



**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Marta Katkowska**

**Analiza występowania i właściwości *Staphylococcus aureus*  
izolowanych z gardła i migdałków pacjentów poddanych  
tonsillektomii.**

**ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH**

**Gdańsk 2019**

**Wydano za zgodą  
Dziekan Wydziału Lekarskiego**

**Pracę wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Jamy Ustnej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Promotor:  
dr hab. n. med. Katarzyna Garbacz**

*Składam szczególne podziękowania mojej Promotor, Pani Doktor Katarzynie Garbacz za wszechstronną pomoc, życzliwą opiekę naukową oraz inspirujące wskazówki i dyskusje, które wzbogaciły moją wiedzę i niezmiennie mobilizowały do dalszej, wzmożonej pracy.*

*Dziękuję całej mojej Rodzinie, a w szczególności mojemu Mężowi  
za wsparcie, cierpliwość i motywację oraz pomoc w łączeniu zadań  
młodego naukowca i rodzica.*

## SPIS TREŚCI

I.	WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF MANUSCRIPTS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION.....	6
II.	WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS LIST.....	7
III.	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	9
	1. WPROWADZENIE.....	9
	2. CELE PRACY.....	10
	3. MATERIAŁ I METODY.....	11
	4. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	13
	5. WNIOSKI.....	20
IV.	SUMMARY IN ENGLISH.....	21
	1. INTRODUCTION.....	21
	2. OBJECTIVES OF THE STUDY.....	22
	3. MATERIAL AND METHODS.....	23
	4. REVIEW OF THE PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION.....	25
	5. CONCLUSIONS.....	31
V.	WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA/ CITATIONS LIST.....	32

## I. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. ***Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis.** Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski. *Staphylococcus aureus* izolowany od chorych dorosłych poddanych tonsillektomii z powodu nawracającego zapalenia migdałków podniebiennych. *APMIS*. Jan2017, Vol. 125 Issue 1, p46-51. 6p.  
Impact Factor: 2,026; Punktacja MNiSW: 20  
DOI 10.1111/apm.12628
2. **Rola *Staphylococcus aureus* w nawracającym zapaleniu migdałków podniebiennych u pacjentów poddanych tonsillektomii.** Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski. Role of *Staphylococcus aureus* in tonsillectomized patients with recurrent tonsillitis. *Otorynolaryngologia*. 2016, Vol. 15 Issue 4, p152-158. 7p.  
Impact Factor: 0; Punktacja MNiSW: 8
3. **Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from recurrent tonsillitis in children.** Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Wacław Kopala, Justyna Schubert, Jacek Bania. Różnorodność genetyczna i antybiotykooporność *Staphylococcus aureus* izolowanych od dzieci z nawracającymi zapaleniami migdałków. *APMIS*.  
Impact Factor: 2,225; Punktacja MNiSW: 70  
DOI: 10.1111/APM.13007

Łączny współczynnik Impact Factor: 4,251

Łączna punktacja MNiSW: 98

## II. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS LIST

AMC –	Amoxicillin/clavulanic acid/ amoksycylina/kwas klawulanowy,
AMX –	Amoxicillin/ amoksycylina,
ATCC –	American Type Culture Collection/ Amerykańska kolekcja szczepów,
blaZ –	Beta-lactamase gene/ gen beta-laktamazy,
C –	Chloramphenicol/ chloramfenikol,
CFR –	Cefadroxil/ cefadroksyl,
CIP –	Ciprofloxacin/ cefoksytyna,
DA –	Clindamycin/ klindamycyna,
DO –	Doxycycline/ doksycyklina,
E –	Erythromycin/ erytromycyna,
<i>eta</i> –	exfoliative toxin gene A/ gen eksfoliatyny typu A,
<i>etb</i> –	exfoliative toxin gene B/ gen eksfoliatyny typu B,
FOX –	Cefoxitin/ cefoksytyna,
GABH –	$\beta$ -hemolytic Streptococcus Group A/ paciorkowce $\beta$ -hemolizujące grupy A,
GN –	Gentamicin/ gentamycyna,
MALDI-TOF MS –	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry/ spektrometria mas oparta na desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej wykorzystaniem matrycy oraz analizatora czasu przelotu jonów,
MDR –	Multidrug Resistance/ wielolekooporność,
MIC –	Minimum Inhibitory Concentration/ minimalne stężenie hamujące,
MLS <sub>B</sub> –	Resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B/ oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B,
MLST –	Multilocus Sequence Typing/ analiza porównawcza sekwencji genów,
MRSA –	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / gronkowiec złocisty oporny na metycylinę,
MSSA –	Methicillin Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> / gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę,
MUP –	Mupirocin/ mupirocyna,

PCR –	Polymerase Chain Reaction / łańcuchowa reakcja polimerazy,
PVL –	Panton-Valentine Leukocidine / leukocydyna Panton-Valentine,
RT –	Recurrent Tonsillitis/ nawracające zapalenia migdałków,
SCCmec –	Staphylococcal Chromosomal Cassette <i>mec</i> / chromosomalna kasetta gronkowcowa <i>mec</i> ,
<i>sea-seu</i> –	enterotoxins genes A-U/ geny enterotoksyn A-U,
SSR –	Short Sequence Repeats/ krótkie sekwencje repetytywne,
SXT –	Trimethoprim-sulfamethoxazole/ trimetoprim-sulfametoksazol,
TE –	Tetracycline/ tetracyklina,
TSST-1 –	Toxic Shock Syndrome Toxin-1/ toksyna zespołu wstrząsu toksycznego 1,
VA –	Vancomycin/ wankomycyna.



### III. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

#### 1. WPROWADZENIE

*Staphylococcus aureus* jest szeroko rozpowszechnionym bakteryjnym patogenem człowieka, wywołującym między innymi infekcje skóry, kości i szpiku, ropnie wewnątrznarządowe, posocznice oraz zapalenia wsierdza. Problem infekcji gronkowcowych dotyczy również zakażeń układu oddechowego (1).

Nawracające zapalenie migdałków podniebiennych (Recurrent Tonsillitis, RT) jest jednym z najczęstszych schorzeń górnych dróg oddechowych wieku dziecięcego i okresu dojrzewania, a niekiedy dotyczy również osób dorosłych. Stany zapalne migdałków mają tendencje do nawrotów, prowadząc do zakażeń przewlekłych i przerostu migdałków. Aktywny proces zapalny może spowodować wystąpienie zarówno odczynów lokalnych jak i ogólnoustrojowych, takich jak ropień okołomigdałkowy, gorączka reumatyczna, kłębuszkowe zapalenie nerek, zapalenie ucha środkowego, a niekiedy sepsa (2).

