

METICYLINOOPORNE SZCZEPY *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS* WYSTĘPUJĄCE U PSÓW JAKO POTENCJALNY REZERWUAR GENU *MECA*

Dorota Chrobak, Magdalena Kizerwetter-Świda, Magdalena Rzewuska, Marian Binek*

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Źródło i sposób powstawania szczepów meticylinoopornych. 3. Znaczenie kliniczne *Staphylococcus intermedius*. 4. Indukcja lekooporności *Staphylococcus intermedius*. 5. Przenoszenie się szczepów *Staphylococcus intermedius* między psami i ludźmi. 6. Występowanie genu *mecA* u *Staphylococcus intermedius*. 7. Podsumowanie

Pet-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* (PA-MRSI) as a potential reservoir for *mecA* gene

Abstract: Veterinary surveillance programs on the usage of antimicrobial agents and the occurrence of resistance in bacteria focus mainly on animal husbandry and generally do not provide data on companion animals. The increasing worldwide use of antimicrobial agents in small animal veterinary practice contributes to the spread of antimicrobial resistance. The close, sometimes physical, relationship between dogs and cats and human beings might present substantial risk that resistant bacteria or resistance genes could be transferred from pet animals to humans. The emergence and dissemination of antimicrobial resistance among staphylococci is an important problem in human and veterinary medicine. An alarmingly high frequency of methicillin resistance in clinically isolated *Staphylococcus intermedius* strains has been observed worldwide. Zoonotic transmission of both methicillin-susceptible and methicillin-resistant *S. intermedius* from dogs to humans is already well recognized. The genetic determination of methicillin resistance is mediated by vectors termed staphylococcal cassette chromosome which contain the *mecA* gene. The high prevalence of this resistance vector in companion animals can affect the horizontal transmission from dogs to humans, since the pet-acquired methicillin resistant *S. intermedius* may be a potential reservoir for these elements.

1. Introduction. 2. The origin and reservoirs of SCC_{mec}. 3. Clinical significance of *S. intermedius* in human and veterinary medicine. 4. Induction of antimicrobial resistance in *S. intermedius*. 5. Zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from canine pets to humans. 6. *mecA* gene harboured by *S. intermedius*. 7. Summary

Słowa kluczowe: gen *mecA*, lekooporność, *Staphylococcus intermedius*, transmisja, zwierzęta

Key words: *mecA* gene, drug resistance, *Staphylococcus intermedius*, transmission, companion animals

1. Wstęp

Pojawiająca się coraz częściej oporność drobnoustrojów na coraz większe grupy leków doprowadziła do zmniejszenia skuteczności leczenia, szczególnie zakażeń spowodowanych szczepami wieloopornymi (MDR-multidrug-resistant), czy wręcz superopornymi (XDR-extensively drug-resistant) [15]. Co więcej okazało się, że zjawisko wielooporności nie dotyczy tylko szczepów szpitalnych, jak początkowo sądzono, ale również drobnoustrojów występujących u ludzi i zwierząt niemających ze środowiskami szpitalnymi styczności. Rozprzestrzenianie się na masową skalę opornych drobnoustrojów na całym świecie i w związku z tym, ograniczenie możliwości terapeutycznych, czasami do użycia jednego leku uznane zostało za plagę naszych czasów. Opisywane zjawiska dostrzeżone przez międzynarodowe organizacje odpowiedzialne za ochronę zdrowia i politykę zdrowotną, jak Światowa

Organizacja Zdrowia, Parlament Europejski i Komisja Europejska uznane zostały za problem zdrowia publicznego i wyzwanie globalne. Jednym z przykładów opornych i wieloopornych bakterii są gronkowce meticylinooporne, a wśród nich MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [3]. Meticylinooporność u gronkowców została opisana po raz pierwszy w 1960 r., wkrótce po wprowadzeniu tego leku do praktyki klinicznej w szpitalach. Od tego czasu odnotowuje się udział meticylinoopornych gronkowców w wywoływaniu zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych u pacjentów na całym świecie. Niebezpieczeństwo związane z pojawianiem się szczepów MRSA wynika z ich oporności na wszystkie antybiotyki β-laktamowe, w tym również skojarzone z inhibitorami β-laktamaz oraz karbapenemy [35].

Oporność *Staphylococcus intermedius* na metycylinę (MRSI – methicillin-resistant *S. intermedius*) opisano po raz pierwszy w latach siedemdziesiątych w USA.

* Autor korespondencyjny: Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8; tel.: 22 5936068; fax: 22 5936066; e-mail: marian_binek@sggw.pl

W późniejszym czasie odnotowano obecność takich szczepów również w Europie. Bliższej charakterystyce MRSI poddano dopiero w pierwszych latach XXI i okazało się, że wiele z nich wykazuje oporność na większość antybiotyków, przenosi się na człowieka i rozprzestrzenia klonalnie [36]. Zjawisko to pozostaje trochę na uboczu europejskich i krajowych programów zajmujących się monitorowaniem czynników zoonotycznych u zwierząt gospodarskich, oceną lekowrażliwości izolowanych od tzw. „food animals” bakterii. Jest jednak dostrzegane przez epidemiologów nie tylko, jako potencjalne zagrożenie dla zdrowia zwierząt, ale również ludzi. Zakłada się, że może dojść do powstania nowej grupy gronkowców metycylinoopornych tzw. PA-MRS (pet-acquired methicillin-resistant staphylococci) na podobieństwo *de-novo* powstałych CA-MRSA (community aquired MRSA), które zostały utworzone w wyniku pobrania przez MSSA (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) kasety, w której znajduje się gen kodujący oporność na metycylinę SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) [26].

