



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ
(ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ, ΤΟΞΙΝΟΓΕΝΕΣΗ) ΣΤΕΛΕΧΩΝ
STAPHYLOCOCCUS ΠΡΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Κ. ΤΣΑΡΠΑΛΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ
(ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ, ΤΟΞΙΝΟΓΕΝΕΣΗ) ΣΤΕΛΕΧΩΝ
STAPHYLOCOCCUS ΠΡΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Κ. ΤΣΑΡΠΑΛΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
2017

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΝΔΡΕΑΝΑ ΠΕΞΑΡΑ
(ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΘ)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΓΚΟΒΑΡΗΣ (ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΘ)

ΑΝΔΡΕΑΝΑ ΠΕΞΑΡΑ (ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΘ)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΘ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ (ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ, ΤΟΞΙΝΟΓΕΝΕΣΗ) ΣΤΕΛΕΧΩΝ *STAPHYLOCOCCUSSPP* ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΧΟΙΡΟΥΣ

Οι αμυγδαλές των χοίρων αποτελούν δεξαμενές παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων. Μεταξύ των παθογόνων αυτών βακτηρίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα είδη *Staphylococcus* spp. *S. aureus* είναι ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο, που μπορεί να προσβάλει τους ανθρώπους και τα ζώα. Είναι επίσης και σημαντικό τροφιογενές παθογόνο βακτήριο καθώς ορισμένα στελέχη του μπορούν να παράγουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες στα τρόφιμα και να προκαλέσουν σταφυλοκοκκική τοξίνωση. Από την ομάδα των πηκτάση αρνητικών σταφυλόκοκκων (Coagulase Negative Staphylococci, CNS) οι *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* και *S. saprophyticus* έχουν ιδιαίτερη σημασία λόγω των επιπτώσεών τους στον άνθρωπο, αλλά και λόγω της πρόσφατης αυξανόμενης συχνότητας των συγκεκριμένων CNS ως αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων. Τα τελευταία χρόνια η απομόνωση πολυανθεκτικών στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στελεχών *Staphylococcus* spp. αποτελεί νέο αναδυόμενο πρόβλημα στην κτηνιατρική και μείζον θέμα για τη Δημόσια Υγεία.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής αντοχής των στελεχών *Staphylococcus* spp. και η διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής των κλασικών τύπων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών από τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από αμυγδαλές σφάγιων χοίρων από βιομηχανικά σφαγεία της Περιφερειακής Ενότητας Καρδίτσας. Κατά το χρονικό διάστημα από Νοέμβριο έως Δεκέμβριο του 2015 συλλέχθηκαν 77 δείγματα αμυγδαλών από σφάγια χοίρων. Από αυτά στα 35 δείγματα απομονώθηκαν *Staphylococcus* spp. (45,45%) ενώ 13 από αυτά τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *S. aureus* (37,14%) και 22 δείγματα ως CNS (62,86%).

Τα 13 στελέχη *S. aureus* εξετάστηκαν για την ικανότητα παραγωγής των κλασικών εντεροτοξινών (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) χρησιμοποιώντας την ειδική τυποποιημένη ανοσοενζυμική δοκιμή Kit Ridascreen, SET-Total (R-Biopharm, Germany) που βασίζεται στην τεχνική ELISA και όλα τα στελέχη βρέθηκαν αρνητικά στην παραγωγή των εντεροτοξινών. Τα 35 στελέχη *Staphylococcus* spp. που απομονώθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 12 αντιβιοτικά (P, OX, FOX, E, TE, CC, GM, CIP, FA, C, SXT) με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν ήταν ανθεκτικό στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (P, OX, FOX) ενώ αρκετά στελέχη ήταν πολυανθεκτικά εκφράζοντας αντοχή σε περισσότερα από τρία αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα τα στελέχη *S. aureus* παρουσίασαν 100% πολυανθεκτικότητα και από τους CNS 54,54% ήταν ανθεκτικά σε τρία ή περισσότερα αντιβιοτικά. Στο σύνολο των στελεχών *Staphylococcus* spp. που εξετάστηκαν τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής παρουσιάστηκαν στη CC, TE με ποσοστά 68,57% (24 από τα 35 στελέχη) και 65,71% (23 από τα 35 στελέχη) αντίστοιχα. Η χαμηλότερη αντοχή στο σύνολο των στελεχών ανιχνεύθηκε στο FA με ποσοστό 15,62% (5 από τα 35 στελέχη) ενώ όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στη GM και τη VA.

Στην παρούσα μελέτη δεν απομονώθηκαν στελέχη MRSA αλλά στελέχη MSSA τα οποία εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Επίσης όλα τα στελέχη των CNS ήταν ευαίσθητα στα β-λακταμικά, όμως αρκετά εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Η παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών *Staphylococcus* spp. στις αμυγδαλές χοίρων είναι εξαιρετικής σημασίας για τη Δημόσια Υγεία καθώς μπορεί να αποτελέσει πηγή πρόσληψης για τον άνθρωπο και να συμβάλει στη διασπορά αυτών των μικροοργανισμών στην κοινότητα.

Παναγιώτα Τσαρπαλή, Μάρτιος 2017

Λέξεις-Κλειδιά: αμυγδαλές, αντιβιοαντοχή, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, σφάγια χοίρου.

ABSTRACT

STUDY OF MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS (ANTIBIOTIC RESISTANCE, ENTEROTOXIGENICITY) IN *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLATED FROM PIGS

The tonsils of pigs harbor both pathogenic and non-pathogenic bacteria. Among the various porcine bacterial pathogens, *Staphylococcus* spp. are of particular interest. *S. aureus* is an opportunistic pathogen that can cause a wide variety of diseases in humans and animals. It is also an important human foodborne pathogen. Certain strains of *S. aureus* can produce staphylococcal enterotoxins (SEs) in foods and cause food intoxication in humans. Among the Coagulase Negative Staphylococci (CNS), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus* are of significant concern due to their clinical manifestations in humans and implication as causative agents in the rising incidence rates of nosocomial infections. In recent years, the isolation of multiple antimicrobial resistant staphylococci from animals is a new emerging issue in veterinary medicine and a major public health concern.

The aims of this study were to estimate i) the antibiotic susceptibility of the *Staphylococcus* spp. isolated from the tonsils of pigs carcasses from a slaughterhouse in the Regional Unity of Karditsa. and ii) the enterotoxigenicity of the *S. aureus* isolates. A total of 77 samples of pig tonsils were collected and examined from November to December 2015. *Staphylococcus* spp. were isolated in 35 samples out of 77 (45.45%), 13 were identified as *S. aureus* (37.14%) and 22 as CNS (62.86%).

The 13 *S. aureus* isolates were tested for the production of the classical enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) using the commercial enzyme immunoassay Kit Ridascreen, SET-Total (R-Biopharm, Germany) and all were found negative for the production of SEs. The antibiotic susceptibility of the 35 *Staphylococcus* spp. isolates to 12 antibiotics/antibiotic combinations was determined by the disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI 2013) on Mueller-Hinton agar (Kirby Bauer test) plates. None of isolates were resistant to β -lactam antibiotics (P, OX, FOX) while several strains displayed multiple antimicrobial resistance. Whereas the *S. aureus* strains displayed a 100% multidrug resistance, among the CNS isolates 54.54% were found to be resistant to 3 or more antimicrobial agents. Overall, the highest level of antimicrobial resistance was observed to CC (68.57%, 24/35 strains) followed by TE (65.71%, 23/35 strains). The lowest resistance rate was reported towards FA (15.62%, 5/35) while all the *Staphylococcus* spp. were found to be susceptible to GM and VA.

In conclusion, in the present study MRSA strains were not detected in the tonsils of pig carcasses; however MSSA strains that displayed multiple antimicrobial resistance to the clinically used antimicrobial agents were isolated. In addition, all the CNS strains were susceptible to β -lactams but multiple antibiotic resistance was found in tested isolates. The presence of multiple antimicrobial resistant *Staphylococcus* spp. in the tonsils of pigs represent a major Public Health issue as it may be a potential source of infection to humans with the additional risk of rapid spread of these strains within the community.

PanagiotaTsarpali, March 2017

Keywords: antimicrobial resistance, *Staphylocccus* spp., *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins, tonsils, pig carcasses.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	v
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	4
<i>Staphylococcus</i> spp	4
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	4
1.2 Μικροβιολογία του Γένους των Σταφυλόκοκκων.....	5
1.2.1 Ταξινόμηση και Ιδιότητες.....	5
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.3.1 Μορφολογία	6
1.3.2 Δομή του Κυτταρικού Τοιχώματος	7
1.3.3 Λοιμογόνοι Παράγοντες- Παθογόνος Δράση	7
1.3.4 Λοιμώξεις από τον <i>S. aureus</i>	8
1.4 Πηκτάση Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci)	10
1.4.1 Παθογένεια των Πηκτάση Αρνητικών Σταφυλόκοκκων.....	10
1.4.2 Λοιμώξεις από τους Πηκτάση Αρνητικούς Σταφυλόκοκκους.....	10
1.5 Επιδημιολογία του Σταφυλόκοκκου.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	13
Σταφυλόκοκκος και Τρόφιμα	13
2.1 Γενικά	13
2.2 Ανάπτυξη του <i>S. aureus</i> στα Τρόφιμα.....	14
2.3 Ιδιότητες των Σταφυλοκοκκικών Εντεροτοξινών (ΣΕΞ)	14
2.4. Ταυτοποίηση των Σταφυλόκοκκων.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	20
Σταφυλόκοκκοι: Θεραπευτική Αντιμετώπιση και Αντοχή στα Αντιβιοτικά	20
3.1 Θεραπευτική Αντιμετώπιση των Σταφυλόκοκκων	20
3.2 Αντοχή των Σταφυλόκοκκων στα Αντιβιοτικά.....	22
3.2.1 Μηχανισμοί Αντοχής.....	22
3.2.1.1 Αντοχή στα β-Λακταμικά	22
3.2.1.2 Γενετική της Αντοχής Έναντι στη Μεθικιλίνη.....	23
3.2.1.3 Αντοχή στις Αμινογλυκοσίδες	25

3.2.1.4 Αντοχή στις Μακρολίδες- Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη Β (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B	26
3.2.1.5 Αντοχή στα Γλυκοπεπτίδια	26
3.2.1.6 Αντοχή στις Τετρακυκλίνες	27
3.2.1.7 Αντοχή στις Κινολόνες	28
3.2.1.8 Αντοχή στο Φουσιδικό Οξύ	28
3.2.1.9 Αντοχή στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφοναμίδες	28
3.2.1.10 Αντοχή στη Χλωραμφενικόλη.....	29
3.2.1.11 Αντοχή στις Οξαζολιδινόνες-Λινεζολίδη	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	31
Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά Στελεχών <i>Staphylococcus</i> spp. στους Χοίρους	31
4. 1. Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά Στελεχών <i>S. aureus</i> στους Χοίρους.....	31
4.2 MRSA και η Παρουσία του στους Χοίρους	32
4.3 Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά CNS στους Χοίρους	35
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
1.1 Υλικό-Δείγματα.....	39
1.2 Διερεύνηση Της Ικανότητας Παραγωγής Εντεροτοξινών από τα Απομονωθέντα Στελέχη <i>S. aureus</i>	39
1.3 Έλεγχος Ευαισθησίας των Απομονωθέντων Στελεχών στα Αντιβιοτικά.....	40
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
2.1. Διερεύνηση της Ικανότητας Παραγωγής Εντεροτοξινών από τα Απομονωθέντα Στελέχη <i>S. aureus</i>	40
2.2. Έλεγχος Ευαισθησίας των Απομονωθέντων Στελεχών στα Αντιβιοτικά.....	40
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
3.1 Ανίχνευση Εντεροτοξινογόνων Στελεχών <i>S. aureus</i>	44
3.2 Αντιβιοαντοχή των Απομονωθέντων Στελεχών <i>Staphylococcus</i> spp	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

*Στους γονείς μου Κυριάκο και Αναστασία που μου
έδωσαν τα εφόδια να γίνω πολίτης του κόσμου...*