Podstawową metodą leczenia nawrotowego zapalenia migdałków jest antybiotykoterapia. Właściwe rozpoznanie etiologii zakażenia i trafny dobór antybiotyku są niezbędne w skutecznej eradykacji patogenu. Pozwala to na szybki powrót do zdrowia oraz zapobiega nawrotom i powikłaniom. Antybiotykiem z wyboru w leczeniu RT jest penicylina, a w leczeniu skorygowanym cefalosporyny. Częste nawroty choroby zmuszają do wielokrotnych antybiotykoterapii, które na krótko przynoszą pożądany efekt. W takich przypadkach uzasadnione jest chirurgiczne usunięcie migdałków podniebiennych czyli tonsillektomia. Zgodnie z rekomendacjami krajowych Towarzystw Otolaryngologicznych podstawowym wskazaniem do tonsillektomii są częste nawroty choroby; od >4 do >7/rok w ciągu roku poprzedzającego zabieg, ≥5x/rok w ciągu 2 lat poprzedzających, ≥3x/rok przez kolejne 3 lata poprzedzające (3-6).

Pomimo, że za główną przyczynę ostrych zapaleń gardła i migdałków uważa się *Streptococcus pyogenes* najczęściej izolowaną patogenną bakterią jest gronkowiec złocisty. Obiektywną ocenę roli *S. aureus* utrudnia częste nosicielstwo gronkowców zarówno w nosie jak i w gardle. Pomimo, że ostatnie badania wskazują na ich udział w zapaleniu migdałków to rola *S. aureus* ciągle pozostaje niejasna, a badania prowadzone na ten temat dość skąpe (7, 8).

## 2. CELE PRACY

- 1) Analiza częstości występowania *S. aureus* u dorosłych i dzieci poddanych tonsillektomii z powodu nawrotowego zapalenie migdałków podniebiennych, w wymazach pobranych z powierzchni migdałków przed ich usunięciem, z wnętrza usuniętych migdałków oraz z gardła po zabiegu tonsillektomii.
- 2) Określenie wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych *S. aureus* od dorosłych i dzieci poddanych tonsillektomii, ze szczególnym uwzględnieniem ich wrażliwości na metycylinę.
- 3) Określenie potencjału chorobotwórczego izolatów *S. aureus* w oparciu o wykrywanie genów toksyn/ superantygenów gronkowcowych.
- 4) Analiza epidemiologiczna wyizolowanych *S. aureus* w oparciu o określenie typów *spa* i kompleksów klonalnych.

### 3. MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły wymazy pobrane w trzech etapach od chorych poddanych tonsillektomii z powodu zapalenia migdałków podniebiennych. W pierwszym etapie pobierano wymaz z powierzchni migdałków przed zabiegiem tonsillektomii, kolejno z obu rozciętych jałowym nożem migdałków bezpośrednio po ich usunięciu na sali operacyjnej oraz na trzecim etapie z tylnej ściany gardła po wygojeniu rany pooperacyjnej (2-4 tygodni po zabiegu). Chorzy nie byli poddawani antybiotykoterapii przez co najmniej 15 dni przed zabiegiem. Materiał został zebrany od 118 osób dorosłych w latach 2002-2008 (przez dr J. Stromkowskiego) i od 73 dzieci w latach 2016-2017, u których wykonano tonsillektomię w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie na Oddziale Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej oraz w Szpitalu Powiatowym w Bartoszycach na Oddziale Chirurgii Ogólnej i Miniinwazyjnej. Pacjentów kwalifikowano do zabiegu na podstawie wywiadu chorobowego związanego z infekcjami górnych dróg oddechowych oraz dolegliwości współistniejących. Badanie przedmiotowe obejmowało: badanie ogólne chorego, badanie otolaryngologiczne wzornikowe z oceną migdałków podniebiennych, ich wielkości, ruchomości, obecności wydzieliny na powierzchni i w ich głębi oraz szczylnych stanu węzłów chłonnych.

W analizowanej grupie dorosłych było 72 kobiety oraz 46 mężczyzn w wieku od 18 do 68 lat oraz 28 dziewcząt i 45 chłopców, w wieku od 2 do 17 lat, w badanej grupie dzieci. Badanie zostało zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (numer zgody NKBBN/20/2016).

Izolację i identyfikację gronkowców złocistych prowadzono klasycznymi metodami diagnostyki mikrobiologicznej, dodatkowo w przypadku pięciu izolatów niepewną identyfikację potwierdzono metodą MALDI-TOF MS. Wrażliwość wyizolowanych *S. aureus* na 19 wybranych antybiotyków z różnych grup wstępnie określono metodą dyfuzyjno-krążkową na agarze Mueller-Hinton według zaleceń. Wrażliwość na wankomycynę i gentamycynę zweryfikowano metodą E- testu, a na metycylinę poprzez detekcję genu *mecA*. Indukcyjną oporność na makrolidy-linkozamidy-sterptograminy (MLS<sub>B</sub>) określono metodą D-testu. Izolację bakteryjnego DNA wykonano przy użyciu zestawu do izolacji genomowego DNA (Sigma-Aldrich, USA), postępując zgodnie z instrukcją producenta. Geny toksyn/superantygenów

gronkowcowych warunkujące odpowiednio wytwarzanie enterotoksyn (*sea-seu*), eksfoliatyn (*eta/etb*), toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1 (*tst*) oraz leukocydyny Panton-Valentine (*lukS-PV/lukF-PV*) wykrywano metodą multiplex PCR. Typy *spa* wyizolowanych *S. aureus* określano po zsekwencjonowaniu krótkich repetytywnych sekwencji (SSR) polimorficznego regionu X genu kodującego białko A (*spa*), przy użyciu oprogramowania Ridom Staph Type (<http://spaserver.ridom.de>) zgodnie z opisaną procedurą (9). Do oceny różnic w częstości występowania gronkowców w różnych fazach badania chorych oraz różnic w częstości wykrywania genów toksyn zastosowano test Pearsona chi kwadrat, przyjmując wartość  $p \leq 0.05$  jako istotną statystycznie.

#### 4. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Na rozprawę doktorską składają się trzy publikacje, w tym dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa dotyczące charakterystyki szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od chorych cierpiących na nawracające zapalenie migdałków podniebiennych, poddanych tonsillektomii. Pierwsza praca oryginalna dotyczy częstości występowania i antybiotykowrażliwości *S. aureus* wyizolowanych w trzech etapach badania w grupie dorosłych. Druga praca oryginalna obejmuje analogiczne badanie w grupie dzieci, gdzie wyizolowane *S. aureus* poddano dodatkowo analizie epidemiologicznej w oparciu o sekwencjonowanie genu *spa* oraz analizie potencjału patogenego poprzez detekcje genów toksyn. Praca przeglądowa podsumowuje w pięciu rozdziałach dotychczasową wiedzę na temat roli *S. aureus* w nawracającym zapaleniu migdałków podniebiennych.

**1) *Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis. Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski.** *Staphylococcus aureus* izolowany od chorych dorosłych poddanych tonsillektomii z powodu nawracającego zapalenia migdałków podniebiennych.

W pierwszej opublikowanej pracy oryginalnej dokonano retrospektywnej analizy występowania i antybiotykowrażliwości *S. aureus* wyizolowanych od dorosłych poddanych tonsillektomii z powodu zapalenia migdałków podniebiennych, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale Materiał i Metody.