Szczepy metycylinoopornych gronkowców, wyizolowane od człowieka, które zostały nabyte od zwierząt domowych określa się jako szczepy PA-MRS (pet-acquired methicillin-resistant staphylococci) [8].

2. Źródło i sposób powstawania szczepów metycylinoopornych

Kasety chromosomowe, podobnie jak wyspy patogenności, plazmidy, sekwencje insercyjnej, czy transpozony są jednymi z ruchomych struktur genomowego DNA, które podlegają wymianie między szczepami danego gatunku a także między gatunkami i dalej spokrewnionymi bakteriami. Niosą geny oporności i zjadliwości. Bakterie, które przyjmują kasetę uzyskują nowe cechy. Fragment DNA o wielkości 21–67 tys. pz stanowi kasetę u *Staphylococcus aureus* (SCC), w której zlokalizowany jest gen *mecA* warunkujący oporność na metycylinę. Kasety zawierające *mec* (SCC*mec*), jak i niezawierające tego genu (non-*mec*SCC) są charakteryzowane i klasyfikowane na podstawie różnic w sekwencjach całego kompleksu genów tego odcinka, wśród nich otaczających gen *mecA* genów rekombinaz (*ccr*) uczestniczących w przemieszczaniu się kasety [2, 10, 22, 25]. Dodatkowo kasetę może zawierać gen lub geny kodujące oporność na antybiotyki. Na podstawie kombinacji sekwencji kompleksu genów *ccr* i *mec* wyróżnia się pięć typów (I–V) natomiast na podstawie różnic w regionie J (fragment między *ccr* i *mec*) kilka podtypów (IVa, IVb, IVc i IVd) kaset SCC*mec*. Dodatkowo na podstawie obecności lub braku innych sekwencji w obrębie genu *mec* można wyróżnić warianty głównych typów kaset i tak np. wariant IA cha-

rakteryzuje się obecnością pUB110 zlokalizowanego poniżej kompleksu *mec* a wariant IIIA brakiem pT181 i flankujących elementów IS431 [24, 27, 33]. Zwykle te dodatkowe elementy zawierają geny oporności na antybiotyki, np. obecność Tn4001 w podtypie IVc powoduje oporność na większość aminoglikozydów za wyjątkiem arbekacyny. Tn554 występujący u szczepów z II-gim typem kasety koduje oporność na erytromycynę i spektynomycynę. pUB110 oflankowany parą IS431 koduje oporność na kanamycynę i tobramycynę/bleomycynę, natomiast zintegrowany z pT181 warunkuje oporność na tetracyklinę. U szczepów z I, IV i V typem kasety nie stwierdza się zwykle innych genów oporności niż warunkującego oporność na metycylinę. Zdarzają się również szczepy, które nie typują się w oparciu o wyżej przedstawione kryteria (nontypeable SCC*mec*). Gronkowcowa kasetę chromosomowa może nie zawierać genu oporności na metycylinę (SCC non-*mec*), natomiast mogą być w niej obecne geny kodujące czynniki zjadliwości, jak np. polisacharyd otoczkowy 1, warunkujący zwiększoną odporność na fagocytozę, geny kodujące białka uczestniczące w biosyntezie kwasów teichowych i inne [18].

Źródłem SCC*mec* są prawdopodobnie gronkowce koagulazoujemne. Nie wyklucza się, że to u nich doszło do połączenia się przenoszonych horyzontalnie wśród bakterii Gram-dodatnich genów *ccr* i *mec*. *Staphylococcus sciuri* uważany jest za ewolucyjnego prekursora nowego białka PBP2a. Lokus *mec* może występować w sposób niezwiązany z genami *ccr* zarówno u MRSA, jak i gronkowców koagulazoujemnych i może być przenoszony niezależnie od nich. Szczepy, u których nie udaje się określić typu kasety zwykle albo zawierają nowe geny *ccr* albo w ich SCC*mec* znanych genów nie ma. Hipoteza o przeniesieniu SCC*mec* ze *Staphylococcus epidermidis* do *Staphylococcus aureus* poparta jest licznymi dowodami, wśród nich niemal 100% homologią kaset SCC*mec* u wielu analizowanych szczepów, jak również analizą, z której wynika, że metycylinooporność jest częstą cechą występującą u *S. epidermidis* i rzadko u *S. aureus*. W latach 70-tych XX wieku, IV typ SCC*mec* występował dość powszechnie wśród *S. epidermidis* i dopiero w latach 80-tych tę kasetę wykryto wśród *S. aureus*, co może wskazywać, że to właśnie *S. epidermidis* były rezerwuarem znajdujących się sekwencji, które przekazywane były w całości lub we fragmentach podlegających rekombinacjom z SCC *S. aureus*. Nie brakuje również sugestii, że źródłem SCC*mec* są same MRSA, które przekazują ten element kolejnym szczepom. Olbrzymia różnorodność i zmienność SCC wskazuje, że podlega ona ustawicznej rekombinacji, przez co być może realizuje się strategia przetrwania obdarzonych nią gronkowców w środowiskach selekcyjnych. Puła genów występująca u lokalnej mikroflory może być źródłem,