*Στον σύζυγό μου Άγη και στα παιδιά μου Αλκίνοο και
Αλκμήνη σαν ένα μικρό "ευχαριστώ"...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ανδρεάνα Πεξαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική αυτή εργασία. Η συμβολή της στην περάτωση της παρούσας μελέτης υπήρξε καθοριστική και ανεκτίμητη καθώς οι υποδείξεις και παρατηρήσεις της ήταν πάντα γόνιμες και εποικοδομητικές. Την ευχαριστώ θερμά για την άψογη και αρμονική συνεργασία που είχαμε, τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγηση, τη διαρκή και αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που μου έδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Η άρτια επιστημονική της κατάρτιση και η μεθοδικότητά της αποτέλεσαν για εμένα πηγή γνώσης και έμπνευσης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Καθηγητή ΠΘ, και τον κ. Νικόλαο Σολωμάκο, Επίκουρο Καθηγητή ΠΘ, για την άριστη συνεργασία που είχαμε, την επιστημονική καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια της μελέτης αυτής, για τις πολύτιμες και εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές τους καθώς και για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου Κυριάκο και Αναστασία Τσαρπαλή για την ενθάρρυνση και την ουσιαστική στήριξη και συμπαράσταση που έδειξαν σε όλη αυτή την προσπάθειά μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον σύζυγό μου Άγη Αλεξόπουλο για την ειλικρινή στήριξη, κατανόηση και υπομονή που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση Σταφυλόκοκκων	Σελ. 6
Πίνακας 1.2. Λοιμώξεις που προκαλούνται από τον <i>S. aureus</i>	Σελ. 9
Πίνακας 1.3. Ιδιότητες <i>S. aureus</i> και ΣΕ	Σελ.17
Πίνακας 1.4. Αντιβιοτικά προτεινόμενα για τον έλεγχο των σταφυλόκοκκων (CLSI, 2009).	Σελ.21
Πίνακας 1.5. Ζώνη αναστολής στελεχών σταφυλόκοκκων έναντι της οξακιλλίνη (OX).	Σελ.24
Πίνακας 2.1. Εξεταζόμενα στελέχη <i>Staphylococcus spp.</i> που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων	Σελ.38
Πίνακας 2.2. Αντοχή των στελεχών <i>Staphylococcus spp.</i> που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά	Σελ.40
Πίνακας 2.3. Φαινότυποι αντοχής των στελεχών <i>Staphylococcus spp.</i> που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων στα αντιβιοτικά	Σελ.42

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η στοματική κοιλότητα, κυρίως οι αμυγδαλές, παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού κατά των παθογόνων μικροοργανισμών αφού λειτουργούν ως δευτερογενές λεμφικό όργανο το οποίο ξεκινά την ανοσολογική αντίδραση εναντίον των παθογόνων (Horteret al, 2003). Γενικά, οι αμυγδαλές των χοίρων αποτελούν δεξαμενές παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων. Από τα παθογόνα βακτήρια ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα είδη *Staphylococcus* spp. τα οποία παρατηρούνται συχνά στις αμυγδαλές των χοίρων (Devriese et al, 1994; Lowe et al, 2011).

Το γένος των σταφυλόκοκκων περιλαμβάνει περισσότερα από 35 είδη με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες με βάση την ταξινόμηση των Kloos και Schleifer (1975). Ο *S. aureus* είναι το σπουδαιότερο παθογόνο είδος για τον άνθρωπο και τα ζώα. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του φάρυγγα, της ρινικής κοιλότητας και του δέρματος ανθρώπων και ζώων. Μπορεί να προσβάλλει όλα τα όργανα και τους ιστούς και προκαλεί κυρίως πυώδεις φλεγμονές (LeLoiret al, 2003). Επιπλέον ο *S. aureus* είναι ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια καθώς ευθύνεται για τα περισσότερα περιστατικά της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης. Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση προκαλείται από την πρόσληψη με τα τρόφιμα μίας ή περισσότερων προσχηματισμένων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών (ΣΕ) που παράγονται από εντεροτοξινογόνα στελέχη σταφυλόκοκκων (LeLoiret al, 2003; Pexara et al, 2010).

Οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CNS) γενικά αποικίζουν το δέρμα και τους βλεννογόνους. Οι νόσοι που προκαλούνται από τους CNS είναι κυρίως νοσοκομειακής προέλευσης και σχετίζονται με παρεμβατικούς και θεραπευτικούς διαγνωστικούς χειρισμούς, ξένα σώματα και προσθετικά υλικά καθώς και άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες (πχ. ανοσοκαταστολή) (Pfaller and Herwaldt, 1988). Από την ομάδα των πηκτάση αρνητικών σταφυλόκοκκων οι *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* και *S. saprophyticus* έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία λόγω των επιπτώσεών τους στον άνθρωπο αλλά και λόγω της πρόσφατης αυξανόμενης συχνότητας των συγκεκριμένων CNS ως αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων (Pfaller and Herwaldt, 1988).

Τα τελευταία χρόνια η απομόνωση πολυανθεκτικών στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στελεχών *S. aureus* αποτελεί νέο αναδυόμενο πρόβλημα στην κτηνιατρική και μείζον θέμα για τη Δημόσια Υγεία. Πρόσφατες μελέτες περιγράφουν τη μετάδοση πολυανθεκτικών στελεχών *S. aureus* από τους χοίρους στον άνθρωπο ιδιαίτερα λόγω επαγγελματικής επαφής με το ζώο ή και μέσω των ζωικών προϊόντων (Orpliger et al, 2012). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια η επιδημιολογία του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) έχει αλλάξει. Αρχικά ήταν ένα ενδονοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο, ενώ από το 1990 έχουν καταγραφεί περιστατικά σε ανθρώπους που δεν είχαν καμία επιδημιολογική σχέση με νοσοκομεία. Το 2005 η παρουσία ενός ξεχωριστού κλώνου MRSA στους χοίρους (CC398) και η μετάδοσή του στους ανθρώπους καταγράφηκε για πρώτη φορά (Vosset al, 2005; Pexara et al, 2010; Morcillo et al, 2015). Τα MRSA στελέχη θεωρούνται ανθεκτικά σε όλες τις κεφαλοσπορίνες, κεφεπέμες, και άλλα β-λακταμικά πχ. αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, καρβαπενέμες, άσχετα από τα αποτελέσματα της invitro ευαισθησίας. Επιπρόσθετα, τα στελέχη MRSA συνήθως εκτός από τα β-λακταμικά

παρουσιάζουν αντοχή και στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, όπως αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, τετρακυκλίνες, και φλουοροκινολόνες (Lee, 2003).

Τα τελευταία χρόνια επίσης η αντιμικροβιακή αντοχή των ειδών CNS έχει αυξηθεί δραματικά εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης των αντιβιοτικών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα για θεραπευτικούς σκοπούς ή μη (Podkowiketal, 2013). Τα στελέχη CNS που φέρουν τα παραγωγικά ζώα είναι δυνατό να μολύνουν τα προϊόντα ζωικής προέλευσης, να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα και να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των χειριστών τροφίμων και των καταναλωτών. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση πολυανθεκτικών CNS θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή όταν ένα ζώο ή ένας άνθρωπος νοσήσει (BhargavaandZhang, 2012).

Στην κτηνοτροφία αντιμικροβιακοί παράγοντες χορηγούνται σε μεγαλύτερες δόσεις για θεραπευτικούς σκοπούς και συχνά έχουν χορηγηθεί και προληπτικά πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων στα ζώα. Επιπλέον σε μικρότερες δόσεις έχουν χορηγηθεί για μη θεραπευτικούς σκοπούς όπως η βελτίωση της αποδοτικότητας των ζωοτροφών και η ενίσχυση της ανάπτυξης του ζώου (Wegener, 2003). Η δημιουργία ανθεκτικών στελεχών οφείλεται στη μακροχρόνια χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων η οποία προκαλεί πίεση επιλογής τους με επακόλουθη διασπορά και επικράτηση πολυανθεκτικών κλώνων (Aarestrupetal, 2000; Chapinetal, 2005).

Το φαινόμενο αυτό της αντοχής έχει ιδιαίτερη βαρύτητα για τη Δημόσια Υγεία. Η κατανάλωση χοιρινού κρέατος και των προϊόντων του αποτελούν οδό έκθεσης και διάδοσης ανθεκτικών μικροοργανισμών από τους χοίρους στον άνθρωπο (Hayesetal, 2003; Whiteetal, 2001). Επομένως ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στα ανθεκτικά στελέχη *Staphylococcus* spp. που απομονώνονται από φάρμες χοίρων καθώς ο μικροοργανισμός αποτελεί πηγή ανθρώπινης πρόληψης είτε μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων είτε μέσω της επαφής με τα μολυσμένα ζώα (Lee, 2003).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής αντοχής των στελεχών *Staphylococcus* spp. και η διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής των κλασικών τύπων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών από τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από αμυγδαλές σφάγιων χοίρων από σφαγεία της Περιφερειακής Ενότητας Καρδίτσας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

*Staphylococcus*spp.

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι σταφυλόκοκκοι για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν από τον Robert Koch το 1878 ενώ το 1880 καλλιεργήθηκαν από τον Pasteur σε υγρά θρεπτικά υλικά (Kloos and Wolfshohl, 1991).

Ο Sir Alexander Ogston, Σκωτσέζος χειρουργός, απέδειξε ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί ευθύνονταν για την πρόκληση πυογόνων λοιμώξεων στον άνθρωπο. Το 1882 εισήγαγε για αυτά τα μικρόβια την ονομασία "σταφυλόκοκκοι" που προέρχεται από την ελληνική λέξη "σταφυλή" και σημαίνει "τσαμπί από σταφύλι" και τη λέξη "κόκκος". Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι μικροσκοπικώς Gram-θετικοί κόκκοι οι οποίοι διατάσσονται σε ομάδες που μοιάζουν με τσαμπιά σταφυλιού (Ogston, 1881).

Το 1884 ο Anton J. Rosenbach, Γερμανός χειρουργός, κατάφερε να απομονώσει από φλεγμονές δύο είδη σταφυλόκοκκων, τα οποία διαχώρισε και ονόμασε με βάση το χρώμα των αποικιών τους: α) χρυσιζών σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*), λόγω των χρυσοκίτρινων αποικιών του, β) λευκός σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus albus*) λόγω των λευκών αποικιών του (Rosenbach, 1884; Rupp et al, 1994). Ο *S. aureus* προκαλούσε λοιμώξεις του δέρματος με τάση για διαπύηση και σχηματισμό αποστήματος ιδιαίτερα μετά από τραυματισμούς καθώς και τη δοθιήνωση, μία φλεγμονή των τριχικών θυλάκων που εξελίσσεται σε πυώδη συλλογή. Ο *S. albus*, ο οποίος μετά ονομάστηκε *S. epidermidis*, αποτελούσε μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας και θεωρείτο μη παθογόνος μικροοργανισμός (Rosenbach, 1884).

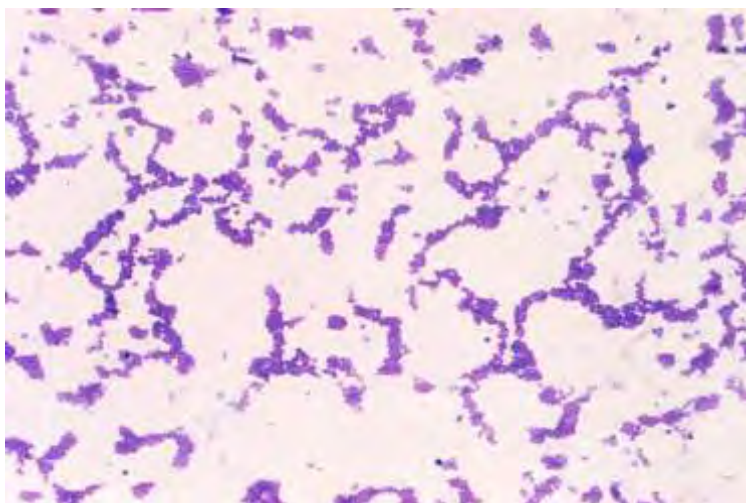
Οι Kolle and Otto το 1902 πρότειναν την ορολογική ταξινόμηση των παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών βασισμένοι στη μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης. Ο Loeb το 1903 απέδειξε ότι ο *S. pyogenes aureus* είχε την ικανότητα να προκαλεί πήξη του πλάσματος σε αντίθεση με τον *S. epidermidis albus* (Loeb et al, 1903). Το 1935 οι Menkin and Watson ανέφεραν ότι για τις σταφυλοκοκκικές οργανικές βλάβες ευθύνονταν τοξίνες που παράγονταν από το βακτήριο και όχι η πηκτάση (κοαγκουλάση). Αργότερα, ο Duthie (1954) περιέγραψε την ύπαρξη δύο μορφών σταφυλοκοκκικής πηκτάσης: την συνδεδεμένη πηκτάση (clumping factor ή bound coagulase) και την ελεύθερη πηκτάση (free coagulase) (Archer and Crossley, 1997; Duthie et al, 1954).