*S. aureus* był najczęściej izolowaną bakterią na wszystkich etapach badania, zarówno z powierzchni migdałków (11,9%), jak i z ich wnętrza (30,5%) oraz z gardła po wygojeniu rany pooperacyjnej (5,9%). Były to różnice statystycznie znamienne, które pokazały, że tonsillektomia powoduje 5-krotny spadek częstości izolacji *S. aureus*. Gronkowiec najczęściej występował u chorych na jednym etapie badania (79,5%), rzadziej na dwóch etapach (18,2%) i tylko u jednej osoby na każdym etapie badania (2,3%). Wiek badanych chorych, od których izolowano *S. aureus* mieścił się w przedziale 18-59 lat. *S. aureus* występował najczęściej u chorych w wieku 21-30 lat (34,1%), nieco rzadziej u młodszych w wieku 18-20 lat (25%) i najrzadziej u chorych powyżej 50 roku życia (4,5%).

Paciorkowce  $\beta$ -hemolizujące grup A, B, C, F i G występowały u 3-12% chorych, z czego *Streptococcus pyogenes* zaledwie u 5,1% badanych na powierzchni migdałków, u 1,7% we wnętrzu migdałków i u jednego pacjenta po tonsillektomii.

Z wymazów od chorych obok bakterii Gram-dodatnich wyizolowano też Gram-ujemne, do których należały: *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Występowały one zdecydowanie rzadziej niż gronkowiec i nie odnotowano istotnych różnic w częstości izolacji na kolejnych etapach.

Badanie antybiotykowrażliwości wyizolowanych *S. aureus* wykazało, że wszystkie były wrażliwe na gentamycynę, amikacynę, chloramfenikol, kotrimoksazol, mupirocynę, teikoplaninę i wankomycynę, a większość wrażliwa na 10 z 19 badanych antybiotyków. Oporność dotyczyła najczęściej penicylin (83,3%), pojedyncze izolaty z wnętrza migdałków były odporne na klindamycynę, linkomycynę, erytromycynę i tetracyklinę. Wysoki odsetek oporności na penicyliny wydaje się potwierdzać istniejący pogląd o możliwości patogenego oddziaływania gronkowca poprzez wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz, chroniących patogeny migdałków, takie jak *S. pyogenes* przed działaniem antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (10).

Wyizolowano tylko jeden szczep *S. aureus* odporny na metycylinę (MRSA), który pochodził z wnętrza migdałków 35-letniego pacjenta, cierpiącego od 4 lat na nawracające anginy i poddawanego antybiotykoterapii 6-7 razy w roku. Wydaje się więc, że w nawrotowym zapaleniu migdałków, w odróżnieniu od innych infekcji gronkowcowych, metycylinooporność nie stanowi problemu antybiotykoterapii. Można to tłumaczyć mniejszą presją selekcyjną antybiotyków w stosunku do gronkowców namnażających się wewnątrz komórek migdałków, jak sugeruje Zautner i wsp. (11).

Podsumowując, wśród dorosłych kwalifikowanych do tonsillektomii najczęściej izolowaną potencjalnie patogenną bakterią był *S. aureus*, ponad dwukrotnie częściej niż *S. pyogenes*. Izolowany był głównie z wnętrza migdałków chorych w wieku 21-30 lat, a częstość jego izolacji spadała po tonsillektomii.

## **2) Rola *Staphylococcus aureus* w nawracającym zapaleniu migdałków podniebiennych u pacjentów poddawanych tonsillektomii. Marta Katkowska,**

Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski. Role of *Staphylococcus aureus* in tonsillectomized patients with recurrent tonsillitis.

Celem pracy przeglądowej było podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat roli *S. aureus* w nawracającym zapaleniu migdałków podniebiennych u pacjentów poddanych tonsillektomii. Praca realizuje temat w pięciu następujących rozdziałach: 1/ Nawracające zapalenie migdałków podniebiennych, 2/ Tonsillektomia i wskazania, 3/ *Staphylococcus aureus* jako czynnik nawrotowego zapalenia migdałków podniebiennych, 4/ Antybiotykooporność szczepów *S. aureus* izolowanych z zapalenia migdałków podniebiennych, 5/ Rola biofilmu gronkowcowego w zapaleniu migdałków podniebiennych.

Podstawową metodą leczenia nawrotowego zapalenia migdałków podniebiennych jest antybiotykoterapia, jednak w przypadku wielokrotnych nawrotów choroby uzasadnione bywa chirurgiczne usunięcie migdałków czyli tonsillektomia (12). Pierwszego usunięcia migdałków podniebiennych w Polsce dokonał Zygmunt Srebrny w 1899 r. Na przestrzeni lat zmieniało się podejście do zabiegu tonsillektomii. W pierwszej połowie XX w. zabiegi wykonywano stosunkowo często, w latach 60-tych, po wprowadzeniu na szeroką skalę antybiotyków zaczęto krytycznie analizować zasadność kwalifikowania pacjentów do operacji, w szczególności dzieci ze względu na rolę migdałków w procesach odpornościowych. Obecnie wyróżnia się trzy typy wskazań do zabiegu tonsillektomii: obturacyjne, onkologiczne i zapalne. Podstawowym wskazaniem zapalnym jest nawracające zapalenie migdałków podniebiennych (13, 14).

W Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) podkreśla się, że wskazaniem do zabiegu są przypadki zaostrzeń stanu zapalnego z wystąpieniem silnego bólu gardła ograniczającego lub uniemożliwiającego normalne funkcjonowanie chorego. W wytycznych tych podkreśla się też znaczenie zakażenia bakteryjnego wywołanego przez paciorkowca ropotwórczego (*S. pyogenes*), którego obecność powinna być potwierdzona w posiewie wymazu z gardła lub w szybkim teście lateksowym na obecność swoistego antygeny (15).

Tonsillektomię należy ponadto rozważyć w przypadku, gdy nawrotom ostrego zapalenia migdałków towarzyszą następujące powikłania: bolesne powiększenie

i ropny stan zapalny szyjnych węzłów chłonnych, choroby zastawek serca, zapalenie wsierdza, występowanie drgawek gorączkowych, nie dająca się dobrze kontrolować cukrzyca (16).

Wykonanie w uzasadnionych przypadkach tonsillektomii poprawia jakość życia pacjentów. Chorzy operowani z powodów zapalnych potwierdzają, że po zabiegu znacznie maleje liczba nawrotów choroby, ilość dni z gorączką, bólem gardła oraz absencji w szkole czy w pracy (4, 16-19).

Nawracające zapalenie migdałków podniebiennych może być wywołane przez wirusy, bakterie, chlamydie oraz grzyby. Proporcje czynników zakaźnych zmieniają się w zależności od pory roku, wieku pacjenta i innych warunków epidemiologicznych. Niekiedy istnieje trudność w ustaleniu etiologii RT, która może wynikać z rozbieżności pomiędzy tym co stanowi florę bakteryjną powierzchni migdałków, a tym co izoluje się w posiewach z ich wnętrza. Stąd znalezienie rzeczywistej przyczyny procesu zapalnego ułatwia badanie flory bakteryjnej wnętrza migdałków po ich usunięciu (20-23).