z którego gronkowce uzupełniają te, które konieczne są do ich przeżycia. Nowe warianty SCC*mec*, które pojawiają się w danym regionie, czy kraju często mają lokalne allotypy kompleksu *ccr*. Takie obserwacje sugerują powstawanie *de-novo* szczepów meticylioopornych w wyniku przeniesienia kasety od gronkowców koagulazoujemnych do różnych szczepów *S. aureus* meticylinowrażliwych (MSSA), w tym również niosących geny kodujące leukocydynę Panton-Valentine (PVL – Panton-Valentine leucocidin). Zakłada się, że tak mogło dojść do niezależnego powstania w wielu miejscach CA-MRSA. Powstałe szczepy charakteryzują się zwykle wrażliwością (za wyjątkiem β-laktamów) na wiele chemioterapeutyków. Szczepy te wydają się być jednak bardziej zjadliwe od HA-MRSA (health-care-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) i występują w środowisku pozaszpitalnym powodując zakażenia u osób młodych, których nie dotyczą czynniki ryzyka typowe dla zakażeń szpitalnymi. Zwiększona zjadliwość szczepów CA-MRSA wynika ze zdolności wytwarzania przez wiele z nich cytotoksyny leukocydyny Panton-Valentine. Cecha ta uwarunkowana jest genami *lukS-PV* i *lukF-PV* [7]. Oprócz udziału w wywoływaniu typowych dla gronkowców zmian chorobowych, takich jak ropnie, liszajec, czyrączność czy zakażenie tkanki podskórnej, mogą być przyczyną chorób o gwałtownym przebiegu, jak martwicze zapalenie powięzi, martwicze zapalenie płuc z towarzyszącą bakteriecią, która może się rozwinąć w posocznicę piorunującą prowadzącą zwykle do śmierci w przeciągu 24–48 godzin.

Poszczególne typy kaset i ich warianty rozprzestrzeniają się zatem zarówno na drodze klonalnej wraz z niosącymi je szczepami oraz w sposób horyzontalny w wyniku nieznanego bliżej mechanizmu transferu genów. Na częstość wymiany genów pomiędzy organizmami mają wpływ wzajemne relacje pomiędzy mikroorganizmami, selektywne oddziaływanie środowiska i gospodarza, ale również takie mechanizmy, jak np. koniugacja, transformacja czy transdukcja, za pomocą, których dochodzi do przekazywania określonych sekwencji.

SCC*mec* typu IV stwierdzane są coraz częściej w wielu środowiskach, co może sugerować ich wyższą mobilność w porównaniu do większych typów kaset. Jest dominującym typem wśród gronkowców CA-MRSA i rzadko występuje u szczepów szpitalnych HA-MRSA. Większość epidemicznych szczepów HA-MRSA zawiera SCC*mec* typu I, II lub III. Pojawienie się szczepów CA-MRSA poza środowiskiem szpitalnym wskazuje na inny mechanizm indukcji oporności niż selektywne oddziaływanie antybiotyku, jak to ma miejsce w przypadku szczepów HA-MRSA.

Molekularne podstawy oporności *S. aureus* na meticylinę zostały dość dobrze poznane i, jak wspomniano

wcześniej, kombinacje allotypów *ccrAB* i *ccrC* oraz kompleksu *mec* są podstawą utworzenia klas i podklas kaset chromosomowych. Budowa kasety lub kaset występujących u *S. intermedius* jest słabo poznana. Campanile i wsp. [5] na przykładzie jednego szczepu stwierdzili, że może to być typ IIIA. W wyniku przeprowadzonej analizy okazało się, że sekwencje genu *mec* były identyczne w 97% do sekwencji stwierdzanych u MRSA. Podobnie sekwencje *ccrAB* i *ccrC* wykazywały również 97% homologię do występujących u MRSA. Sekwencje w dalszym odcinku tego regionu wykazywały od 91 do 94% homologii z *ccrC* stwierdzanych w V typie kasety MRSA oraz SCC występującej u *S. haemolyticus* i *S. saprophyticus*.