1.2 Μικροβιολογία του Γένους των Σταφυλόκοκκων

1.2.1 Ταξινόμηση και Ιδιότητες

Οι σταφυλόκοκκοι ανήκουν στην οικογένεια των *Micrococcaceae* (Kloos, 1997; PfallerandHerwaldt, 1988). Πρόκειται για μια ομάδα θετικών κατά Gram μικροοργανισμών αερόβιοι, προαιρετικά αναερόβιοι, θετικοί στην δοκιμή καταλάσης και αρνητικοί στη δοκιμή οξειδάσης (LeLoiretal, 2003; PfallerandHerwaldt, 1988).

Είναι ακίνητοι, μη σπορογόνοι κόκκοι με διάμετρο περίπου 0,8-1,0 μm οι οποίοι διατάσσονται σε ζεύγη, τετράδες ή σε ομάδες που μοιάζουν με τσαμπιά σταφυλιού όπως φαίνεται και στην εικόνα 1. Δεν είναι ελυτροφόρα βακτήρια με εξαίρεση μερικά στελέχη που φέρουν ένα λεπτό περίβλημα από αμινογλυκουρονικό οξύ (Κουσκούνη και Τσελένη-Κωτσοβίλη, 2005).



Εικόνα 1. Gram θετικοί κόκκοι *S. aureus* σε ζεύγη, τετράδες και μάζες όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο.

Το γένος των σταφυλόκοκκων περιλαμβάνει περισσότερα από 35 είδη με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες (πίνακας 1) με βάση την ταξινόμηση των Kloos και Schleifer (1975). Ο *S. aureus* αποτελεί το σπουδαιότερο παθογόνο είδος για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που τον ξεχωρίζει από τα άλλα είδη του γένους *Staphylococcus* είναι η ικανότητά του να παράγει το ένζυμο πηκτάση και επομένως να προκαλεί πήξη του πλάσματος καθώς και το ότι παράγει θερμοσταθερές νουκλεάσες που διασπούν το DNA (LeLoiretal, 2003). Ο *S. epidermidis* είναι ο δεύτερος σε σειρά συχνότητας παθογόνος μικροοργανισμός του γένους (Archer, 1990).

Ορισμένα είδη που κατατάσσονται στην ομάδα των Απροσδιορίστων όπως ο *S. hyicus*, και ο *S. intermedius* παράγουν συνδεδεμένη πηκτάση, είναι παθογόνα και απαντώνται μόνο στα ζώα καθώς αποικίζουν το δέρμα, το στόμα και τη μύτη πτηνών, σκύλων και

αλόγων κυρίως (Sasaki et al., 2007). Οι *S. lugdunensis* και *S. schleiferi* παράγουν συνδεδεμένη πηκτάση (Αρσένη, 1994; Sasaki et al., 2007).

Από την ομάδα των πηκτάση αρνητικών σταφυλόκοκκων (Coagulase Negative Staphylococci) ο *S. epidermidis* και ο *S. saprophyticus* έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία (Pfaller and Herwaldt, 1988).

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση Σταφυλόκοκκων.

<i>S. aureus</i> sp. group	<i>S. epidermidis</i> sp. group	<i>S. simulans</i> sp. group	<i>S. sciuris</i> sp. group	<i>S. saprophyticus</i> sp. group	Απροσδιόριστα
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. intermedius</i>
	<i>S. hominis</i>			<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	<i>S. hyicus</i>
	<i>S. saccharolyticus</i>			<i>S. xylosus</i>	<i>S. caseolyticus</i>
	<i>S. warneri</i>			<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
	<i>S. caprae</i>				
	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>			<i>S. equorum</i>	<i>S. chromogenes</i>
	<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>			<i>S. gallinarum</i>	
	<i>S. schleiferi</i>			<i>S. succinus</i>	
	<i>S. lugdunensis</i>			<i>S. kloosii</i>	

Πηγή: Kloos and Bannerman, 1994; Pfaller and Herwaldt, 1988.

1.3 *Staphylococcus aureus*

1.3.1 Μορφολογία

Ο *S. aureus* αναπτύσσεται εύκολα στα συνήθη θρεπτικά υλικά όπως το αίμα, το χόλαρ, το Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (άγαρο από εκχύλισμα εγκεφάλου-καρδιάς), το Nutrient Agar (NA, θρεπτικό άγαρο). Συχνά χρησιμοποιείται το αλατούχο με μαννιτόλη άγαρο κατά Charman το οποίο είναι εκλεκτικό και διαφοροποιητικό υλικό για την

απομόνωση του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου όταν στο δείγμα που ενοφθαλμίζεται συνυπάρχουν και άλλα είδη βακτηρίων. Για την απομόνωση του σταφυλόκοκκου μπορεί να χρησιμοποιηθεί το Columbia άγαρ με κολιστίνη και ναλιδιξικό οξύ (CNA), ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Koneman, 2006).

Επιπλέον, ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε μεγάλες θερμοκρασιών (7,0-48,5° C), με ευνοϊκότερη θερμοκρασία αυτών 30-37° C (Pexara et al, 2010; Smith et al, 1983). Οι αποικίες του είναι στρογγυλές, γυαλιστερές με διάμετρο 2-3 mm, αδιαφανείς και έχουν χροιά χρυσοκίτρινη. Μερικές φορές στο αιματούχο άγαρ παρατηρείται ζώνη αιμόλυσης λόγω παραγωγής αιμολυσίνης.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του είναι: α) η παραγωγή του εξωκυττάριου ενζύμου πηκτάση (ελεύθερη πηκτάση), β) η παραγωγή της δεσμευμένης πηκτάσης (μιας πρωτεΐνης συνδεδεμένης στην επιφάνειά του) και γ) η παραγωγή μιας θερμοανθεκτικής νουκλεάσης, τη δεοξυριβονουκλεάση (DNAse), η οποία διασπά το DNA. Ζυμώνει την γλυκόζη, τη μαννιτόλη, τη λακτόζη και άλλα σάκχαρα (Δημητρακόπουλος, 1987).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι πολύ ανθεκτικά βακτήρια, καθώς αντέχουν στην ξηρασία του ατμοσφαιρικού αέρα και στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος της τάξης του 15% NaCl. Αναπτύσσονται σε συνθήκες pH μεταξύ 4,2-9,3 με βέλτιστη τιμή 7,0-7,5 και σε ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού a_w 0.86 με άριστη ανάπτυξη μεταξύ 0,93-0,96 (Bergdoll, 1989; FDA 2012; LeLoiret al, 2003). Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών του, ο *S. aureus* μπορεί να αναπτυχθεί σε πολλά διαφορετικά τρόφιμα.

1.3.2 Δομή του Κυτταρικού Τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα των σταφυλόκοκκων αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη (μουκοπεπτίδιο) και τειχοϊκά οξέα (πολυμερή της γλυκερόλης ή της ριβιτόλης) τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη αντιπροσωπεύει το κύριο μακρομόριο καθώς αποτελεί το 50% του βάρους του τοιχώματος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παθογόνο δράση του σταφυλόκοκκου (Archer and Crossley, 1997; Waldvogel, 2000).

Στο κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* βρίσκονται η μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη A η οποία δρα ως παράγοντας λοιμογονικότητας καθώς συνδέεται με το Fc κλάσμα της IgG ανοσοσφαιρίνης, και οι πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-Binding Proteins, PBPs), ένζυμα τα οποία δρουν στην σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, και σχετίζονται με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Δημητρακόπουλος, 1987; Karakawa, 1992).

1.3.3 Λοιμογόνοι Παράγοντες- Παθογόνος Δράση

Η παθογόνος δράση του *S. aureus* είναι ανάλογη της ικανότητάς του να παράγει μια σειρά εξωκυττάριων ουσιών (τοξίνες, ένζυμα) αλλά και στην ικανότητά του να εισβάλλει ο μικροοργανισμός μέσα στους ιστούς του ξενιστή.

Ο *S. aureus* παράγει πολλές τοξικές ουσίες (τοξίνες, ένζυμα και εξωκυττάρια πρωτεΐνες) οι οποίες ενισχύουν την παθογόνο δράση του και ευθύνονται για τα κλινικά συμπτώματα συγκεκριμένων λοιμώξεων. Οι κυριότερες είναι οι εξής :

1) Αιμολυσίνες: είναι εξωπρωτεΐνες οι οποίες προκαλούν λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων κυρίως των ζώων και λιγότερο του ανθρώπου (Dingesetal, 2000)

2) Πηκτάση (κοαγκουλάση): είναι μια εξωκυττάρια πρωτεΐνη, η οποία προκαλεί πήξη του πλάσματος του ανθρώπου και του κουνελιού αφού λόγω της σύνδεσής της με την προθρομβίνη του ινωδογόνου μετατρέπεται σε ινική. Η παραγωγή της πηκτάσης είναι ιδιότητα που διαχωρίζει τον *S. aureus* από τους άλλους σταφυλόκοκκους (Δημητρακόπουλος, 1987).

3) Θερμοανθεκτική νουκλεάση (t-DNAse): η ουσία αυτή παράγεται κυρίως από τον *S. aureus* και υδρολύει το DNA. Ορισμένα στελέχη των *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. simulans* και *S. carnosus* επίσης μπορεί να παράγουν θερμοσταθερή DNAάση με ασθενή δράση όμως (KloosandBannerman, 1995; Koneman, 2006).

4) Λευκοκτονίνη Panton-ValentineLeucocidin (PVL): προκαλεί το θάνατο των λευκών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου και του κουνελιού και προκαλεί νέκρωση του δέρματος (AloufandMuller-Alouf, 2003; Cribieretal, 1992).

5) Τοξίνη του Συνδρόμου Τοξικής Καταπληξίας (ToxicShockSyndromeToxin-1, TSST-1): πρόκειται για μία εξωτοξίνη η οποία παράγεται από ειδικά στελέχη του *S. aureus* (I φαγοκυτταρικής ομάδας και λυσιτύπου 29) και είναι υπεύθυνη για το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας, μία πολυσυστηματική νόσο (Kahleretal, 1986).

6) Αποφολιδωτική τοξίνη (επιδερμολυτική): προκαλεί το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποκολλήσεως της επιδερμίδας (StaphylococcalScaldedSkinSyndrome, SSSS) που εμφανίζεται συνήθως στα νεογνά και μοιάζει με έγκαυμα (Ladhanietal, 1999).

7) Σταφυλοκοκκικές Εντεροτοξίνες (ΣΕς): είναι το αίτιο της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης, ένα από τα πιο συχνά τροφιμογενή νοσήματα. Έχει αποδειχθεί ότι οι κλασικές ΣΕς εμπλέκονται στο 95% των περιστατικών της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης με το υπόλοιπο 5% να οφείλεται στις νεότερες ΣΕς (BergdollandLeeWong, 2006).

8) Άλλες ουσίες: ο *S. aureus* παράγει επίσης λιπάση όπως τη φωσφολιπάση C, υαλουρονιδάση η οποία διευκολύνει την εισβολή του στους ιστούς του ξενιστή αφού διασπά το υαλουρινικό οξύ και σταφυλοκινάση που προκαλεί λύση της ινικής (Δημητρακόπουλος, 1987).