Za najważniejszą bakteryjną przyczynę zapalenia migdałków uznaje się *S. pyogenes*, niemniej od lat najczęściej izolowaną patogenną bakterią jest *S. aureus*, którego częstość izolacji u chorych z RT może sięgać nawet 80%. Obiektywną ocenę sytuacji utrudnia częste nosicielstwo *S. aureus* zarówno w nosie jak i w gardle. Ocenia się, że odsetek stałych nosicieli gronkowca w przedsionku nosa wynosi 20-30%, a czasowych może sięgać nawet 60% (24). Nosicielstwo w gardle jest stwierdzane u 10-40% zdrowej populacji, a w okresach infekcji wirusowych może przekraczać nawet 40%. Wydaje się więc, że rola *S. aureus* w RT nie może być pomijana i nie sprowadza się jedynie do bezobjawowego nosicielstwa. Należy podkreślić, że zdecydowanie częściej izoluje się gronkowce z wnętrza migdałków niż z ich powierzchni. Zautner i wsp. dowiedli, zarówno przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) jak i cytometrii przepływownej (FACS), że niemalże wszystkie gronkowce związane z RT mają zdolność wewnątrzkomórkowego przeżywania w migdałkach (11). Może to wyjaśniać zarówno ich zdolność unikania mechanizmów odpowiedzi immunologicznej jak i przeciwbakteryjnego działania antybiotyków. Tłumaczy to krótkotrwały efekt powtarzających się antybiotykoterapii w nawrotowym zapaleniu migdałków (26).

Podsumowując, wydaje się, że do skutecznego leczenia antybiotykami nawrotowych zapaleń migdałków niezbędna jest nie tylko trafna zindywidualizowana



ocena stanu pacjenta, ale też kompleksowa analiza współwystępowania patogenów bakteryjnych i ich antybiotykooporności.

**3) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from recurrent tonsillitis in children. Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Waclaw Kopala, Justyna Schubert, Jacek Bania.** Różnorodność genetyczna i antybiotykooporność *Staphylococcus aureus* izolowanych od dzieci z nawracającymi zapaleniami migdałków.

Celem drugiej pracy oryginalnej była analiza częstości występowania *S. aureus* u dzieci cierpiących na nawracające zapalenie migdałków podniebiennych oraz określenie wrażliwości izolatów gronkowcowych na antybiotyki, oznaczenie typów *spa* w połączeniu z detekcją genów toksyn/ superantygenów gronkowcowych.

Najczęściej izolowanymi bakteriami były ziarniaki Gram-dodatnie, a wśród nich dominował gronkowiec złocisty. Najwięcej izolatów *S. aureus* pochodziło z wnętrza migdałków (63,0%), mniej z ich powierzchni (45,1%) i prawie czterokrotnie mniej z gardła po tonsillektomii (18,2%,  $p=0.007$ ). Wiek badanych dzieci z RT, od których pochodziły izolaty zawierał się w przedziale od 2 do 17 lat. Najczęściej gronkowce izolowano od dzieci poniżej 5 roku życia (46,3%); a najrzadziej w grupie 11-17 lat (17,5%). Porównując te wyniki do uzyskanych przez nas w grupie dorosłych można stwierdzić, że gronkowce częściej występują w migdałkach u dzieci (63,0%) niż u dorosłych (30,5%). Uzyskane dane pozostają w zgodzie z danymi z literatury, gdzie odsetek izolacji od dzieci waha się od 39,1% do 65,9% (11, 27, 28).

Ponad 67% wszystkich izolatów *S. aureus* syntetyzowało penicylinazę kodowaną przez gen *blaZ*, a jedynie 6,3% charakteryzowała oporność typu MRSA. Izolaty odporne na metycylinę pochodziły od dzieci w wieku 5 i 7 lat, które zakwalifikowano do zabiegu z powodu przewlekłych zapaleń migdałków z podejrzeniem przerostu migdałka gardłowego. Obojgu chorym towarzyszyły częste infekcje, trudności w oddychaniu, chrapanie. Wyizolowane szczepy MRSA charakteryzowała wielolekooporność (MDR). Obok oporności na  $\beta$ -laktamy, izolaty były odporne na erytromycynę, ciprofloksacynę, gentamycynę, doksycyklinę i tetracyklinę. Mimo, że problem gronkowcowej metycylinoporności jest coraz powszechniejszy wydaje się, że nie dotyczy on *S. aureus* związanych z nawrotowym zapaleniem migdałków. Wskazują na to nasze badania jak również wyniki z innych

kontynentów, gdzie odsetek MRSA z RT nie przekracza kilku procent (11, 12, 30, 31).

Właściwości patogenne *S. aureus* izolowanych z RT są słabo poznane, dlatego w pracy podjęto próbę oceny ich potencjału toksynotwórczego. Geny toksyn wykryto u ponad połowy badanych izolatów (56,3%), jednocześnie wykazano, że *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* and *seu* zgrupowane w operonie *egc*, były najczęściej obecne wśród badanych izolatów *S. aureus* (38,8%). Wydaje się, że może mieć to związek z wynikami Nowrouzian i wsp., którzy określają operon *egc* jako warunkujący kolonizację u pacjentów pediatrycznych (32). Kolejne geny toksyn były wykrywane z niższą częstością, gen warunkujący produkcję TSST-1 - na poziomie 8,8%. Toksyna TSST-1 jest superantygenem gronkowcowym etiologicznie związanym z zespołem wstrząsu toksycznego (33, 34). Toksyna ta działa miejscowo, mitogenne, prowadząc do szybkiego namnażania się limfocytów i szybkiego pobudzenia stanu zapalnego. TSST-1 może pełnić istotną rolę w patogenezie dziecięcego zapalenia migdałków podniebiennych, indukuje bowiem silną odpowiedź humoralną i komórkową u dzieci. Autorzy są zgodni, że wymaga dalszych badań czy nie jest ona kluczowym czynnikiem patogenności *S. aureus* w nawracającym zapaleniu migdałków podniebiennych (35, 36).

Zidentyfikowane 24 typy *spa* grupowały się w 8 kompleksach klonalnych (CC5, CC7, CC9, CC15, CC25, CC30, CC45, i CC398). Najczęstsze cztery kompleksy CC7, CC45, CC30 i CC5 obejmowały ponad połowę izolatów (64%). Typy *spa* t091, t084, and t002 były wykrywane najczęściej i stanowiły odpowiednio, 22,5%, 11,3% i 10%. Pozostałe typy *spa* występowały odpowiednio rzadziej, dotyczyły pojedynczych izolatów. Zidentyfikowano cztery nowe typy *spa*. Dominujący u nas t091-CC7 jest jednym z najczęściej wykrywanych klonów MSSA w Europie i był wcześniej izolowany zarówno z nosicielstwa jak i z gronkowcowych zakażeń u dzieci (37). Najnowsze badania inwazyjnych infekcji u dzieci w Polsce pokazują, że typ t091 jest powszechnie reprezentowany przez izolaty *S. aureus* pochodzące od starszych dzieci. Pozostaje to w zgodzie z naszymi wynikami, gdzie w badanej grupie nie było noworodków i niemowląt. Warto też podkreślić, że jest to klon rozpowszechniony w zakażeniach inwazyjnych nie tylko u dzieci w Europie, ale również poza nią. Ostatni raport z Chin dowodzi, że klon *spa* t091-CC7 był wykrywany w szpitalnych dziecięcych pneumoniach (38). Porównując uzyskane wyniki do analiz klonalnych gronkowców z różnych zakażeń i z nosicielstwa można stwierdzić, że nie

wyodrębniono swoistych klonów *S. aureus* ściśle związanych jedynie z nawrotowym zapaleniem migdałków.

Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują, że wśród dzieci kwalifikowanych do zabiegu tonsillektomii najczęściej izolowanym drobnoustrojem jest *S. aureus*. Izolaty gronkowca złocistego związane z RT wykazują potencjał patogenny oraz charakteryzuje je duża różnorodność genetyczna. Nie wyodrębniono swoistych klonów związanych jedynie z badaną grupą chorych, co może świadczyć, że gronkowcowe zakażenia migdałków mają charakter endogenny.

## 5. WNIOSKI

- 1) Zarówno wśród dorosłych jak i dzieci kwalifikowanych do tonsillektomii z powodu nawrotowego zapalenia migdałków podniebiennych najczęściej izolowaną potencjalnie patogenną bakterią jest *Staphylococcus aureus*.
- 2) *S. aureus* kolonizuje w obu grupach zarówno powierzchnię migdałków jak i ich wnętrze, niemniej we wnętrzu migdałków wykrywa się go statystycznie częściej, a częstość jego izolacji spada po tonsillektomii.
- 3) Gronkowce złociste związane z RT, izolowane zarówno od dorosłych jak i dzieci, wykazują najczęściej zdolność produkcji penicylinaz, rzadziej oporność typu MLS<sub>B</sub> czy MRSA.
- 4) *S. aureus* izolowane z migdałków u dzieci wykazują potencjał patogenny, ponad połowa z nich niesie geny toksyn gronkowcowych.
- 5) Gronkowce złociste izolowane z migdałków u dzieci cechuje duża różnorodność genetyczna, a dominujące wśród nich typy *spa* (t091, t084, t002) są niespecyficzne, co może dowodzić endogennego pochodzenia *S. aureus*.

## IV. SUMMARY IN ENGLISH

### 1. INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is a widespread bacterial pathogen in humans that causes skin, bone and bone marrow infections, internal abscesses, sepsis and endocarditis. The problem of staphylococcal infections also concerns to respiratory infections (1).

Recurrent Tonsillitis (RT) is one of the most common upper respiratory tract disorders in childhood and adolescence, and sometimes also affects adults. Inflammation of tonsils tends to recur, leading to chronic infections and tonsils hypertrophy. An active inflammation process can cause both local and systemic reactions such as peritonsillar abscess, rheumatic fever, glomerulonephritis, otitis media, and sometimes sepsis (2).

Antibiotic therapy is the primary method of treatment for recurrent tonsillitis. Proper diagnosis of infection etiology and the correct antibiotic selection are essential for effective pathogen eradication. This allows for a quick recovery and prevents relapses and complications. The antibiotic of choice in RT treatment is penicillin, and cephalosporins in adjusted treatment. Frequent recurrence of the disease forces repeated antibiotic therapies, which briefly bring the desired effect. In such cases, surgical removal of the palatine tonsils or tonsillectomy is justified. According to the recommendations of National Society of Otolaryngologists, the main indication for tonsillectomy are frequent relapses; from <4 do >7/year during the year preceding the procedure,  $\geq 5x$ /year during 2 preceding years,  $\geq 3x$ /year during 3 preceding years (3-6).

Although *Streptococcus pyogenes* is considered the main cause of acute pharyngitis and tonsillitis, the most commonly isolated pathogenic bacterium is *S. aureus*. An objective assessment of *S. aureus* role is hindered by the frequent carriage of staphylococci in both the nose and throat. Although recent studies indicate their involvement in tonsillitis, the role of *S. aureus* is still unclear and research on this subject is scarce (7, 8).

## 2. OBJECTIVES OF THE STUDY

- 1) Analysis of *S. aureus* prevalence in adults and children suffering from recurrent tonsillitis subjected to tonsillectomy, in swabs taken from tonsillar surface prior to tonsillectomy, from tonsillar core at the time of surgery, and from the throat after tonsillectomy.
- 2) Determination of sensitivity to antibiotics of *S. aureus* isolated from sick adults and children subjected to tonsillectomy, with particular regard to their methicillin sensitivity.
- 3) Determination of pathogenic potential of *S. aureus* isolates based on the detection of staphylococcal toxin genes/ superantigens.
- 4) Epidemiological analysis of isolated *S. aureus* based on *spa* gene typing and clonal analysis.

### 3. MATERIAL AND METHODS

The study material consisted of swabs taken in three stages from the patients subjected to tonsillectomy due to tonsillitis. The first, preoperative stage, included microbiological examination of swabs obtained from tonsillar surface. The second, intraoperative stage, included surgical specimens of both palatine tonsils; upon resection, the specimens were cut with a sterile scalpel and core swabs was subjected to microbiological examination. The third, postoperative stage, included microbiological examination of swabs from posterior pharynx, obtained after complete healing of surgical wound, 2-4 weeks post-surgery. Patients were not subjected to antibiotic therapy for at least 15 days before the procedure. The material was collected from 118 adults in the years 2002-2008 (by Dr. J. Stromkowski) and from 73 children in the years 2016-2017, who underwent tonsillectomy at the Provincial Specialist Hospital in Olsztyn at the Department of Otolaryngology and Laryngological Oncology and at the District Hospital in Bartoszyce at the Department of General and Minimally Invasive Surgery. Patients were qualified for the surgery based on medical history associated with upper respiratory tract infections and comorbidities. The physical examination included: general examination of the patient, speculum otolaryngological examination with the assessment of palatine tonsils, their size, mobility, the presence of secretion on the surface and inside them and the condition of the cervical lymph nodes.

In the analyzed group of adults there were 72 women and 46 men aged 18 to 68 years and in the examined group of children 28 girls and 45 boys, aged 2 to 17 years. The study was approved by the Independent Bioethics Committee for Scientific Research of the Medical University of Gdansk (approval number NKBBN/20/2016).