3. Znaczenie kliniczne *Staphylococcus intermedius*

Staphylococcus intermedius po raz pierwszy został opisany przez V. Hajka w 1976 roku, jako nowy gatunek gronkowców koagulazododatnich [16]. Powszecznie występuje na skórze i błonach śluzowych u psowatych. U psów może wywoływać ropne zapalenie skóry, zapalenie zewnętrznego przewodu słuchowego, zapalenie spojówek, zapalenia macicy i stawów [14, 21, 34, 40]. Gatunek ten bywa również izolowany od kotów, koni, bydła i innych zwierząt [16, 40]. Przez wiele lat utrzymywało się przekonanie, że zakażenia ludzi przez *S. intermedius* są ograniczone i sprowadzają się do przypadków po pogryzieniu przez psy [11, 31, 44]. Na podstawie współcześnie przedstawionych danych stwierdzono, że przenoszenie *S. intermedius* od psów do ludzi jest coraz częstsze. Opisano przypadki zakażenia *S. intermedius* u ludzi w wyniku, których dochodziło do zapalenia zewnętrznego przewodu słuchowego [45], zapalenia płuc, tworzenia ropni opłucnej [9], powstawania zmian zapalnych w ranach powstałych po usunięciu gruczołu sutkowego [29], powstawania ropni w mózgu [1] oraz bakteriemii [47]. Okazało się, że ludzie mogą być również bezobjawowymi nosicielami *S. intermedius* [38], często mylnie identyfikowanego na podstawie wytwarzania koagulazy, jako *S. aureus* [6, 16]. Drobnoustrój ten został uznany w ostatniej dekadzie za czynnik zoonotyczny.

4. Indukcja lekooporności *Staphylococcus intermedius*

Choroby skóry u psów, w tym również głębokie ropne zapalenie skóry i tkanki podskórnej (*pyodermatitis*) wywołane przez *Staphylococcus intermedius* są najczęstszą przyczyną podejmowania antybiotykoterapii [34]. Zazwyczaj leczenie trwa od 8–12 tygodni i nie rzadko zdarzają się nawroty choroby. Powoduje to przedłużanie i powtarzanie antybiotykoterapii [19].

Zazwyczaj używa się tych samych grup chemioterapeutyków, które mają zastosowanie w leczeniu zakażeń gronkowcami u ludzi, jak np. penicyliny, cefalosporyny, makrolidy, linkozamidy, tetracykliny, sulfonamidy oraz aminoglikozydy [39, 48]. Niepowodzenia w leczeniu ropnych zapaleń skóry mogą wynikać ze złożonej patogenezы tej choroby, w której dochodzi do powstania nadwrażliwości indukowanej gronkowcowym peptydoglikanem. Powstałe w odpowiedzi IgE łączą się z receptorami komórek tucznych w wyniku czego, dochodzi do ich aktywacji i egzocytozy ziarnistości oraz uwalniania mediatorów reakcji anafilaktycznej i powstania miejscowej reakcji zapalnej. Nie wyklucza się również rozwoju nadwrażliwości indukowanej kompleksami immunologicznymi. Przedłużona antybiotykoterapia, czasami przy użyciu leku, którego stężenie nie osiąga wartości MIC (sub-MIC) w tkankach (antybiotyki w dermatologii stosowane są zwykle w wysokich dawkach) lub też zbyt krótkotrwała terapia przyczyniają się do indukcji oporności u bakterii [32]. Nadużywanie chemioterapeutyków i błędy w ich stosowaniu zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doprowadziły do indukcji i selekcji szczepów opornych. Wiele badań potwierdza dodatnią korelację pomiędzy zwiększonym użyciem danego antybiotyku, a pojawiającą się w odpowiedzi opornością bakterii na ten właśnie lek. W wyniku zwiększonego użycia linkozamidów w leczeniu ropnych zakażeń skóry u psów w latach 1990–1998 w Szwecji, odnotowano wzrost liczby szczepów gronkowców opornych na te leki. Dowiedziano również, że oporność na antybiotyki makrolidowe, linkozamidy, kwas fusydowy, tetracykliny i aminoglikozydy była znacznie częstsza wśród szczepów izolowanych po powtarzanej antybiotykoterapii [23].

Największy problem stanowią wielolekooporne szczepy gronkowców, w tym MRSI, co powoduje wyłączenie z terapii całych grup leków. Z pięcioletnich badań przeprowadzonych w szpitalu dla zwierząt na Uniwersytecie Pensylwania wynika, że 24% szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich pochodzących od przebywających tam zwierząt wykazywało oporność na metycylinę. Głównie były to *S. aureus* (41%), *S. schleiferi* (40%) i *S. intermedius* (16%) izolowane od zwierząt z ropnym zapaleniem skóry i zewnętrznego przewodu słuchowego niepoddające się leczeniu. Szczepy te prawdopodobnie zostały wyselekcjonowane długotrwałym podawaniem antybiotyków [13].

5. Przenoszenie się szczepów

Staphylococcus intermedius między psami i ludźmi

Bliski kontakt człowieka z psem oraz narastająca oporność szczepów *S. intermedius* izolowanych od tych zwierząt na antybiotyki β -laktamowe skłoniła