1.3.4 Λοιμώξεις από τον *S.aureus*

Ο *S.aureus* είναι το πιο παθογόνο είδος από τους σταφυλόκοκκους που προσβάλλει όλα τα όργανα και τους ιστούς και προκαλεί κυρίως πυώδεις φλεγμονές. Οι κυριότερες λοιμώξεις που προκαλεί αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα 2 και είναι οι εξής:

1) Λοιμώξεις του δέρματος και των εξαρτημάτων του.

α) Θυλακίτιδα: ήπια φλεγμονή των τριχοθυλακίων.

β) Δοθιήνωση και ψευδάνθρακας: η δοθιήνωση είναι συνέχεια της θυλακίτιδας, με πιο σοβαρή όμως μορφή, αφού επεκτείνεται και στο χόριο και στον υποδόριο ιστό, η οποία μπορεί να καταλήξει σε ψευδάνθρακα, μία σοβαρή εκτεταμένη εν τω βάθει φλεγμονή του υποδόριου ιστού.

γ) Μολυσματικό κηρίο (impetigo): μία επιπολής φλεγμονή του δέρματος η οποία προσβάλλει κυρίως τα νεογνά.

δ) Μαστίτιδα: σχετίζεται με το θηλασμό.

ε) Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων.

2) Βακτηριαμία και επιπλοκές: είτε ως επακόλουθο της επέκτασης μιας εντοπισμένης λοίμωξης (έγκαυμα, απόστημα) είτε μετά την είσοδο του *S.aureus* στην κυκλοφορία του αίματος λόγω τραύματος, χειρουργικής επέμβασης, ύπαρξης ξένων σωμάτων όπως ενδοφλέβιοι καθετήρες ή άλλων προσθετικών συσκευών.

3) Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα: προσβολή των υγιών ή προβληματικών βαλβίδων. Ο *S.aureus* προκαλεί συνήθως οξεία ενδοκαρδίτιδα η οποία εξελίσσεται ταχύτερα. Εμφανίζεται κυρίως σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών (BrownandLevine, 2002).

4) Πνευμονία μετά από ιογενή αναπνευστική λοίμωξη συνήθως από τον ιό της γρίπης με πιθανή επιπλοκή το πλευριτικό εμπύημα ή απόστημα πνεύμονα ή ακόμη και βακτηριαμία (Pulvirentietal, 1996; Waldvogel, 1990).

5) Οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα: πρόκειται για φλεγμονή του οστού η οποία προκαλείται από την αιματογενή διασπορά του μικροοργανισμού από μία προϋπάρχουσα εστία σταφυλοκοκκικής λοίμωξης (LewandWaldvogel, 1997).

6) Σταφυλοκοκκικό Σύνδρομο Αποκολλήσεως της Επιδερμίδας (StaphylococcalScaldedSkinSyndrome, SSSS):προσβάλλει παιδιά μικρότερα των 2 ετών, κυρίως τα νεογνά. Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από φυσαλιδώδες εξάνθημα το οποίο ακολουθεί εκτεταμένη αποφολίδωση της επιδερμίδας (εικόνα ζεματισμένου δέρματος) (Cribieretal, 1984; Gemmell, 1995).

7) Σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (ToxicShockSyndrome, TSS): αρχικά το σύνδρομο παρατηρήθηκε σε γυναίκες που χρησιμοποιούσαν υπεραπορροφητικά κολλικά tampon κατά την περίοδο της έμμηνης ρύσης, αργότερα όμως περιγράφηκε σε άνδρες, γυναίκες και παιδιά ως μετεγχειρητική επιπλοκή (λοίμωξη τραυμάτων). Πρόκειται για μια σοβαρή παθολογική κατάσταση, απειλητική για τη ζωή, αφού η καταπληξία μπορεί να οδηγήσει σε οργανική ανεπάρκεια (Andrewsetal, 2001; Shandsetal, 1980).

8) Σταφυλοκοκκική Τοξίνωση: προκαλείται από την πρόσληψη με τα τρόφιμα μίας ή περισσότερων προσχηματισμένων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών (LeLoiretal, 2003; Pexaraetal, 2010)

Πίνακας 1.2. Λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. aureus*.

Πυογόνες Λοιμώξεις	Νόσοι οφειλόμενες στις τοξίνες
Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μοριών	Σταφυλοκοκκικό Σύνδρομο Αποκολλήσεως της Επιδερμίδας
Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος	Σύνδρομο τοξικής καταπληξίας
Βακτηριαμία	Σταφυλοκοκκική Τοξίνωση
Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα	
Λοιμώξεις σε ξένα σώματα	
Οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα	
Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων	

1.4 Πηκτάση Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci)

1.4.1 Παθογένεια των Πηκτάση Αρνητικών Σταφυλόκοκκων

Οι Πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci, CNS) έχουν διαφορετική αντιγονική δομή από τον *S. aureus*. Φέρουν λεπτό πολυσακχαριδικό έλυτρο με τη βοήθεια του οποίου προσκολλώνται εύκολα στα συνθετικά πολυμερή. Δεν έχουν πρωτεΐνη Α και δεν παράγουν πηκτάση ούτε θερμοανθεκτική νουκλεάση. Δεν παράγουν εξωτοξίνες και ένζυμα σε αντίθεση με τον *S. aureus*. Μερικά στελέχη CNS έχουν την ικανότητα να παράγουν μία βλενώδη ουσία (slime) (Extracellular Slime Substance) η οποία τους βοηθάει να προσκολλώνται στις επιφάνειες των ενδοαγγειακών καθετήρων και των προσθετικών συσκευών (FleerandVerhof, 1989). Η βλενώδης αυτή ουσία είναι εξωκυττάρια και δρα ως ένα προστατευτικό μικροβιακό περιβάλλον μέσα στο οποίο βρίσκεται ο σταφυλόκοκκος απρόσβλητος από παράγοντες εχθρικούς του ξενιστή που θα τον σκότωναν. Το slime δημιουργεί μία βιομεμβράνη (biofilm) η οποία αναστέλλει τη χημειοταξία και τη φαγοκυττάρωση των μικροβίων (Christensenetal, 1985; Eiffetal, 2002).

Ο *S. epidermidis* φέρει προσκολλητίνες, πρωτεΐνες επιφανείας οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του βακτηρίου στα ξένα σώματα (Tojoetal, 1988). Ο *S. haemolyticus* παράγει τις αιμολυσίνες α, β, γ και δ με παρόμοια παθογόνο δράση με αυτές του *S. aureus*.

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες των CNS που τους διαφοροποιούν από τον *S. aureus* είναι ότι δεν παράγουν πηκτάση και θερμοανθεκτική νουκλεάση, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς και το ότι δεν ζυμώνουν τη μαννιτόλη και τρεχαλόζη.

Η ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών των σταφυλόκοκκων γίνεται με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Σήμερα στο εμπόριο κυκλοφορούν έτοιμα συστήματα ταυτοποίησης εύκολα στη χρήση.

1.4.2 Λοιμώξεις από τους Πηκτάση Αρνητικούς Σταφυλόκοκκους

Γενικά, οι νόσοι που προκαλούνται από τους πηκτάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους (CNS) είναι νοσοκομειακής προέλευσης και σχετίζονται με παρεμβατικούς και θεραπευτικούς διαγνωστικούς χειρισμούς, ξένα σώματα και προσθετικά υλικά όπως ενδοφλέβιοι καθετήρες, προσθετικές καρδιακές βαλβίδες, προσθετικά ορθοπεδικά βοηθήματα ή παροχετεύσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος ή καθετήρες περιτοναϊκής κάθαρσης (PfallerandHerwaldt, 1988). Επίσης προδιαθεσικοί παράγοντες για την εμφάνιση νόσων από CNS στον ξενιστή είναι η προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών, η ανοσοκαταστολή, η λύση της συνεχείας του δέρματος λόγω φλεγμονής ή τραύματος και οι χειρουργικοί τραυματισμοί (KloosandBannerman, 1994; PfallerandHerwaldt, 1988).

Συγκεκριμένα οι κυριότερες λοιμώξεις που προκαλούν οι CNS είναι οι εξής :

1) Λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος: ο *S. saprophyticus* είναι το πιο συχνό αίτιο ουρολοιμώξεων σε ασθενείς της κοινότητας ενώ ο *S. epidermidis* απομονώνεται από νοσηλευόμενους ασθενείς με επιπλοκές από το ουροποιητικό σύστημα (ουροκαθετήρα, πρόσφατη χειρουργική επέμβαση, ουρολιθίαση κλπ.) (Guirguitzovaetal, 2002; Ronald, 2002).

2) Οστεομυελίτιδα.

3) Ενδοκαρδίτιδα προσθετικών καρδιακών βαλβίδων: ο *S. epidermidis* απομονώνεται πιο συχνά (Ingetal, 1997; Karchmeretal, 1983).

4) Μολύνσεις ενδοαγγειακών καθετήρων.

5) Μολύνσεις αναστομώνσεων εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

6) Περιτονίτιδα λόγω μόλυνσης καθετήρων περιτοναϊκής κάθαρσης.

7) Μικροβιαμία: ο *S. epidermidis* είναι το πιο συχνό αίτιο μικροβιαμίας σε νοσηλευόμενους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και σε νεογνολογικές μονάδες (Raimundoetal, 2002; Wadeetal, 1982).

8) Λοιμώξεις αγγειακών μοσχευμάτων.

9) Μολύνσεις προσθετικών αρθρώσεων.

Άλλες λοιμώξεις: νόσοι του δέρματος και του υποδόριου ιστού, ενδοφθαλμίτιδα μετά από επέμβαση καταρράκτη και τοποθέτηση φακού (Laubeetal, 2004), ακμή, και μέση ωτίτιδα (Soldatietal, 1999).

1.5 Επιδημιολογία του Σταφυλόκοκκου

Ο *S. aureus* είναι ευρύτατα διαδεδομένος στο φυσικό περιβάλλον και μπορεί να απομονωθεί από τη σκόνη, τον αέρα, τα απόβλητα και σπάνια το νερό (Pexaraetal, 2010).

Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του φάρυγγα, της ρινικής κοιλότητας και του δέρματος των ενήλικων ανθρώπων και των ζώων (LeLoiretal, 2003) ενώ αποικίζει και το πτέρωμα των πτηνών και των πουλερικών (Hajeketal, 1988; Witteetal, 1977). Τα νεογνά λίγο μετά την γέννησή τους αποικίζονται με στελέχη *S. aureus* στο δέρμα και τη ρινική τους κοιλότητα (Δημητρακόπουλος, 1987). Συχνά αποικίζει τις μασχάλες, το παχύ έντερο, το περίνεο και τον κόλπο (Kluytmans, 2010). Περίπου 20-60% των ανθρώπων είναι μόνιμοι ή παροδικοί φορείς του μικροβίου (Pexaraetal, 2010) ενώ μόνο το 20% του πληθυσμού δεν θα αποκτήσει φορεία *S. aureus* κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Kluytmansetal, 1997). Το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό των νοσοκομείων καθώς και οι ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά φορείας (Boyce, 1997; Frenayetal, 1992; Waldvogel, 1990).

Ο μικροοργανισμός αυτός μεταδίδεται είτε με άμεση επαφή είτε με αερογενή διασπορά μέσω μεγάλων σταγονιδίων. Η διασπορά του *S. aureus* από άτομο σε άτομο γίνεται κυρίως ενδονοσοκομειακά, οπότε η τήρηση της υγιεινής των χεριών μεταξύ του προσωπικού είναι επιβεβλημένη.

Πολλές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις προκαλούνται από στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (MethicillinResistant *S. aureus*, MRSA). Τα στελέχη αυτά είτε

προέρχονται από τον ίδιο τον οργανισμό του ασθενούς, είτε μεταδίδονται στον ασθενή από τα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού.

Αρχικά ο MRSA ήταν αποκλειστικά ενδονοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο ενώ από το 1990 έχουν καταγραφεί περιστατικά σε ανθρώπους που δεν είχαν καμία επιδημιολογική σχέση με νοσοκομεία. Το 2005 η παρουσία ενός ξεχωριστού κλώνου MRSA στους χοίρους (CC 398) και η μετάδοσή του στους ανθρώπους καταγράφηκε για πρώτη φορά (Morcilloetal, 2015; Pexaraetal, 2010; Vossetal, 2005).