Isolation and identification of *S. aureus* isolates were carried out by classical microbiological diagnostic methods, in addition in the case of five isolates uncertain identification was confirmed by the MALDI-TOF MS method. The sensitivity of the isolated *S. aureus* to 19 selected antibiotics from various groups was initially determined by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar as recommended, sensitivity to vancomycin and gentamicin was verified by E-test, and methicillin by detection of the *mecA* gene. Induced resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS<sub>B</sub>) was determined by D-test. Bacterial DNA isolation was

performed using genomic DNA isolation kit (Sigma-Aldrich, USA) following the manufacturer's instructions. Genes of staphylococcal toxins/superantigens determining the production of enterotoxins (*sea-seu*), exfoliatins (*eta/etb*), toxic shock syndrome toxins TSST-1 (*tst*) and Pantone-Valentine leukocidins (*lukS-PV/lukF-PV*) respectively, were detected by multiplex PCR method. *Spa* types of isolated *S. aureus* were determined after sequencing short sequence repeats (SSR) of the polymorphic X-region of the protein A gene (*spa*) using Ridom Staph Type software (<http://spaserver.ridom.de>) according to the described procedure (9). Pearson's chi-squared test was used to assess differences in the prevalence of staphylococci at different study stages and differences in the frequency of toxin genes detection, assuming a  $p \leq 0.05$  value as statistically significant.



#### 4. REVIEW OF PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION

The doctoral dissertation consists of three publications, including two original articles and one review on the characteristics of *Staphylococcus aureus* strain isolated from tonsillectomized patients suffering from recurrent tonsillitis. The first original article concern the prevalence and antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolated in three stages of the study in adult patients group. The second original article includes analogous study in the children group, where the isolated *S. aureus* was additionally subjected to epidemiological analysis based on *spa* gene typing and analysis of pathogenic potential through toxin genes detection. The review summarizes in five chapters the current knowledge about the role of *S. aureus* in recurrent tonsillitis.

##### 1) *Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis. Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski.

In the first published original article, a retrospective analysis of the prevalence and antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolated from tonsillectomized adults due to tonsillitis was carried out, in accordance with the methodology described in the chapter Material and Methods.

*S. aureus* was the most often isolated bacterium at all stages of the study both from the surface of the tonsils (11.9%) and from the inside (30.5%) and from the throat after healing of the postoperative wound (5.9%). These differences were statistically important, and showed, that tonsillectomy causes a 5-fold decrease in the frequency of *S. aureus* isolation. *Staphylococcus* most often occurred in patients at one stage of the study (79.5%), less often at two stages of the study (18.2%) and only in one person on each stage of the study (2.3%). The age of the examined patients from whom *S. aureus* was isolated ranged from 18-59 years. *S. aureus* was most common in patients aged 21-30 (34.1%), slightly less often in young people aged 18-20 (25%) and least often in patients over 50 (4.5%).

Groups A, B, C, F and G of B-hemolytic streptococci occurred only in 3-12% of patients, of which *Streptococcus pyogenes* was present in 5.1% of examined patients on the surface of the tonsils, only in 1.7% inside the tonsils and in one tonsillectomized patient.

Apart from Gram-positive bacteria, Gram-negative were isolated from swabs from patients, which included: *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. They were present much less frequently and no significant differences in the frequency of isolation at subsequent stages were noted.

Antibiotic susceptibility testing of isolated *S. aureus* showed that they were all sensitive to gentamicin, amikacin, chloramphenicol, cotrimoxazole, mupirocin, teicoplanin and vancomycin, and the majority were sensitive to 10 of the 19 tested antibiotics. Resistance occurred mostly to penicillins (83.3%), individual isolates from the inside of the tonsils were resistant to clindamycin, lincomycin, erythromycin and tetracycline. The high percentage of resistance to penicillins seems to confirm the existing view of the pathogenic effect of staph by producing  $\beta$ -lactamases that protect tonsil pathogens such as *S. pyogenes* against the action of  $\beta$ -lactam antibiotics (10).

Only one methicillin-resistant *S. aureus* strain (MRSA) was isolated, which originated from the inside of the tonsils from the 35 years old patient, who suffered from recurrent angina for 4 years and was treated with antibiotic therapy 6-7 times a year. Although the problem of methicillin resistance is common in staphylococcal infections, it does not apply to *S. aureus* associated with recurrent tonsillitis. This can be explained by the smaller selective pressure of antibiotics against staphylococci that proliferate inside tonsil cells, as suggested by Zautner et al. (11).

In summary, among adult patients qualified for tonsillectomy the most common potentially pathogenic bacterium was *S. aureus*, more than twice as often as *S. pyogenes*. *S. aureus* are present mostly within tonsillar core in patients aged 21-30, and the frequency of its isolation decreased after tonsillectomy.

## **2) Role of *Staphylococcus aureus* in tonsillectomized patients with recurrent tonsillitis. Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Józef Stromkowski.**

The purpose of the review was to summarize the current state of knowledge about the role of *Staphylococcus aureus* in recurrent tonsillitis in tonsillectomized patients. The study implements the topic in the following five chapters: 1/ Recurrent tonsillitis, 2/ Tonsillectomy and indications, 3/ *Staphylococcus aureus* as a factor of

recurrent tonsillitis, 4/ Antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from tonsillitis, 5/ Biofilm role in staphylococcal tonsillitis.

The primary method of treating recurrent tonsillitis is antibiotic therapy, although in repeated relapses cases surgical removal of the tonsils or tonsillectomy may be justified (12). The first removal of palatine tonsils in Poland was carried out by Zygmunt Srebrny in 1899. Over the years the approach to tonsillectomy has changed. In the first half of the twentieth century, the procedures were performed relatively often, in sixties, after the introduction of antibiotics on the large scale, critical analysis of the legitimacy of qualifying patients for the surgery began, in particular children because of the role of tonsils in immune processes. Currently three types of indications for the tonsillectomy are distinguished: obstructive, oncological and inflammatory. The primary inflammatory indication is recurrent tonsillitis (13, 14).

In Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) it is emphasized that the indication for the surgery are inflammation flare-up cases with severe sore throat limiting or preventing the normal patient functioning. These guidelines also emphasize the importance of bacterial infection with pus-forming streptococcus (*Streptococcus pyogenes*), whose presence should be confirmed in the throat swab culture or in a rapid latex test for the presence of a specific antigen (15).

Tonsillectomy should also be considered when the recurrence of acute tonsillitis is accompanied by the following complications: cardiac valve disease, endocarditis, painful enlargement and purulent inflammation of cervical lymph nodes, the occurrence of febrile seizures, uncontrollable diabetes (16).

Performing tonsillectomy in justified cases improves the patient's quality of life. Patients operated due to inflammation confirm that after the surgery the number of relapses, of days with fever, sore throat and absence at school or work decreases significantly (4, 16-19).

Recurrent tonsillitis can be caused by viruses, bacteria, chlamydia and fungi. The proportions of infectious factors change depending on the season, the patient's age and other epidemiological conditions. Sometimes there is a difficulty in establishing RT etiology, which may result from the discrepancy between what constitutes the bacterial flora of tonsils surface and what is isolated in the cultures from inside them. Therefore in order to find the real cause of the inflammation process the bacterial flora from the tonsils inside is often examined (20-23).