wielu badaczy do sprawdzenia tezy, czy wspomniane bakterie mogą się przenosić na ludzi. Podjęte badania polegały na przeprowadzeniu dokładnej analizы pokrewieństwa szczepów *S. intermedius* wyizolowanych od psów oraz od ich właścicieli lub pracowników lecznic weterynaryjnych. Do tego celu wykorzystywano głównie metody typowania molekularnego, jak metoda analizы długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA za pomocą elektroforezy pulsacyjnej (PFGE – pulsed-field gel electrophoresis) uznawanej za tzw. „złoty standard” w różnicowaniu bakterii. Dzięki trawieniu całkowitego genomowego DNA uzyskuje się fragmenty będące odzwierciedleniem strukturalnej organizacji chromosomu bakteryjnego. PFGE jest wyjątkowo czułą metodą, pozwalającą na wykrycie często nawet niewielkich zmian zachodzących w genomie bakteryjnym. Stosowana jest powszechnie do typowania szczepów *S. aureus* w dochodzeniach epidemiologicznych [49]. H e s s e l b a r t h i wsp. [20], a następnie S h i m i z u i wsp. [43] wykorzystali technikę PFGE do typowania szczepów *S. intermedius* wyizolowanych od chorych i od zdrowych psów. Badaniu poddano 52 szczepy *S. intermedius* wyizolowane od psów w dwóch różnych krajach, tj. w Japonii (26 szczepów) i w Stanach Zjednoczonych (26 szczepów). Całkowite genomowe DNA poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *SmaI*. Po rozdziale elektroforetycznym analizowano uzyskane wzory prążków na podstawie których, możliwa była ocena stopnia pokrewieństwa poszczególnych szczepów. Okazało się, że mimo iż analizowane szczepy wykazywały odmienne wzory prążków, to pewne fragmenty chromosomów wysoce konserwatywne ujawniły się jako markery typowe dla tego gatunku. Stąd też cecha ta może być użyteczna do identyfikacji *S. intermedius*, czasami mylnie rozpoznanych jako inne koagulazododatnie gatunki gronkowców [43].

G u a r d a b a s s i i wsp. [14] zastosowali technikę PFGE do określenia stopnia pokrewieństwa pomiędzy szczepami *S. intermedius* izolowanymi od psów wykazujących ropne zapalenie skóry oraz szczepami *S. intermedius* wyizolowanymi od właścicieli zwierząt. Ludzi, którzy nie mieli codziennego kontaktu z psami traktowano jako grupę kontrolną. U części szczepów wyizolowanych od właścicieli psów wzory rozdziału DNA otrzymane w wyniku PFGE były takie same jak wzory rozdziału DNA szczepów pochodzących od psów. Sugeruje to możliwość przenoszenia się szczepów *S. intermedius* pomiędzy psami i ludźmi. Ponieważ *S. intermedius* stosunkowo rzadko występuje u ludzi, wydaje się, że droga transmisji odbywa się w kierunku pies-człowiek. Wykazano również, że szczepy wyizolowane od psów oraz od ich właścicieli miały identyczny wzór oporności na leki i wykazywały oporność, na co najmniej 5 antybiotyków [15].

K i k u c h i i wsp. [29] poddali analizie molekularnej szczep *S. intermedius* wyizolowany od pacjentki cierpiącej z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego oraz szczep *S. intermedius* wyizolowany ze śliny od jej psa. Profile restrykcyjne po trawieniu DNA endonukleazą *SmaI* oraz w równoległe prowadzonym badaniu – endonukleazą *AscI* obu izolatów były identyczne. Na podstawie przeprowadzonego wywiadu okazało się, że pies często, np. podczas wspólnej zabawy, lizał właścicielkę w ucho, co prawdopodobnie doprowadziło do przeniesienia się bakterii. W 2008 roku opisano pierwszy przypadek transmisji meticylinoopornych szczepów *S. intermedius* (MRSI) między ludźmi a zwierzętami. Badano szczepy *S. intermedius* wyizolowane z zakażonych ran pooperacyjnych od 5 psów oraz od jednego kota w jednej z klinik weterynaryjnych w Holandii. Wszystkie izolaty wykazywały wielooporność i wykryto w ich genomie gen *mecA*. Fakt ten skłonił badaczy do sprawdzenia, czy źródłem zakażenia szczepami MRSI mógł być chirurg wykonujący zabieg u wszystkich chorych zwierząt. Pobrano wymazy z jamy nosowej od lekarza oraz od 6 pielęgniarek asystujących przy operacjach. Dodatkowo pobrano próbki ze środowiska kliniki (ze ścian na sali zabiegowej, poczekalni, kuchni oraz z pokoju dla personelu). Dla porównania pobrano również wymazy z jamy nosowej od 2 zdrowych psów, należących do jednego z pracowników kliniki, które często w niej bywały. Okazało się, że we wszystkich przypadkach wyizolowano *S. intermedius* wykazujące oporność na metycylinę. Izolaty wykazywały identyczny wzór typowania przy pomocy techniki PFGE. Można, więc na tej podstawie założyć epidemiologiczny związek między zakażeniami pooperacyjnymi zwierząt i nosicielstwem MRSI przez personel kliniki. To pracujący w klinice ludzie stanowili rezerwuar opornych szczepów *S. intermedius*. Prawdopodobnie wcześniej ludzie zakażili się tymi bakteriami od zwierząt, a następnie byli źródłem zakażenia dla zwierząt [46].