Τα MRSA στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, και στις κεφαλοσπορίνες, μπορούν όμως να εμφανίζουν αντοχή και σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών παρουσιάζοντας έτσι πολυανθεκτικότητα. Τα ανθεκτικά αυτά στελέχη στις μέρες μας απομονώνονται ολοένα και περισσότερο και από λοιμώξεις της κοινότητας σε υγιείς ανθρώπους.

Οι CNS γενικά αποικίζουν το δέρμα και τους βλεννογόνους. Το στέλεχος εκείνο που απομονώνεται πιο συχνά είναι ο *S.epidermidis* (Archer, 1990), ο οποίος αποτελεί μόνιμη μικροβιακή χλωρίδα του δέρματος του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων (Κουσκούνη και Τσελένη-Κωτσοβίλη, 2005). Αποικίζει επίσης τους βλεννογόνους του αναπνευστικού, τους οφθαλμούς, το αυτί και τις ρινικές κοιλότητες. Βρίσκεται στο περιβάλλον, στη σκόνη, στο νερό και τα τρόφιμα.

Ο *S. saprophyticus* αποικίζει παροδικά το δέρμα, τον κόλπο και την ουρήθρα των γυναικών νεαρής ηλικίας.

Ο *S. epidermidis* προκαλεί κυρίως ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως και οι περισσότεροι CNS σε ασθενείς με ξένα σώματα ή προσθετικές συσκευές με εξαίρεση τον *S. saprophyticus* ο οποίος προκαλεί λοιμώξεις της κοινότητας (ουρολοιμώξεις) (Archer, 1990). Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι οι CNS ευθύνονται για σοβαρές νοσοκομειακές βακτηριαμίες, ενώ παλαιότερα όταν απομονώνονταν σε αιμοκαλλιέργειες νοσηλευόμενων ασθενών καταγράφονταν ως επιμόλυνση (Schabergetal, 1991). Ο *S. epidermidis* ευθύνεται συχνότερα για βακτηριαμίες στους ογκολογικούς ασθενείς (Wadeetal, 1982), ενώ γενικά οι CNS είναι υπεύθυνοι για το 73% των βακτηριαμιών που παρατηρούνται σε νεογνά στις μονάδες εντατικής θεραπείας (Weinsteinetal, 1982).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Σταφυλόκοκκος και Τρόφιμα

2.1 Γενικά

Ο *S. aureus* θεωρείται η τρίτη πιο σημαντική αιτία τροφιμογενών νοσημάτων παγκοσμίως (Boeremaetal, 2006; Morandietal, 2007; TiradoandSchmidt, 2001). Το 2009, το 5,7% των επιβεβαιωμένων τροφιμογενών επιδημιών προκλήθηκαν από *Staphylococcus* spp, ύστερα από κατανάλωση χοιρινού κρέατος και των προϊόντων του (EFSA 2011). Στις Η.Π.Α. το 1998 1.750 περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης χρειάστηκαν νοσηλεία από το σύνολο των 185.000 καταγεγραμμένων περιπτώσεων (Meadetal, 1999). Το 2007 στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε 182 επιβεβαιωμένες τροφιμογενείς επιδημίες από *S.aureus* 1.945 άνθρωποι νόσησαν, 204 νοσηλεύτηκαν ενώ καταγράφηκαν και 3 θάνατοι. Το 2008 πάλι στην Ευρωπαϊκή Ένωση ο *S.aureus* προκάλεσε 52 τροφιμογενείς επιδημίες όπου 595 άνθρωποι νόσησαν και 116 νοσηλεύτηκαν (EFSA 2010). Γενικά όμως πιστεύεται ότι υπάρχει μία υποεκτίμηση του πραγματικού αριθμού των περιστατικών σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης λόγω της μη καταγραφής των περισσότερων περιστατικών καθώς δεν αναζητούν ιατρική φροντίδα (Argudinetal, 2010).

Η πρώτη αναφορά για τροφική δηλητηρίαση έγινε το 1884 από τους Vaughan και Sternberg εξαιτίας κατανάλωσης τυριού μολυσμένου με σταφυλόκοκκο (AdamsandMoss, 2008). Το 1894 εκδηλώθηκε τροφιμογενής νόσος σε μια οικογένεια η οποία κατανάλωσε κρέας από αγελάδα που νοσούσε από πυογόνους σταφυλόκοκκους (Hennekinneetal, 2012). Το 1914 ο Barber απέδειξε ότι οι αγελάδες που νοσούν από σταφυλοκοκκική μαστίτιδα μπορούν να επιμολύνουν το γάλα προκαλώντας τροφιμογενές νόσημα (AdamsandMoss, 2008). Το 1930 αποδείχθηκε στο πανεπιστήμιο του Σικάγο ότι η τροφική δηλητηρίαση μετά από κατανάλωση μολυσμένου κέικ με γέμιση κρέμας οφειλόταν στην εντεροτοξίνη που παρήχθη από σταφυλόκοκκους (Hanes, 2003).

Το κρέας και τα προϊόντα του είναι εκείνα τα τρόφιμα που συχνά ενοχοποιούνται στις περισσότερες σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις. Στο νωπό κρέας η μόλυνση οφείλεται στα ζώα, στο κρέας και τα προϊόντα του που έχουν υποστεί επεξεργασία, η μόλυνση προέρχεται κυρίως από τον άνθρωπο (Pexara etal, 2012). Αν και οι άνθρωποι και τα ζώα αποτελούν τους κύριους ξενιστές, σταφυλόκοκκοι απομονώνονται και από τον μηχανολογικό εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας των τροφίμων. Τρόφιμα υψηλού κινδύνου είναι τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα τα οποία δεν υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία και τα οποία υφίστανται χειρισμό από τον άνθρωπο (Koustaetal, 2010). Άλλα τρόφιμα τα οποία εμπλέκονται στην πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης είναι τα πουλερικά, το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, και τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής όπως τα γλυκά που περιέχουν κρέμα από αυγά.

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του *S.aureus* και στην παραγωγή εντεροτοξίνης στα τρόφιμα παίζουν παράγοντες του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα στην οποία βρίσκεται το τρόφιμο καθώς και ενδογενείς παράγοντες του τροφίμου όπως το pH, ενεργότητα νερού, η ανταγωνιστική μικροβιακή χλωρίδα, η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) (AdamsandMoss, 2008).

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση έχει σημαντικές οικονομικές διαστάσεις για μία χώρα λόγω αύξησης των δαπανών για την περίθαλψη των ασθενών (νοσηλεία, ιατρικές επισκέψεις) και λόγω της απουσίας του ασθενούς από την εργασία του με επακόλουθη μειωμένη παραγωγικότητα. Εξίσου σημαντικό είναι το κόστος της διάθεσης του μολυσμένου τροφίμου αλλά και οι οικονομικές επιπτώσεις στις βιομηχανίες τροφίμων και στις εταιρείες τροφοδοσίας. Περίπου 1,5 δισεκατομμύρια δολάρια δαπανώνται ετησίως στις Η.Π.Α. λόγω της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (SuandLeeWong, 1997; Normannoetal, 2005).

2.2 Ανάπτυξη του *S. aureus* στα Τρόφιμα

S.aureus είναι αερόβιος μικροοργανισμός, προαιρετικά αναερόβιος, ο οποίος σε αναερόβιες συνθήκες αναπτύσσεται αργά. Παρουσιάζει χαμηλό μικροβιακό ανταγωνισμό, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανάπτυξή του (MosselandVanNetten, 1990). Η ύπαρξη ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας κυρίως των οξυγαλακτικών βακτηρίων αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξαιτίας κυρίως της πτώσης του pH και της παραγωγής οργανικών οξέων, αλλά και άλλων ανασταλτικών ουσιών όπως βακτηριοσίνες(νισίνη) που επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση (Smithetal, 1983; Baird-Parker, 1990). Επομένως λόγω της παρουσίας των άλλων μικροοργανισμών είναι σπάνια η πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης λόγω κατανάλωσης ωμών τροφών (Bergdoll 1989;Pexaraetal, 2010).

S.aureus είναι αλατοάντοχος μικροοργανισμός αφού αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl έως 10% γεγονός που τον καθιστά σε πλεονεκτικότερη θέση έναντι της ανταγωνιστικής μικροβιακής χλωρίδας (NotermansandHeuvelman, 1983).

Πρόκειται για ένα πολύ ανθεκτικό βακτήριο αφού πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αναπτύσσεται σε μια ελάχιστη τιμή συντελεστή ενεργού ύδατος a_w 0,86 (Pexaraetal, 2010) έως και 0,99 και σε pH μεταξύ 4,2-9,3 με βέλτιστη ανάπτυξη 7.0-7,5. Ο *S. aureus* δεν επιβιώνει μετά την διαδικασία της παστερίωσης ούτε μετά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων (Morandiatal, 2007).

2.3 Ιδιότητες των Σταφυλοκοκκικών Εντεροτοξινών (ΣΕς)

Πρόκειται για διαλυτές εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που σχηματίζονται από απλή πεπτιδική αλυσίδα. Έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 26.000 και 29.600 Da (LeLoiretal, 2003; Normannoetal 2005; Pexaraetal, 2010) και δρουν ως υπεραντιγόνα καθώς προκαλούν τον πολλαπλασιασμό και την διέγερση των T-λεμφοκυττάρων

συνδεόμενες με μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MajorHistocompatibilityComplex, MHC-II) (Marracketal, 1990; Pulvirentietal, 1996). Αρκετές ΣΕs ή παρόμοιες με ΣΕs τοξίνες (SE-liketoxins) έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα (LeLoir, 2003). Αυτές περιλαμβάνουν τις κλασικές εντεροτοξίνες (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), τις νεότερες ΣΕs (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) οι οποίες αναγνώστηκαν τη δεκαετία του 1990 και τις πιο πρόσφατες (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU2, SEIV, SEW, SEX) (Argudinetal, 2010; Hennekinneetal, 2012; Pexaraetal, 2012).

Ο ρόλος που έχουν οι τελευταίες σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες στην πρόκληση τροφιμογενούς νόσου δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, επομένως αναφερόμαστε σε αυτές με τον όρο τοξίνες παρόμοιες με ΣΕs (SE-liketoxins) (Boeremaetal, 2006) καθώς μελέτες έδειξαν ότι δεν έχουν εμετική δράση (Vernozy-Rozandetal, 2004). Αντίθετα οι κλασικές ΣΕs (SEA-SEE), SEH (LeLoir, 2003), SEG και SEI (Omoetal, 2002) έχουν ξεκάθαρα εμετικές ιδιότητες.

Να αναφέρουμε ότι η τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (ToxicShockSyndromeToxin, TSSA-1) αρχικά θεωρήθηκε ως σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη F (SEF) ωστόσο στερείται εμετικής δράσης και επομένως δεν είναι εντεροτοξίνη (Bergdolletal, 1991; Pexaraetal, 2010).

Οι εντεροτοξίνες παράγονται από εντεροτοξινογόνα στελέχη σταφυλόκοκκων και κυρίως από τον *S. aureus* (Pexaraetal, 2010). Μεταξύ των πηκτάση αρνητικών σταφυλόκοκκων, οι *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* και *S. haemolyticus* μπορούν να παράγουν μία ή περισσότερες ΣΕs (Bautistaetal, 1988). Κάποια στελέχη του πηκτάση θετικού *S. intermedius* ο οποίος απομονώνεται πολύ συχνά στα τρόφιμα, παράγουν ΣΕs (Beckeretal, 2001). Ο *S. intermedius* είναι το μόνο είδος εκτός του *S. aureus* ο οποίος σχετίζεται αποδεδειγμένα με επιδημίες σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (Khambatyetal, 1994). Ορισμένα στελέχη του είδους *S. hyicus* έχουν αναγνωρισθεί επίσης ως εντεροτοξινογόνα (Almazanetal, 1987; Beckeretal 2001).