*S. pyogenes* is considered the most important bacterial cause of tonsillitis, but for years the most commonly isolated pathogenic bacterium from the patients with RT is *S. aureus*, whose isolation frequency can reach up to 80%. An objective assessment of the situation is hindered by the frequent carriage of *S. aureus* in both the nose and throat. It is estimated that the percentage of permanent carriers of *S. aureus* in the nasal vestibule is 20-30%, and of temporary carriers may reach up to 60% (24). Carriage state in the throat is found in 10-40% of the healthy population, and in periods of viral infections may even exceed 40%. Therefore it seems, that the role of *S. aureus* in RT cannot be omitted and is not limited to the asymptomatic carrier. It should be emphasized, that staphylococci are isolated more often from the inside of the tonsils than from their surface. Zautner has proven, using both fluorescence in situ hybridization (FISH) and flow cytometry (FACS), that almost all RT related staphylococci have the ability to survive in the tonsils (11). This may be explained both by their ability to avoid immune response mechanisms and as well as the antibacterial activity of antibiotics. This can explain the lack of effect of repeated antibiotic therapy (26).

In conclusion, it seems that for effective antibiotic treatment of relapsed tonsillitis not only accurate individualized assessment of the patient's condition but also a comprehensive analysis of bacterial pathogens concomitance and their antibiotic resistance is necessary.

### **3) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from recurrent tonsillitis in children. Marta Katkowska, Katarzyna Garbacz, Waclaw Kopala, Jacek Bania, Justyna Schubert.**

The aim of the study, in the second published original article, was to analyze the prevalence of *Staphylococcus aureus* in the tonsils of children subjected tonsillectomy due to RT and to determine the *spa* types of the pathogens, carriage of virulence genes and antimicrobial resistance profiles.

The most commonly isolated bacteria were Gram-positive cocci, and among them *S. aureus*. Most *S. aureus* strains (63.0%) were isolated from the tonsillar core, next from the tonsillar surface (45.1%) and almost four times less from the throat after tonsillectomy (18.2%,  $p=0.007$ ). Age of adult patients with RT who carried *S. aureus* in the palatine tonsils and/or throat ranged between 2 and 17 years.

Staphylococci were most commonly isolated from persons between 5 and 8 years of age (46.3%) and were slightly less often detected from children 11-17 years of age (17.5%). Our findings are also consistent with the results reported by other authors where the prevalence of *S. aureus* isolates was from 39.1% to 65.9%. Comparing these results with data from adults, it can be concluded that *S. aureus* is more often isolated from children with RT (63.0%), than from the adults with RT (30.5%) (11, 27, 28).

Up to 67.5% of the isolates synthesized penicillinases (*blaZ*-positive isolates), and only 6.3% *S. aureus* isolates were resistant to methicillin (MRSA). In this study, we identified five *S. aureus* isolates resistant to methicillin (MRSA) (6.3%). The MRSA isolates were obtained from two children, aged 5 and 7 years, respectively. Both patients were subjected to tonsillectomy due to hypertrophy of palatine tonsils and concomitant pharyngeal tonsil hypertrophy. Both patients had a history of frequent infections, difficulty breathing and snoring, and the boy was previously treated for a peritonsillar abscess. The MRSA isolates showed multidrug resistance (MDR). Next to  $\beta$ -lactam antibiotics resistance also resistance to erythromycin, ciprofloxacin, gentamycin, doxycycline and tetracycline. Although the problem of MRSA resistance is becoming more common, it does not appear to affect *S. aureus* associated with recurrent tonsillitis. The results of our studies and studies from other authors, conducted in Europe and other continents, also suggest that the proportion of MRSA strains isolated from RT is no greater than a few per cent (11, 12, 30, 31).

We still know little about the pathogenicity of staphylococcal isolates and their role in RT. Our present study demonstrated that some virulence factors, such as enterotoxin genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* and *seu* organized within the *egc* cluster, were the most frequently present in *S. aureus* isolates from children with RT (38.8%). In line with Nowrouzian et al. findings, *egc* may be a virulence factor that promotes colonization with *S. aureus* in pediatric patients (32). The *tst* genes were isolated with less frequency in the studied *S. aureus* isolates (8.8%). TSST-1, the main staphylococcal exotoxin, is involved in the etiology of toxic shock syndrome (33, 34). It produces local mitogenic effect, stimulating replication of lymphocytes and rapid inflammatory response. TSST-1 may also play an important role in the pathogenesis of pediatric tonsillitis, as it was shown to induce strong humoral and cellular response in children. Researchers agree that future studies should center around the role of TSST-1 as a potential key virulence factor of *S. aureus* in RT (35, 36).

In this study represented a total 24 *spa* types and 8 clonal complexes (CC5, CC7, CC9, CC15, CC25, CC30, CC45, i CC398). The most common four complexes CC7, CC45, CC30 and CC5 grouped more than half of the isolates (64%). The most commonly found *spa* types, t091, t084 and t002 were represented by 22.5%, 11.3% and 10% of the isolates, respectively. Other *spa* types were observed less often and represented by single isolates. The examined material included four new *spa* types. A predominant *spa* type in our series, t091-CC7, is one of the most often found MSSA clones in Europe, isolated not only from carriers but also from invasive staphylococcal infections in children (35). A recent study of *S. aureus* clones isolated from Polish pediatric patients with invasive infections demonstrated high prevalence of the *spa* type t091, especially among isolates obtained from older children. Our findings are consistent with this observation, as the group of children with RT who tested positively for staphylococci did not include newborns and infants. It needs to be also stressed that this clone is commonly isolated from invasive pediatric infections not only in Europe but also in other continents; according to a recent report, the *spa* clone t091-CC7 was isolated from children with pneumonia hospitalized in Shanghai (China) (38). Comparing the results obtained to clonal analysis of staphylococci from various infections and from carriers, it can be concluded that specific *S. aureus* clones were not specifically associated with recurrent tonsillitis.

In conclusion, this study demonstrates that *S. aureus* is the predominant bacterial pathogen colonizing tonsils of children underwent tonsillectomy. *S. aureus* associated with RT in children showed pathogenicity potential and considerable genetic diversity, and no clones were found to be specific for this condition, which may indicate the endogenous character of *S. aureus*.

## 5. CONCLUSIONS

- 1) *Staphylococcus aureus* is the most commonly isolated potentially pathogenic bacterium in both adult and pediatric patients qualified for tonsillectomy due to recurrent tonsillitis.
- 2) *S. aureus* colonizes both the surface of the tonsils and their core, nevertheless it is detected statistically more often inside the tonsils, tonsillectomy results in less frequent isolation of *S. aureus*.
- 3) *S. aureus* isolated both from adult and pediatric patients with RT most often show penicillinase production, less often MLS<sub>B</sub> or MRSA resistance.
- 4) *S. aureus* isolated from tonsils of children with RT have pathogenic potential, more than half of them carry genes of staphylococcal toxins.
- 5) Golden staph isolated from RT is characterized by high genetic diversity, and the dominant *spa* (t091, t084, t002) types among them are non-specific, which may prove the endogenous origin of *S. aureus*.

