eastern Germany. *PLoS One* 2016; **11**: 1–24.
- 25 Cuny C, Layer F, Werner G et al. State-wide surveillance of antibiotic resistance patterns and *spa* types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures in North Rhine-Westphalia, 2011–2013. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 750–7.
- 26 Blumental S, Deplano A, Mendonca R et al. Dynamic pattern and genotypic diversity of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal carriage in healthy pre-school children. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1517–23.
- 27 Borjesson S, Matussek A, Mellin S et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? *J Appl Microbiol* 2010; **108**: 1244–51.
- 28 Williamson DA, Roberts SA, Ritchie SR et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Zealand: rapid emergence of sequence type 5 (ST5)-SCCmec-IV as the dominant community-associated MRSA clone. *PLoS One* 2013; **8**: 1–7.
- 29 Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Uhl JR et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and *spa* typing. *PLoS One* 2017; **12**: 1–12.
- 30 Li S, Sun S, Yang C et al. The changing pattern of population structure of *Staphylococcus aureus* from bacteremia in China from 2013 to 2016: ST239-030-MRSA replaced by ST59-t437. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1–9.
- 31 Stock NK, Petrás P, Melter O et al. Importance of multifaceted approaches in infection control: a practical experience from an outbreak investigation. *PLoS One* 2016; **11**: 1–15.
- 32 Kinross PTN, Petersen A, Skov R et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Euro Surveill* 2017; **22**: pii=16-00696.
- 33 Tegegne HA, Koláčková I, Karpíšková R. Diversity of livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Med* 2017; **10**: 929–31.
- 34 Tegegne HA, Florianová M, Gelbičová T et al. Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk of cows, sheep, and goats. *Foodborne Pathog Dis* 2019; **16**: 68–73.
- 35 Larsen J, Petersen A, Sorum M et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Euro Surveill* 2015; **20**: 1–9.
- 36 David MZ, Cadilla A, Boyle-Vavra S et al. Replacement of HA-MRSA by CA-MRSA infections at an academic medical center in the midwestern United States, 2004–5 to 2008. *PLoS One* 2014; **9**: 1–8.
- 37 David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 616–87.
- 38 Glaser P, Martins-Simoes P, Villain A et al. Demography and intercontinental spread of the USA300 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage. *mBio* 2016; **7**: e02183–15.
- 39 Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogačka A et al. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One* 2012; **7**: 1–10.
- 40 Geng W, Yang Y, Wu D et al. Molecular characteristics of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **58**: 356–62.

- 41 Glasner C, Pluister G, Westh H et al. *Staphylococcus aureus* spa-type t437: identification of the most dominant community-associated clone from Asia across Europe. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 163.e1-8.
- 42 Bal AM, Coombs GW, Halden MTG et al. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: blurring of the traditional definitions. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; **6**: 95-101.
- 43 Nikolaras GP, Papaparaskevas J, Samarkos M et al. Changes in the rates and population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bloodstream infections: a single-centre experience (2000-2015). *J Glob Antimicrob Resist* 2019; **17**: 117-22.
- 44 Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 2011; **79**: 189-93.
- 45 D'Agata EMC, Webb GF, Horn MA et al. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 274-84.
- 46 Nimmo GR, Steen JA, Monecke S et al. ST2249-MRSA-III: a second major recombinant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone causing healthcare infection in the 1970s. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 444-50.
- 47 Thomas JC, Godfrey PA, Feldgarden M et al. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* sequence type 34 (ST34) and ST42 hybrids. *J Bacteriol* 2012; **194**: 2740-1.

The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in outpatients and inpatients in Slovakia: Emergence of USA300, a pandemic CA-MRSA clone

M. BRAJEROVA¹, A. SOLTESOVA², J. MARCISIN³, P. DREVINEK¹, M. KRUTOVA¹, J. TKADLEC¹.

¹Department of Medical Microbiology, Charles University 2nd Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

²Department of Clinical Biochemistry, Haematology and Microbiology, Unilabs Slovensko, s.r.o., Roznava, Slovakia

³Department of Clinical Microbiology, Unilabs Slovensko, s.r.o., Stropkov, Slovakia



INTRODUCTION

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a leading cause of healthcare-associated infections. Additionally, in last decades spread of community associated (CA-MRSA) clones became a serious problem. Understanding the dynamics of clonal expansion and displacement is key factor when implementing preventing strategies. Unfortunately information about molecular epidemiology of MRSA in central-eastern and eastern Europe is scarce. In our previous study we described MRSA epidemiology in Czech Republic¹ and recently we focused on the MRSA epidemiology in neighboring country, Slovakia.

AIM

To characterize epidemiological structure of MRSA strains currently circulating in healthcare and community in the Slovakia.