Η παραγωγή των εντεροτοξινών κωδικοποιείται από γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια (SED, SEJ), σε προφάγους (SEA, SEE), στη σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα (StaphylococcalCassetteChromosome, SCC) (SEC) ή και σε νησίδια παθογονικότητας (Argudinetal, 2010; Letertreetal, 2003; MooreandLindsay, 2001; Onoetal, 2008).

Γενικά οι ΣΕs σε αντίθεση με τα στελέχη που τις παράγουν είναι πολύ πιο ανθεκτικές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αντέχουν σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες και ανιχνεύονται στα τρόφιμα ακόμη και αν δεν υπάρχουν ζωντανά κύτταρα του *S. aureus* (Jorgensenetal, 2005; Pexaraetal, 2010). Η θερμοανθεκτικότητά τους εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, το είδος της τοξίνης, το pH, τη συγκέντρωση άλατος, την ενεργότητα του ύδατος και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη μετουσίωση των ίδιων των τοξινών. Οι ΣΕs γενικά έχουν D₁₂₁ τιμή μεταξύ 3 και 8 min (AspergerandZangerl, 2003; Pexaraetal 2010). Η τιμή D₆₀ έχει εύρος μεταξύ 1 και 6 min και εξαρτάται από το είδος του τροφίμου (Bergdoll, 1989). Αν δεν επέλθει πλήρης αδρανοποίηση των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών με τη θερμότητα, είναι δυνατό να

ενεργοποιηθούν εκ νέου κάτω από ευνοϊκές συνθήκες όπως το μαγείρεμα του τροφίμου ή η αποθήκευσή του (Tatini, 1973).

Επίσης παρουσιάζουν αντοχή στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων όπως θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ρεννίνη και παπαΐνη (Bergdoll 1967;Pexaraetal, 2010).

Ένας υγιής ενήλικας για να προσβληθεί από σταφυλοκοκκική τοξίνωση πρέπει να λάβει 20 ng με 1 μg εντεροτοξίνες γεγονός που σημαίνει ότι ο πληθυσμός του *S. aureus* πρέπει να υπερβαίνει τα 10^5 CFU/g τροφίμου (LeLoiretal, 2003; Pexaraetal 2010; Tranter, 1996). Τα συμπτώματα εμφανίζονται 1-6 ώρες μετά. Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως με ναυτία, εμέτους, διάρροια χωρίς πυρετό, κοιλιακό άλγος και καταβολή δυνάμεων (LeLoiretal, 2003). Η ανάρρωση είναι πλήρης μετά από 24 ώρες (Δημητρακόπουλος, 1987). Η θνητότητα της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης σε υγιή άτομα είναι μηδενική, 0,02 % (Meadetal, 1999), ενδέχεται να είναι σημαντική όμως σε ευπαθείς ομάδες όπως ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, μικρά παιδιά και ηλικιωμένοι.

Οι ΣΕς παράγονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 10-46 °C με άριστη θερμοκρασία τους 40-45° C, σε τιμές pH 4,8-9,0 με άριστη 5,3-7,0 και σε τιμές ενεργότητας νερού a_w 0,86-0,99 με άριστη τιμή την 0,90 (Smithetal, 1983) όπως φαίνεται συνοπτικά στον πίνακα 3.

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών είναι: ανοσολογικές, χρωματογραφικές και μοριακές (Normannoetal 2007). Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως η αντίστροφη παθητική αιμοσυγκόλληση με τη βοήθεια σωματιδίων latex (ReversePassiveLatexAgglutination, RPLA), οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι ανίχνευσης ELISA, και η ανοσοενζυμική μέθοδος με τελική ανίχνευση φθορισμού (Enzyme-linkedFluorescentAssay, ELFA). Η RPLA αναπτύχθηκε από τους Parketal (1996) και έχει ευαισθησία 0,5 ng/mL. Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι έχουν ευαισθησία μεταξύ 0,1 και 1,0 ng τοξίνης ανά γραμμάριο τροφίμου (AdamsandMoss, 2008). Από τις ανοσοενζυμικές μεθόδους εκείνη που ξεχωρίζει και χρησιμοποιείται περισσότερο είναι αυτή του διπλού αντισώματος-σάντουιτς (doubleantibody sandwich). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη σύζευξη του πιθανού αντιγόνου (εντεροτοξίνης) με ειδικό αντίσωμα, καθώς και με αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο (SandwichEnzymeImmunoassay).

Σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο ειδικές τυποποιημένες ανοσοενζυμικές δοκιμές (testkits) που βασίζονται στη τεχνική ELISA.

Η συνεχής έρευνα για την ταυτοποίηση νέων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών και την ανίχνευση νέων στελεχών που φέρουν γονίδια για την παραγωγή εντεροτοξινών δεν πρέπει να σταματήσει. Για τον καλύτερο έλεγχο και την επακόλουθη μείωση των σταφυλοκοκκικών τροφιμογενών επιδημιών πρέπει να αναπτυχθούν νέες πιο ευαίσθητες μέθοδοι για την ανίχνευση ΣΕ στα τρόφιμα (LeLoiretal, 2003).

Οι ιδιότητες του *S. aureus* και των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Ιδιότητες *S. aureus* και ΣΕ.

	Συνθήκες ανάπτυξης <i>S. aureus</i>	Συνθήκες παραγωγής ΣΕ
Θερμοκρασία °C	7,0-48,5	10-46
pH	4,2-9,3	4,8-9,0
a _w	0,86-0,99	0,86-0,99

2.4. Ταυτοποίηση των Σταφυλόκοκκων

Στη μικροσκοπική εξέταση διακρίνουμε ομάδες Gram-θετικών κόκκων με τη χαρακτηριστική διάταξη σαν τσαμπιά σταφυλιού ή σε σειρά από τέσσερις κόκκους.

Στη συνέχεια, οι βιοχημικές δοκιμασίες μας βοηθούν περαιτέρω στην ταυτοποίηση και τυποποίηση των στελεχών όπως φαίνεται και στο σχήμα της εικόνας 2.

Αναλυτικά, η δοκιμασία καταλάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό Gram-θετικών κόκκων που διατάσσονται σε "σταφύλια" ή "αλυσίδες", το διαχωρισμό δηλαδή των σταφυλόκοκκων από τους στρεπτόκοκκους. Η καταλάση (υπεροξειδάση) είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο είναι το τελικό προϊόν της αερόβιας διάσπασης των σακχάρων, σε νερό και μοριακό οξυγόνο, το οποίο παράγει φυσαλίδες στην πράξη. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στα αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια τα οποία διαθέτουν κυτοχρώματα. Η δοκιμασία πρέπει να μην εκτελείται στο αιματούχο άγαρ διότι τα ερυθροκύτταρα δίνουν την αντίδραση ψευδώς θετική. Οι σταφυλόκοκκοι δίνουν θετική τη δοκιμασία καταλάσης (Foster, 2002; Waldvogel, 1990).

Η δοκιμασία της πηκτάσης μας βοηθάει στην ταυτοποίηση του *S. aureus* και το διαχωρισμό του από τους CNS. Εκτός από τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης της πηκτάσης σε σωληνάριο (ελεύθερη πηκτάση) ή σε αντικειμενοφόρο πλάκα (συνδεδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα πηκτάση, clumping factor), κυκλοφορούν στο εμπόριο τυποποιημένα αντιδραστήρια εύκολα στη χρήση (Kloos and Jorgensen, 1985).

Ο διαχωρισμός του *S. aureus* από τους CNS εναλλακτικά μπορεί να γίνει με τη δοκιμασία παραγωγής θερμοανθεκτικής DNAσης (DNase Test Agar) και τη δοκιμή ζύμωσης της μαννιτόλης (Αρσένη, 1994).

Η δοκιμή διάσπασης της γλυκόζης διαχωρίζει τους σταφυλόκοκκους από τους μικρόκοκκους, όπως και η δοκιμασία ευαισθησίας στη βακιτρακίνη (5 mg). Οι σταφυλόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στη βακιτρακίνη και ζυμώνουν τη γλυκόζη.

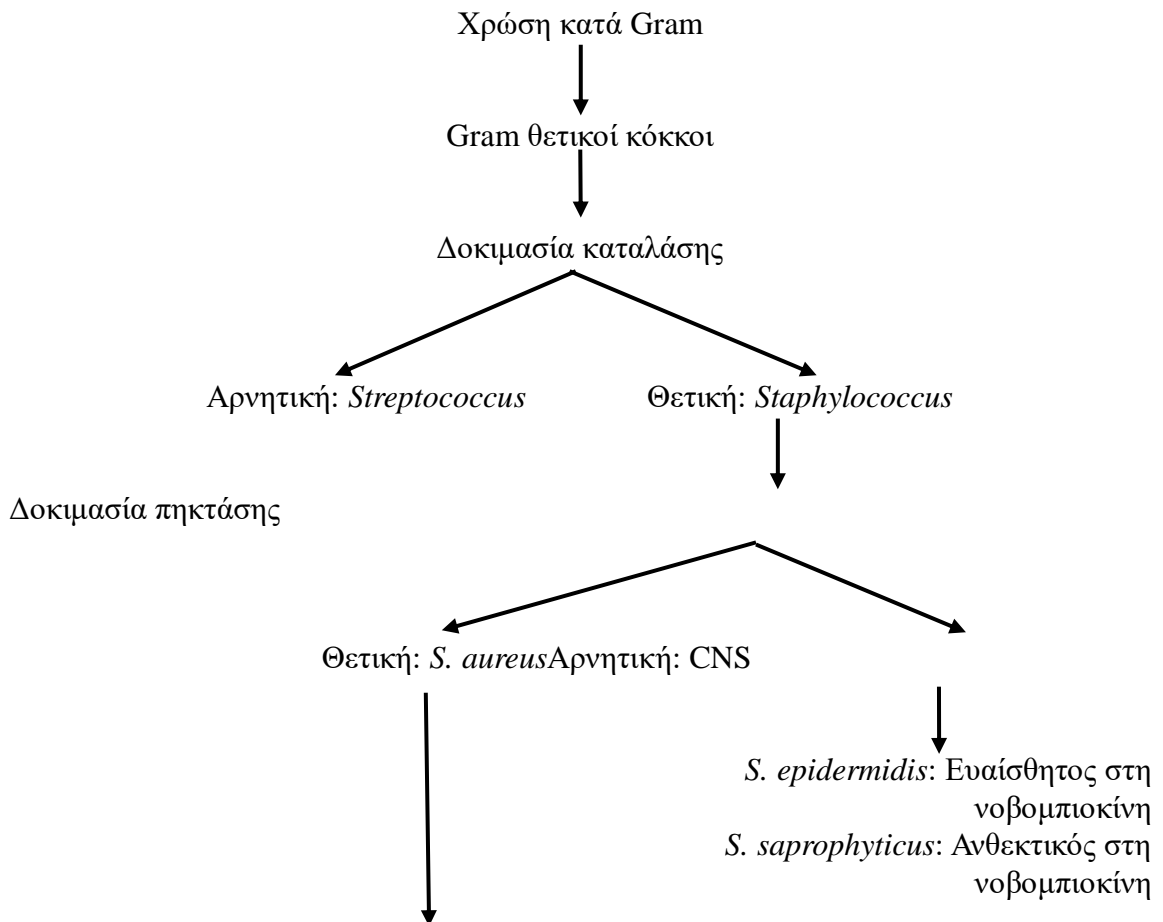
Ένα πρόσθετο διαφοροδιαγνωστικό είναι η δοκιμασία ευαισθησίας στη νοβομιοκίνη (5 μg). Όλοι οι CNS είναι ευαίσθητοι στο αντιβιοτικό αυτό με εξαίρεση τον *S. saprophyticus*.