## V. WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA/ CITATIONS LIST

1. Hemamalini V, Kavitha V, Ramachandran S. *In vitro* antibiogram pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from wound infection and molecular analysis of mecA gene and restriction sites in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Adv Pharm Technol Res 2015; 6: 170–5.
2. Yildizoglu, U, Polat B, Gumral R, Kilic A, Tosun F, et al. Effect of antibiotic use on bacterial flora of tonsil core in patients with recurrent tonsillitis. Eur Arch Otorhinolaryngol 2015; 272(6): 1525-8.
3. Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego 2010 ([www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl)).
4. American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery: Clinical practice guideline: Tonsillectomy in Children-January 2011 ([www.entnet.org/Practice/clinicalPracticeguidelines.cfm](http://www.entnet.org/Practice/clinicalPracticeguidelines.cfm)).
5. Indications for Tonsillectomy: Position Paper ENT UK –2009. National Guideline Clearinghouse | Sore throat and tonsillitis ([www.entuk.org](http://www.entuk.org)).
6. Finnish Medical Society Duodecim. Sore throat and tonsillitis. (in) EBM Guidelines. Evidence-Based Medicine [Internet]. Helsinki, Finland: Wiley Interscience. John Wiley & Sons; 2007 Feb 2 [Various] (<http://www.guideline.gov/content.aspx?id=11045&search=tonsillectomy>).
7. Berkovitch M, Bulkowstein M, Zhovtis D, Greenberg R, Nitzan Y, et al. Colonization rate of bacteria in the throat of health infants. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2002; 63(1): 19-24.
8. Nilsson P, Ripa T. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than in the anterior nares. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3334-9.
9. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, 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.
10. Fota-Markowska H, Rolla-Szczepanska R, Chudnicka AM, Modrzewska R. Profile of microorganisms isolated in nasopharyngeal swabs from the patients with acute infectious mononucleosis. Wiad Lek 2002; 55: 150–7.



11. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, et al. Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. PLoS ONE 2010; 5(3): e9452.
12. Piedrola-Maroto D, Montiel Quezel N, Lopez Rodriguez I, Monje Vega E, Casado Morente JC, et al. Present situation of antibiotic resistances in tonsillar infections. Acta Otorrinolaringol Esp 2006; 57: 171-5.
13. Chmielik M, Zając B. Operacje migdałków podniebiennych i migdałka gardłowego u dzieci. Magazyn Otorinolaryngologiczny 2003; 4: 9-16.
14. Gryczyńska D, Krawczyński M, Andrzejewski J, Zakrzewska A. Nowe tendencje w leczeniu operacyjnym migdałków u dzieci. Magazyn Otorinolaryngologiczny 2005; 8: 27-30.
15. SIGN. Management of sore throat and indications for tonsillectomy. A National clinical guideline, 117 (<http://www.sign.ac.uk/pdf/sign117.pdf>).
16. Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery. Wyd. 5. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, Thomas JR (red.). Expert Consult – Online, 2011.
17. Burton MJ, Glasziou PP. Tonsillectomy or adenotonsillectomy versus nonsurgical treatment for chronic/recurrent acute tonsillitis. Cochrane Database Syst Rev 2009; 21: CD001802.
18. Koskenkorva T, Koivunen P, Penna T, Teppo H, Alho OP. Factors affecting quality-of-life impact of adult tonsillectomy. J Laryngol Otol 2009; 123(9): 1010-4.
19. Paradise JL, Bluestone CD, Colborn DK, Bernard BS, Rockette HE, et al. Tonsillectomy and adenotonsillectomy for recurrent throat infection in moderately affected children. Pediatrics 2002; 110: 7-15.
20. Gul M, Okur E, Ciragil P, Yildirim I, Aral M, et al. The comparison of tonsillar surface and core cultures in recurrent tonsillitis. Am J Otolaryngol 2007; 28(3): 173-6.
21. Bista M, Amatya RC, Basnet P. Tonsillar microbial flora: a comparison of infected and noninfected tonsils. Kathmandu Univ Med J (KUMJ) 2006; 4(1): 18-21.
22. Brook I. The role of anaerobic bacteria in tonsillitis. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2005; 69(1): 9-19.
23. Cafferkey MT, Timon CI, O'Regan M, Walsh M. Effect of preoperative antibiotic treatment on the bacterial content of the tonsil. Clin Otolaryngol Allied Sci 1993; 18(6): 512-6.

24. Kluytmans A, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-20.
25. Taylan I, Ozcan I, Mumcuoğlu I, Baran I, Murat Ozcan K, et al. Comparison of the surface and core bacteria in tonsillar and adenoid tissue with Beta-lactamase production. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg 2011; 63(3): 223-8.
26. Courvalin P, Trieu-Cuot P. Minimizing potential resistance: the molecular view. Clin Infect Dis 2001; 33: 138-46.
27. Loganathan A, Arumainathan UD, Raman R. Comparative study of bacteriology in recurrent tonsillitis among children and adults. Singapore Med J 2006; 47: 271-5.
28. Brook I, Foote PA. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from the surface and core of tonsils in children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2006; 70: 2099-102.
29. Katkowska M, Garbacz K, Stromkowski J. *Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis. APMIS 2017;125:46-51.
30. Jeong JH, Lee DW, Ryu RA, Lee YS, Lee SH, et al. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. Laryngoscope 2007; 117: 2146-51.
31. Alasil SM, Omar R, Ismail S, Yusof MY, Dhabaan GN, et al. Evidence of bacterial biofilms among infected and hypertrophied tonsils in correlation with the microbiology, histopathology, and clinical symptoms of tonsillar diseases. Int J Otolaryngol 2013; 2013: 408238.
32. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, et al. Adhesin and superantigen genes and the capacity of *Staphylococcus aureus* to colonize the infantile gut. J Infect Dis 2011; 204: 714-21.
33. Schlievert PM, Nemeth KA, Davis CC, Peterson ML, Jones BE. *Staphylococcus aureus* exotoxins are present in vivo in tampons. Clin Vaccine Immunol 2010; 17: 722-7.
34. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin f, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. Lancet 1981; 1: 1017-21.
35. Chen Y, Huang Y, Liang B, Dong H, Yao S, et al. Inverse relationship between toxic shock syndrome toxin-1 antibodies and interferon-gamma and interleukin-6 in

peripheral blood mononuclear cells from patients with pediatric tonsillitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2017; 97: 211-7.

36. Radcliff FJ, Clow F, Mahadevan M, Johnston J, Proft T, et al. A potential role for staphylococcal and streptococcal superantigens in driving skewing of TCR V $\beta$  subsets in tonsillar hyperplasia. *Med Microbiol Immunol* 2017; 206: 337-46.
37. Ilczyszyn WM, Sabat AJ, Akkerboom V, Szkarlat A, Klepacka J, et al. Clonal structure and characterization of *Staphylococcus aureus* strains from invasive infections in paediatric patients from South Poland: Association between age, *spa* types, clonal complexes, and genetic markers. *PLoS One* 2016; 11: e0151937.
38. Song Z, Gu FF, Guo XK, Ni YX, He P, et al. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* causing childhood pneumonia in Shanghai. *Front Microbiol* 2017; 8: 455.

Publikacja przeglądowna:

<https://www.otorynolaryngologia-pk.pl/f/file/orl-16-4-2p-katkowska.pdf>

Prace oryginalne:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/apm.12628>

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/apm.13007>