METHOD

- Resistance to oxacillin/cefoxitin and other antistaphylococcal antibiotics was tested by the disk diffusion method
- The presence of *mecA* and *mecC* genes, genes encoding Panton-Valentine Leucocidin (PVL), and arginine catabolic mobile element (ACME) specific for the USA300 clone, were detected by PCR
- SCC*mec* and *spa*-typing of the isolates were performed. Isolates were assigned to the known multilocus sequence type clonal complexes (CC) based on the corresponding *spa*-type

RESULTS

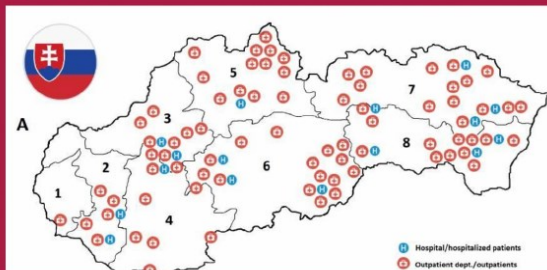


Figure 1: Localization of participating hospitals and outpatient departments
Between January 2020 and March 2020, 416 single-patient MRSA isolates were collected in Slovakia from: 167 inpatients hospitalized in 16 hospitals; 249 outpatients attending outpatient hospital departments; and medical centres in 77 cities.

CONCLUSIONS

To the best of our knowledge this is the first study on molecular epidemiology of MRSA in Slovakia. The study confirmed the presence of epidemic healthcare associated clones encountered in neighboring countries (CC5-MRSA-II, CC22-MRSA-IV) but we also found a high number of isolates of the global pandemic CA-MRSA clone, USA300 (CC8-MRSA-IV; PVL+; ACME+), among inpatients and outpatients. Taking into account the data from countries surrounding Slovakia, the high prevalence of the USA300 clone is highly unexpected and warrants further investigation and also rise the question about role of the Slovakia in epidemiology of USA300 in Europe

REFERENCES: ¹Tkadlec, J. et al. The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Czech Republic. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2021), 76(1): 55-64.

- One *mecC* positive isolate (CC130, t7603)

- PVL detected in 73 isolates:

- CC8-MRSA-IVa; ACME+ (n=56)

- CC5-MRSA-IV (t311; t3235) (n=13)

- Other: CC80-MRSA-IVc (t044) (n=2); CC121-MRSA-V (n=1); CC88-MRSA-IV (n=1)

Resistance

- Erythromycin 77% (n=321)

- Clindamycin 64% (n=267)

- in 45% inducible (n=119)

- Ciprofloxacin 63% (n=261)

- Fusidic acid 4% (n=18)

- Oxacillin/cefoxitin only (n=54)

- Gentamicin, tetracycline, rifampin

- rare less than 4%

Clone	Hospitalized (%)	Outpatients (%)	Total (%)
CC5-MRSA-II	54 (32.35)	50 (20.08)	104 (25.00)
CC22-MRSA-IV	47 (28.14)	28 (11.24)	75 (18.03)
CC8-MRSA-IV	17 (10.18)	48 (19.28)	65 (15.63)
CC45-MRSA-IV	13 (7.78)	41 (16.47)	54 (12.98)
CC5-MRSA-IV	20 (11.98)	29 (11.65)	49 (11.78)
CC5-MRSA-I	7 (4.19)	32 (12.85)	39 (9.38)
Other clones	9 (5.39)	21 (8.43)	30 (7.21)
Total	167	249	416

Table 1: Distribution of MRSA clones among hospitalized patients and outpatients

CC8-MRSA-IV

- t008/t622; PVL+; ACME+; IVa (n=56)
- t008; PVL-; ACME+; IVa (n=5)
- t008; PVL-; ACME-; IVc (n=2)
- t024/t656; PVL-; ACME-; IV (n=2)

USA300

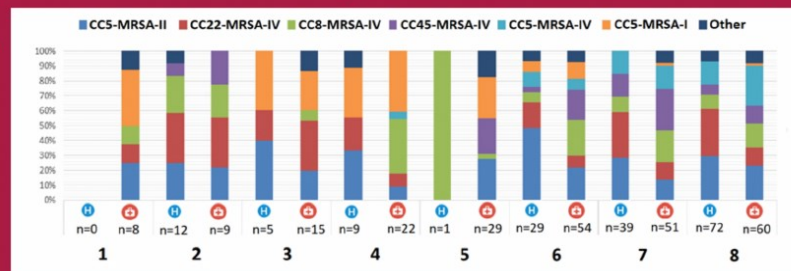


Figure 2: Proportion of major MRSA lineages in regions of Slovakia

CONTACT INFORMATION

jan.tkadlec@lfmotol.cuni.cz