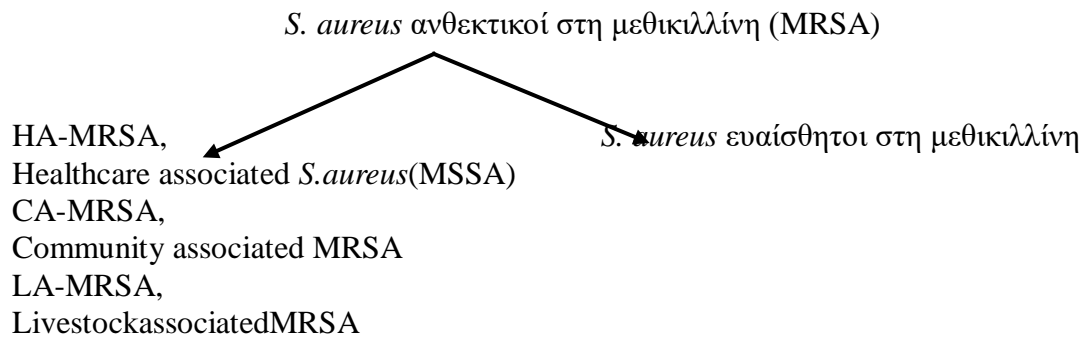
Στις μέρες μας η τυποποίηση των σταφυλόκοκκων μπορεί να γίνει με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων ή ημιαυτοποιημένων kits (APIstaph, Ident, Vitek, RapidecStaph) τα

οποία βασίζονται στις βιοχημικές ιδιότητες του μικροοργανισμού. Όσον αφορά το σύστημα ταυτοποίησης APIID 32 Staph, αποτελείται από μία ταινία με αφυδατωμένα υποστρώματα σε διαφορετικές μεμονωμένες θέσεις. Κατά την διαδικασία ενοφθαλμίζεται στην ειδική θέση εναιώρημα 0,5 της κλίμακας McFarlandto οποίο περιέχει την προς εξέταση αποικία. Ακολουθεί επώαση της ταινίας στους 37°Cγια 24 ώρες οπότε και μετά την προσθήκη ειδικών αντιδραστηρίων διαβάζονται οι βιοχημικές ιδιότητες (πχ. ουρεάση, αργινίνη, ορνιθίνη, νιτρικά, εσκουλίνη, γλυκόζη, μαννόζη, τρεχαλόζη) ώστε να γίνει η τυποποίηση του στελέχους.

Για την επιδημιολογική τυποποίηση των σταφυλόκοκκων και τη διερεύνηση της κλωνικής συγγένειας των στελεχών τους χρησιμοποιούνται φαινοτυπικές μέθοδοι με κυριότερη τη λυσιτυπία η οποία στηρίζεται στη διαφορετική ευαισθησία που παρουσιάζουν τα στελέχη του *S. aureus* στους βακτηριοφάγους, αλλά και μοριακές μέθοδοι όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PolymeraseChainReaction, PCR) (Greisenetal, 1994) ή η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) (SchwartzandCantor, 1984; SmithandCantor, 1987), γονοτυπικές μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση του DNA (Αρσένη, 1994)

Στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 2) φαίνεται συνοπτικά οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των σταφυλοκόκκων.





Εικόνα 2. Ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Σταφυλόκοκκοι: Θεραπευτική Αντιμετώπιση και Αντοχή στα Αντιβιοτικά

3.1 Θεραπευτική Αντιμετώπιση των Σταφυλόκοκκων

Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1941. Ο *S.aureus* ήταν το πρώτο μικρόβιο στο οποίο αποδείχθηκε η αντιμικροβιακή δράση της πενικιλίνης *in vitro* και *in vivo*. Η δράση της έναντι των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων είχε αρχικά θεαματικά αποτελέσματα τα οποία γρήγορα περιορίστηκαν λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών.

Η πενικιλίνη, όπως και όλα τα αντιβιοτικά που διαθέτουν β-λακταμικό δακτύλιο στο μόριό τους (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες) δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος.

Το 1959 έγινε η ανακάλυψη των πενικιλινοασοάντοχων πενικιλινών (αντισταφυλοκοκκικών) όπως η μεθικιλίνη, η οξακιλλίνη, η κλοξακιλλίνη, η δικλοξακιλλίνη οι οποίες αρχικά φάνηκε να δίνουν λύση στο πρόβλημα της αντοχής στην πενικιλίνη λόγω παραγωγής β-λακταμάσης. Ταχεία αναπτύχθηκε αντοχή στη μεθικιλίνη λόγω τροποποίησης του βιολογικού στόχου δράσης (αλλαγή στις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PenicillinaseBindingProteins,PBPs). Όλοι σχεδόν οι σταφυλόκοκκοι με αντοχή στη μεθικιλίνη, εμφανίζουν αντοχή και στα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Τα γλυκοπεπτίδια με κύριο τη βανκομυκίνη είναι τα φάρμακα εκλογής για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *S. aureus*, ακολουθούν η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και το φουσιδικό οξύ. Ωστόσο υπάρχουν σποραδικές αναφορές για στελέχη με μειωμένη ευαισθησία και πλήρη αντοχή στα γλυκοπεπτίδια. Το φουσιδικό οξύ πρέπει να χορηγείται σε συνδυασμό με άλλο αντιβιοτικό αφού αναπτύσσεται εύκολα αντοχή σε αυτό. Σε αλλεργία του ασθενούς στις πενικιλίνες, εναλλακτικά δίνεται ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη ή βανκομυκίνη. Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων και για την αποφυγή ανάπτυξης πολυαντοχής χορηγούνται συνδυασμοί αντιβιοτικών με πιο συχνό το σχήμα β-λακταμικών με βανκομυκίνη (Κουσκούνη και Τσελένη-Κωτσοβίλη, 2005; Αρσένη, 1994).

Τα νεότερα αντιβιοτικά όπως η λινεζολίδη, η κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά όμως η εμπειρία μας είναι περιορισμένη λόγω της σύντομης μέχρι τώρα χρήσης τους. Για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πηκτάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους το φάρμακο εκλογής είναι η πενικιλίνη. Αν εμφανίζουν αντοχή στη πενικιλίνη αλλά ευαισθησία στις πενικιλινοασοάντοχες πενικιλίνες τότε χορηγείται οξακιλλίνη, ναφκιλλίνη ή κεφαλοθίνη. Για τους ασθενείς εκείνους που παρουσιάζουν αλλεργία στην πενικιλίνη καθώς και την περίπτωση που τα στελέχη είναι ανθεκτικά

στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες, δίδεται η βανκομυκίνη (PfallerandHerwaldt, 1988).

OS. epidermidis είναι συχνά ανθεκτικός στη μεθικιλίνη, ενώ ο *S. haemolyticus* αναπτύσσει συχνά αντοχή στη τεϊκοπλανίνη. Οι κινολόνες και η τριμεθοπρίμη είναι πολύ αποτελεσματικές στη θεραπεία μη επιλεγμένης ουρολοίμωξης από *S. saprophyticus* (Αρσένη, 1994).

Βεβαίως σε κάθε λοίμωξη από CNS απαραίτητη είναι η αφαίρεση του ξένου σώματος (πχ. ενδοαγγειακού καθετήρα) και γενικά η εξάλειψη της πρωταρχικής πηγής της μόλυνσης. Η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή καθοδηγείται από τη δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Τα αντιβιοτικά που προτείνονται για έλεγχο στους σταφυλόκοκκους σύμφωνα με τις οδηγίες του ClinicalLaboratoryStandardsInstitute(CLSI) περιγράφονται στον πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4. Αντιβιοτικά προτεινόμενα για τον έλεγχο των σταφυλόκοκκων (CLSI, 2009).

1^{ης} επιλογής: έλεγχος και υποχρεωτική αναφορά	Πενικιλίνη (10 U) Κεφοξιτίνη (30 µg) ή οξακιλλίνη (1 µg) Ερυθρομυκίνη (15 µg) ή κλαριθρομυκίνη (15 µg) ή αζιθρομικίνη (15 µg) Κλινδαμυκίνη (2 µg) Τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (1,25/23, 75µg)
2^{ης} επιλογής: έλεγχος και επιλεκτική αναφορά πχ. σε περίπτωση αντοχής σε αντιβιοτικά 1^{ης} επιλογής	Τετρακυκλίνη (30 µg) Βανκομυκίνη (30 µg) ΡΙφαμπικίνη (5 µg) Τελιθρομυκίνη (15 µg) Λινεζολίδη (30 µg)
3^{ης} επιλογής: έλεγχος σε ειδικές περιπτώσεις πχ. ύπαρξη ενδημικών στελεχών με αντοχή σε αντιβιοτικό 1^{ης} και 2^{ης} επιλογής	Σπιροφλοξασίνη (5 µg) ή λεβοφλοξασίνη (5 µg) ή οφλοξασίνη (5 µg) Μοξιφλοξασίνη (5 µg) Γενταμικίνη (10 µg) Κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη (15 µg) Χλωραμφενικόλη (30 µg)
Μόνο σε στελέχη που απομονώνονται από ούρα	Νορφλοξασίνη (10 µg) Νιτροφουραντοΐνη (300 µg)

Ενδογενής αντοχή υπάρχει σε όλα τα στελέχη μικροβίων, είναι χρωμοσωμική, ανεξάρτητη της χρήσης αντιβιοτικών, ειδική για το γένος και το είδος του μικροβίου. Όλα τα Gram θετικά βακτήρια έχουν φυσική αντοχή στην κολιστίνη, πολυμιξίνη Β,

αζτρεονάμη, τεμοκιλλίνη και το ναλιδιξικό οξύ. Συγκεκριμένα για τους σταφυλόκοκκους οι *S. saprophyticus* και *S. capitis* εμφανίζουν αντοχή στη φωσφομυκίνη, οι *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, και *S. capitis* στην κεφαζιδίμη, οι *S. cohnii*, *S. xylosus* και *S. sciuri* στη λινκομυκίνη, οι *S. Saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. sciuri* στη νοβομπιοκίνη (EUCAST, 2008).

3.2 Αντοχή των Σταφυλόκοκκων στα Αντιβιοτικά

3.2.1 Μηχανισμοί Αντοχής

3.2.1.1 Αντοχή στα β-Λακταμικά

Η αντοχή του σταφυλόκοκκου στην πενικιλίνη και τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, πενέμες, μονοβακτάμες, αναστολείς β-λακταμασών) οφείλεται σε τρεις μηχανισμούς 1) παραγωγή β-λακταμασών, 2) παραγωγή νέας πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP_{2a}), 3) τροποποίηση του στόχου δηλαδή των φυσιολογικά παραγόμενων PBP_s (Σπηλιοπούλου, 2007; Champers, 1999; HakenbeckandCoyette, 1998;Rice, 2006).

Οι β-λακταμάσες είναι εξωκυττάρια ένζυμα τα οποία υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πενικιλιοϊκού οξέος το οποίο είναι ανενεργές κατά του μικροβίου. Η παραγωγή των β-λακταμασών κωδικοποιείται από το γονίδιο blaZ το οποίο βρίσκεται σε πλασμίδια και μεταφέρεται από σταφυλόκοκκο σε σταφυλόκοκκο με σύζευξη ενώ είναι δυνατό να ενσωματωθεί και στο χρωμόσωμα (Λεγάκης, 1991; NovickandRichmond, 1965).

Το 1942 οπότε και εμφανίστηκε το πρώτο ανθεκτικό στην πενικιλίνη στέλεχος *S. aureus*, η αντοχή οφειλόταν σε παραγωγή πενικιλινάσης η οποία διασπούσε το αντιβιοτικό. Το 1960 και μεταγενέστερα τα περισσότερα στελέχη σταφυλόκοκκων παράγουν β-λακταμάσες, οπότε παρέμειναν δραστικές μόνο οι ημισυνθετικές αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες όπως η μεθικιλίνη, οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη, καθώς και τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Το 1961 εμφανίστηκε το πρώτο στέλεχος χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA). Η αντοχή στη μεθικιλίνη εδρεύει σε χρωμόσωμα και οφείλεται στο γονίδιο *mecA*, το οποίο κωδικοποιεί την PBP_{2a} και ρυθμίζεται από δύο άλλα γονίδια το *mecI* και το *mecR1*. Για την καταστροφή των βακτηρίων πολλά αντιβιοτικά συνδέονται στις PBP_s πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες του σταφυλόκοκκου οι οποίες βοηθούν στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτές οι πρωτεΐνες λοιπόν σχετίζονται με τη σταθερότητα και ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Ενώ τα στελέχη *S. aureus* κανονικά χρησιμοποιούν τέσσερις διαφορετικές PBP_s (PBP 1, 2, 3, 4) για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, τα MRSA στελέχη έχουν μια πρόσθετη PBP, την PBP_{2'} ή PBP_{2a}. Η PBP_{2a} είναι μία νέα πρωτεΐνη υψηλού βάρους (78 KDa) η οποία παρουσιάζει μειωμένη συνδετική ικανότητα

με τα β- λακταμικά αντιβιοτικά και παραμένει λειτουργική για τη σύνθεση σταθερού κυτταρικού τοιχώματος. Παρά το ότι η αντοχή που βασίζεται στο *mecA* γονίδιο βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα ενός ενδογενούς ανθεκτικού πληθυσμού, το γονίδιο μπορεί να εκφραστεί σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων, φαινόμενο που ονομάζεται ετερογενή αντοχή.