6. Występowanie genu *mecA* u *Staphylococcus intermedius*

Zaskakująco niewiele jest danych na temat przekazywania genu *mecA* przez gronkowce występujące u zwierząt szczepom bytującym u ludzi. Przenoszenie się MRSI pomiędzy ludźmi i zwierzętami jest możliwe i takie przypadki zostały udokumentowane. Sugeruje to, że również *SSCmec* może być przekazywana pomiędzy różnymi gatunkami tych bakterii. Przemawiają za tym podobne typy sekwencyjne *SSCmec*, stwierdzane zarówno wśród szczepów występujących u ludzi jak i u zwierząt. Dotychczas sądzono, że gen *mecA* występuje tylko w śladowym odsetku u *Sta-*

phylococcus intermedius. Badania przeprowadzone w Hongkongu ujawniły obecność tego genu aż u 16,7% izolatów *S. intermedius* pochodzących od zdrowych psów. Podobnie rutynowe badania bakteriologiczne przeprowadzone w Niemczech ujawniły 6% szczepów *S. intermedius* opornych na metycylinę. Bliższa ich charakterystyka wykazała, że był to ten sam klon obecny również u personelu kliniki, w której zwierzęta były leczone. Przykład ten podobnie, jak wcześniej opisane pokazuje, że możliwe jest przenoszenie *S. intermedius* ze zwierząt na człowieka i następnie ponownie na zwierzęta od ludzi oraz klonalne rozprzestrzenianie w populacji zwierząt, jak prawdopodobnie było w opisanym przypadku. Na podstawie badań przeprowadzonych w Polsce obecność genu *mecA* stwierdzono u 14% szczepów *S. intermedius* izolowanych od psów. Występowanie genu *mecA* nie w każdym przypadku warunkuje oporność fenotypową na metycylinę, stwierdzono bowiem, że 14% *mecA*-dodatnich szczepów wykazuje wrażliwość na metycylinę w teście krążkowo-dyfuzyjnym [30]. L o e f f l e r i wsp. [36] podają, że liczba wieloopornych, *mecA*-dodatnich szczepów *S. intermedius* izolowanych od zwierząt w Europie osiągnęła poziom alarmujący. Dla porównania, częstość występowania MRSA w szpitalach europejskich jest różna, np. w Holandii wynosi mniej niż 1%, w Niemczech zaś około 25% z tendencją wzrostową w ostatnich latach. W Polsce występowanie MRSA wynosi średnio 20%, ale zależy od profilu i wielkości szpitala oraz lokalizacji w poszczególnych województwach [4].

Tak, więc występowanie genu *mecA* u *S. intermedius* stwarza potencjalne niebezpieczeństwo przenoszenia się takich szczepów na człowieka, jak również utrzymywanie się puli tych genów w rezerwuarze zwierzęcym i powstawania na wzór CA-MRSA *de novo* PA-MRSI. Wielu badaczy uważa, że jest to poważniejsze zagrożenie dla człowieka niż klonalne szerzenie się oporności (rozprzestrzeniania się szczepów opornych). Przekazywanie genów oporności przez meticylinooporne szczepy *S. intermedius* gronkowcom typowo ludzkim (horyzontalne szerzenie się oporności) wydaje się wysoce prawdopodobne.

Horyzontalny transfer genów oporności pomiędzy różnymi gatunkami gronkowców został opisany już w 1984 roku przez N a i d o o i L l o y d [41], a S c h w a r z i wsp. [42] zaobserwowali, że badane przez nich szczepy *S. intermedius* pochodzące od psów miały te same geny oporności na tetracyklinę, co szczepy *S. aureus* wyizolowane od ludzi [12]. Również wyniki badań L u o n g i wsp. [37], I t o i wsp. [25], K a t a y a m a i wsp. [28] oraz H a n s s e n i wsp. [17], wskazują na możliwość przekazywania *SSCmec* nie tylko między szczepami, ale również między gatunkami gronkowców.

7. Podsumowanie

Konsekwencje stosowania chemioterapeutyków w lecznictwie weterynaryjnym, w tym w lecznictwie zwierząt domowych są podobne do obserwowanych w leczeniu zakażeń u ludzi. W jednym i drugim przypadku zwykle używa się tych samych leków indukujących te same mechanizmy oporności i przyczyniających się do selekcji tych samych lub blisko spokrewnionych bakterii. Wiele opublikowanych danych wskazuje na rosnącą oporność bakterii izolowanych od psów i kotów i pokazuje na zależności pomiędzy używanym lekiem i narastającą następnie opornością bakterii na ten i podobne antybiotyki. Bliski kontakt pomiędzy zwierzętami towarzyszącymi człowiekowi, wśród nich psów i kotów, których liczba w rozwiniętych społeczeństwach systematycznie się zwiększa a tym samym, stwarza dogodne warunki zarówno do bezpośredniej wymiany mikroflory jak i jej obecności we wspólnym środowisku życia. Psy i koty mogą być również rezerwuarem mikroorganizmów chorobotwórczych, w tym także pochodzących od ludzi, jak opisywano to na przykładzie MRSA oraz źródłem genów kodujących czynniki zjadliwości i oporności na leki. Metycylooporne *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* i *S. hominis* pochodzące od psów i kotów okazały się nosicielami identycznych kaset SCCmec, jak HA-MRSA i CA-MRSA. Ulokowanie tych genów w kasetach, plazmidach lub innych ruchomych elementach genetycznych sprzyja ich horyzontalnej wymianie nie tylko pomiędzy szczepami tego samego gatunku, ale również pomiędzy gatunkami, rodzajami a nawet bardziej odległymi grupami taksonomicznymi bakterii. Powoduje to, że nawet pojedyncze komórki wyżej opisanych szczepów mogą przekazywać geny kodujące oporność na chemioterapeutyki bakteriom stanowiącym naturalną mikroflorę określonego gospodarza. Oporne bakterie pochodzenia zwierzęcego wyselekcjonowane przez użycie antybiotyku, po przeniesieniu się na człowieka mogą przekazywać swoje geny bakteriom stanowiącym jego naturalną mikroflorę. Kierunek transmisji może być również odwrotny i mikroorganizmy występujące u ludzi mogą przekazywać geny kodujące czynniki chorobotwórczości bakteriom bytującym u zwierząt. Powstawanie szczepów o nowych właściwościach, w tym opornych na antybiotyki może się również odbywać w środowisku życia człowieka i zwierząt, w którym bakterie te są cały czas obecne. Występowanie tych samych genów u bakterii pochodzących z różnych źródeł potwierdza opisywane zjawisko, chociaż ustalenie pierwotnego źródła ich pochodzenia i kierunku przekazywania genów często jest niemożliwe. W odniesieniu do *Staphylococcus intermedius*, oprócz nabierania przez ten gatunek cech metycyloopor-

ności, niepokojącym wydaje się być preferencyjne przyjmowanie niektórych genów oporności od bakterii bardziej odległych filogenetycznie, nierzadko stanowiących naturalną mikroflorę danego gospodarza. Ilustracją wspomnianego zjawiska jest oporność tych gronkowców na tetracykliny i makrolity uwarunkowana obecnością genów *tet(M)* i *erm(B)* pochodzących od enterokoków i paciorkowców, a nie genami *tet(K)* i *erm(C)* występującymi u *S. aureus*. Szczepy takie mogą być, zatem potencjalnym rezerwuarem genów oporności przekazywanym następnie innym bakteriom. Konserwatywna sekwencja SCCmec niezależna od gatunku gronkowców, u których występuje sugeruje jej horyzontalne przekazywanie pomiędzy różnymi gatunkami tych bakterii. Ciągła rearanżacja kompleksu genów *ccr* i *mec* wskazuje na częstą wymianę materiału genetycznego jaka ma miejsce w tym fragmencie genomu i uzasadnia dlaczego dość łatwo i szybko dochodzi do powstawania nowych wariantów SCCmec.

Piśmiennictwo

1. Atalay B., Ergin F., Cekinmez M., Caner H., Altinors N.: Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochir. (Wien)*, **147**, 347–348 (2005)
2. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M.: Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **359**, 1819–1827 (2002)
3. Barrett J.F.: MRSA-what is it, and how do we deal with this problem? *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9**, 253–265 (2005)
4. Bartoszewicz M., Secewicz A.: Skuteczność wybranych antybiotyków i antyseptyków wobec MRSA w zakażonych ranach. *Zakażenia*, **6**, 89–93 (2007)
5. Campanile F., Bongiorno D., Borbone S., Venditti M., Giannella M., Franchi C., Stefani S.: Characterization of a variant of the SCCmec element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*. *Microb. Drug Resist.* **13**, 7–10 (2007)
6. Cox H.U., Newman S.S., Roy A.F., Hoskins J.D., Foil C.S.: Comparison of coagulase test methods for identification of *Staphylococcus intermedius* from dogs. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1522–1525 (1985)
7. Diep B.A., Sensabaugh G.F., Somboona N.S., Carleton H.A., Perdreau-Remington F.: Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2080–2084 (2004)
8. Epstein C.R., Yam W.C., Peiris J.S.M., Epstein R.J. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infect. Genet. Evol.* doi: 10.1016/j.meegid.2008.11.003 (2009)
9. Gerstadt K., Daly J.S., Mitchell M., Wessolossky M., Cheeseman S.H.: Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 218–219 (1999)
10. Gill S.R., Fouts D.E., Archer G.L.: Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis

- of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426–2438 (2005)
11. Goldstein E.J.: Bite wounds and infection. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 633–640 (1992)
 12. Greene R.T., Schwarz S.: Small antibiotic resistance plasmids in *Staphylococcus intermedius*. *Zbl. Bakt.* **276**, 380–389 (1992)
 13. Griffith G.C., Morris D.O., Abraham J.L., Shofer F.S., Rankin S.C.: Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermatol.* **19**, 142–149 (2008)
 14. Guardabassi L., Loeber M.E., Jacobson A.: Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet. Microbiol.* **98**, 23–27 (2004)
 15. Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D.H.: Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Rev. J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 321–332 (2004)
 16. Hajek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 401–408 (1976)
 17. Hanssen A.M., Ericson Sollid J.U.: Local variants of *Staphylococcus aureus* cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 285–296 (2004)
 18. Hanssen A.M., Ericson Sollid J.U.: SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 8–20 (2006)
 19. Harvey R.G., McKeever P.J.: Choroby skóry psów i kotów. Kolorowy atlas i podręcznik. Ukierunkowane problemowo podejście do rozpoznania i leczenia. Wyd. Galaktyka, Łódź, 2006, s. 122–124
 20. Hesselbarth J., Witte W., Cuny C., Rohde R., Amtsberg G.: Characterisation of *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and cases of superficial pyoderma by DNA restriction endonuclease patterns. *Vet. Microbiol.* **41**, 259–266 (1994)
 21. Hill P.B., Lo A., Eden C.A., Huntley S., Morey V., Ramsey S., Richardson C., Smith D.J., Sutton C., Taylor M.D., Thorpe E., Tidmarsh R., Williams V.: Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Vet. Rec.* **158**, 533–539 (2006)
 22. Holden M.T., Feil E.J., Lindsay J.A.: Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9786–9791 (2004)
 23. Holm B.R., Pettersson U., Morner A., Bergstrom K., Franklin A., Greko C.: Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *Vet. Record*, **151**, 600–605 (2002)
 24. Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C., Hiramatsu K.: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1323–1336 (2001)
 25. Ito T., Okuma K., Ma X.X., Yuzawa H., Hiramatsu K.: Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug. Resist. Update*, **6**, 41–52 (2003)
 26. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K.: A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1549–1555 (2000)
 27. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K.: Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1955–1963 (2001)
 28. Katayama Y., Takeuchi F., Ito T., Ma X.X., Ui-Mizutani Y., Kobayashi I., Hiramatsu K.: Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**, 2711–2722 (2003)
 29. Kikuchi K., Karasawa T., Piao C., Itoda I., Hidai H., Yamamura H., Totsuka K., Morikawa T., Takayama M.: Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *J. Infect. Chemother.* **10**, 46–48 (2004)
 30. Kizerwetter-Świda M., Chrobak D., Rzewuska M., Binek M.: Antibiotic resistance patterns and occurrence of *mecA* gene in *Staphylococcus intermedius* strains of canine origin. *Pol. J. Vet. Sci.* **12**, 9–13 (2009)
 31. Lee J.: *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *J. Infect.* **29**, 105–118 (1994)
 32. Lilenbaum W., Veras M., Blum E., Souza G.N.: Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Let. Appl. Microbiol.* **31**, 42–45 (2000)
 33. Lim T.T., Chong F.N., O'Brien F.G., Grubb W.B.: Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related. A comparison of their *mec* regions. *Pathology*, **35**, 336–343 (2003)
 34. Lloyd D.H., Noble W.C.: Use and abuse of antibiotics in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol.* **10**, 161 (1999)
 35. Loeffler A., Boag A.K., Sung J., Lindsay J.A., Guardabassi L., Dalsgaard A., Smith H., Stevens K.B., Lloyd D.H.: Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 692–697 (2005)
 36. Loeffler A., Linek M., Moodley A., Guardabassi L., Sung J.M.L., Winkler M., Weiss R., Lloyd D.H.: First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet. Dermatol.* **18**, 412–421 (2007)
 37. Luong T.T., Ouyang S., Bush K., Lee C.Y.: Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J. Bacteriol.* **184**, 3623–3629 (2002)
 38. Mahoudeau I., Delabranche X., Prevost G., Monteil H., Piemont Y.: Frequency of isolation of *S. intermedius* from humans. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2153–2154 (1997)
 39. Mason I.S., Kietzmann M.: Cephalosporins-pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol.* **10**, 187–192 (1999)
 40. Quinn P.I., Carter M.E., Markey B., Carter G.R.: Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe, 1994, s. 118–125
 41. Naidoo J., Lloyd D.H.: Transmission of genes between staphylococci. In: Woodline, M. (Ed.), *Antimicrobials & Agriculture*. Butterworths, London, 1984, s. 285–292

42. Schwarz S., Roberts M.C., Werckenthin C., Pang J., Lange C.: Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet. Microbiol.* **63**, 217–227 (1998)
43. Shimizu A., Berkhoff H.A., Kloos W.E., George C.G., Ballard D.N.: Genomic DNA fingerprinting, using pulsed-field gel electrophoresis, of *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Am. J. Vet. Res.* **57**, 1458–1462 (1996)
44. Talan D.A., Staatz D., Staatz A., Goldstein E.J., Singer K., Overturf G.D.: *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 78–81 (1989)
45. Tanner M.A., Everett CH. L., Youvan D.C.: Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1628–1631 (2000)
46. van Duijkeren E., Houwers D.J., Schoormans A., Broekhuizen-Stins M.J., Ikawaty R., Fluit A.C., Wagenaar J.A.: Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Vet. Microbiol.* **128**, 213–215 (2008)
47. Vandenesch F., Célard M., Arpin D., Bes M., Greenland T., Etienne J.: Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2508–2510 (1995)
48. Watson A.D.J., Rosin E.: Antimicrobial drug use in dogs and cats. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3 edn., Iowa State University Press, USA, 537–575 (2000)
49. Żabicka D., Empel J., Hryniewicz W.: Metody typowania *Staphylococcus aureus*. [w:] „Świat człowieka światem drobnoustrojów”, 80 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, 2007, s. 51–57