3.2.1.2 Γενετική της Αντοχής Έναντι στη Μεθικιλίνη

Η αντοχή έναντι στη μεθικιλίνη στα είδη *Staphylococcus* οφείλεται στην σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (SCC*mec*), ένα μεταθετό γενετικό στοιχείο που αποτελείται από το *mec* γονιδιακό σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντοχή στη μεθικιλίνη και το *ccr* (cassettechromosomerecombinases) σύμπλοκο υπεύθυνο για την ενσωμάτωση της SCC στο βακτηριακό γονιδίωμα με επακόλουθο τον φαινότυπο αντοχής στα β-λακταμικά. Έχουν περιγραφεί επτά διαφορετικοί τύποι SCC*mec* (I-VII) σε στελέχη *S. aureus*, και πέντε τύποι (I-V) σε CNS στελέχη. Η αντοχή στην οξακιλλίνη αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην αντιμετώπιση των σταφυλόκοκκων, ιδιαίτερα λόγω της ετερογενούς έκφρασης της αντοχής στην οξακιλλίνη (MartinsandCunha, 2007).

Η αντοχή στην οξακιλλίνη καταδεικνύεται από διάφορες φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους όπως τη μέθοδο διάχυσης δίσκων οξακιλλίνης και κεφοξιτίνης σε άγαρ, το E-test (μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης), την μέθοδο αραιώσης σε ζωμό (brothdilution), τη δοκιμή συγκόλλησης σε latex, και την PCR, με τις μοριακές μεθόδους να θεωρούνται η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση αντοχής στην οξακιλλίνη στους σταφυλόκοκκους. Γενικά, ο έλεγχος της μικροβιακής αντοχής ενός στελέχους έναντι οποιουδήποτε αντιβιοτικού πραγματοποιείται με τις παραπάνω μεθόδους.

Αναλυτικά, όσον αφορά τη μέθοδο διάχυσης δίσκων εμποτισμένων με αντιβιοτικά σε άγαρ (KirbyBauer), παρασκευάζουμε κατάλληλο μικροβιακό εναιώρημα με θολερότητα ίση με 0.5 της κλίμακας McFarland (περίπου $1-2 \times 10^8$ CFU/ml για *S. aureus* ATCC® 25923) λαμβάνοντας 4-5 μεμονωμένες και ομοιόμορφες αποικίες από καθαρή καλλιέργεια οι οποίες αραιώνονται σε 4-5 mL στείρο φυσιολογικό ορό (ισότονο διάλυμα NaCl).

Το μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται σε τρυβλίο Mueller-Hinton εντός 15 λεπτών από την παρασκευή του και στη συνέχεια εντός 5-15 λεπτών από την επίστρωση του ΜΗΑ τοποθετούνται τα επιλεγμένα αντιβιοτικά στην επιφάνεια του τρυβλίου χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λαβίδα ή ειδικό διανεμητή δίσκων, σε απόσταση τουλάχιστον 24 mm μεταξύ τους κέντρο με κέντρο. Μετά από επώαση στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες για 24 ώρες γίνεται η ανάγνωση των αποτελεσμάτων μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου, με βάση την οποία γίνεται και ο χαρακτηρισμός του κάθε στελέχους *S. aureus* ως Ευαίσθητο (διάμετρος της ζώνης αναστολής ίση ή μεγαλύτερη από αυτή του πρότυπου στελέχους), Μετρίως Ευαίσθητο (διάμετρος ζώνης αναστολής μικρότερη κατά 2 mm τουλάχιστον σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος) και Ανθεκτικό (δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή) σύμφωνα με τους ερμηνευτικούς πίνακες που προτείνονται από το CLSI. Πολυανθεκτικό

στέλεχος *S. aureus*(MDRSA) ορίζεται το στέλεχος εκείνο το οποίο εμφανίζει αντοχή σε τρεις ή και περισσότερες διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών (Yeetal, 2016). Στον πίνακα 1.5 παρουσιάζονται τα όρια της ζώνης αναστολής για την Ευαισθησία στην οξακιλλίνη (OX) του και των CNSσύμφωνα με το CLSI (CLSI, 2014).

Πίνακας 1.5. Ζώνη αναστολής στελεχών σταφυλόκοκκων έναντι της οξακιλλίνης (OX).

Ζώνη αναστολής			
	Ευαισθησία	Ενδιάμεση Ευαισθησία	Αντοχή
<i>S. aureus</i>	≥13 mm	11-12 mm	≤10 mm
CNS*	≥18 mm	-	≤17 mm

* Πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoagulaseNegativeStaphylococci, CNS)

Πηγή:CLSI, 2014.

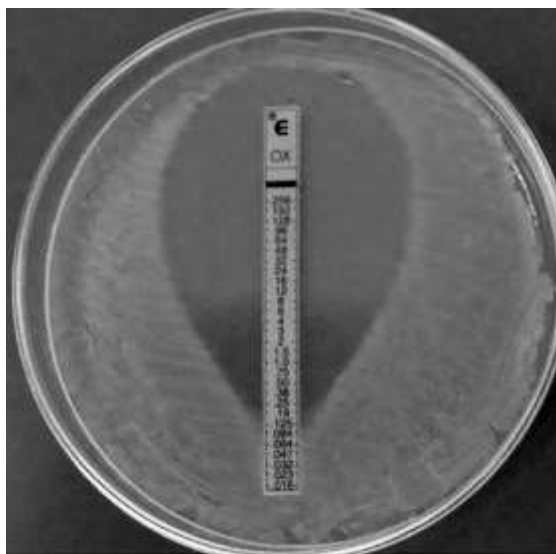
Ένα μικρόβιο Ευαίσθητο σε κάποιο αντιβιοτικό σημαίνει πως μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς με τις συνιστώμενες δόσεις του αντιβιοτικού. Αντίθετα, ένα μικρόβιο ανθεκτικό δεν μπορεί να ανασταλεί με τη συνιστώμενη δοσολογία και πιθανώς η θεραπεία να αποτύχει. Τέλος, ένα μικρόβιο Μετρίως Ευαίσθητο σημαίνει ότι αναστέλλεται με αντιβιοτικό όταν χορηγείται σε υψηλότερες δόσεις ή όταν επιτυγχάνεται υψηλή συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο νοσούντα ιστό.

Η MinimalInhibitoryConcentration(MIC) ορίζεται ως η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού και είναι δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροβίου. Ο προσδιορισμός της γίνεται με τη μέθοδο της κλιμακωτής διάχυσης των αντιβιοτικών σε άγαρ χρησιμοποιώντας ταινίες με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (E-test). Αποικίες καθαρού καλλιέργηματος του μικροβίου *S.aureus* αραιώνονται σε σωληνάριο με 4-5 mL 0,9% NaCl ώστε να έχουμε εναιώρημα πυκνότητας 0,5 της κλίμακας McFarland όπως προτείνεται από το CLSI. Ακολουθεί ενοφθαλμισμός του μικροβιακού εναιωρήματος σε Mueller-Hinton άγαρ (MHA) και τοποθετούμε την ταινία του E-test στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες σε αερόβια ατμόσφαιρα γίνεται η ανάγνωση της MIC στο άκρο της ελλειψοειδούς καμπύλης που σχηματίζεται. Στην εικόνα 3 φαίνεται η MICενός στελέχους σταφυλόκοκκου έναντι στην οξακιλλίνη.

Πρόσφατες μελέτες αξιολογούν τη μέθοδο διάχυσης με δίσκο κεφοξιτίνης για την ανίχνευση αντοχής στη μεθικιλίνη να έχει αξιόπιστα αποτελέσματα με ευαισθησία περίπου 100% και ειδικότητα 99% (MartinsandCunha, 2007). Οι Cauwelieretal βρήκαν σε μία μελέτη ότι η ευαισθησία ήταν 100% και η ειδικότητα 99% για τον έλεγχο με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων κεφοξιτίνης, ενώ η ευαισθησία έπεφτε στο 91,7% χρησιμοποιώντας δίσκο οξακιλλίνης (MartinsandCunha, 2007).

Στις μέρες μας ένας μικροοργανισμός MRSA συχνά παρουσιάζει αντοχή και στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, όπως αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, τετρακυκλίνες, και φλουοροκινολόνες. Επιπρόσθετα, τα MRSA στελέχη θεωρούνται ανθεκτικά σε όλες τις κεφαλοσπορίνες, κεφεπέμες, και άλλα β-λακταμικά πχ. αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, καρβαπενέμες, άσχετα από τα αποτελέσματα της invitro ευαισθησίας (Lee, 2003).

Πρόσφατα έχουν περιγραφεί στελέχη με οριακή αντοχή στη μεθικιλίνη τα οποία ονομάζονται MRSA low-level ή Borderline Resistant *S. aureus* (χαμηλού επιπέδου MRSA ή οριακής αντοχής στελέχη MRSA). Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από MIC λίγο μεγαλύτερες από εκείνες των ευαίσθητων στελεχών (MIC= 4-8 μg/mL) και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του *mecA* γονιδίου στο χρωμόσωμά τους (Champers, 1997).



Εικόνα 3. E-test οξακιλλίνης

3.2.1.3 Αντοχή στις Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες προέρχονται από μικροοργανισμούς του γένους *Streptomyces* (στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, καναμυκίνη, τομπραμυκίνη) και *Micromonospora* (γενταμικίνη). Κάποιες όπως η αμικασίνη και η νετιλμικίνη είναι ημισυνθετικά παράγωγα. Είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά και δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση αφού συνδεθούν με το 16S rRNA της 30S υπομονάδας του ριβοσώματος του μικροβίου (Λεγάκης, 1991; Vakulenko and Mobashery, 2003).

Ο πιο συχνός μηχανισμός αντοχής είναι η παραγωγή ενζύμων που τροποποιούν ή αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύνδεσή τους με το βακτηριακό ριβόσωμα και επομένως ο μικροοργανισμός να επιβιώνει. Τα ένζυμα αυτά των οποίων η παραγωγή ρυθμίζεται από γονίδια που εδράζουν σε τρανσποζόνια ή και πλασμίδια (Λεγάκης, 1991) ανήκουν σε τρεις κατηγορίες (AAC ακετυλοτρανσφεράσες,

ANT αδενυλοτρανσφεράσες, και APH φωσφοτρανσφεράσες) ανάλογα με τη δράση τους (Vakulenko and Mobashery, 2003).

3.2.1.4 Αντοχή στις Μακρολίδες- Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη B (Macrolide- Lincosamide-Streptogramin B)

Πρόκειται για βακτηριοστατικά αντιβιοτικά με κοινό μηχανισμό δράσης και αντοχής. Αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση αφού ενωθούν με το 23S τμήμα της 50S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσωμικού RNA.

Οι μακρολίδες αποτελούνται από ένα μακροκυκλικό δακτύλιο λακτόνης ο οποίος είναι συνδεδεμένος με γλυκοσιδικούς δεσμούς με διάφορα σάκχαρα. Οι λινκοσαμίδες (λινκομυκίνη, κλινδαμυκίνη) δεν φέρουν λακτονικό δακτύλιο. Οι στρεπτογραμμίνες αποτελούνται από μακρολακτόνη και κυκλικό πεπτίδιο (Leclercq, 2002; Schmitzetal, 2000) και παράγονται από είδη *Streptomycespristinaespiralis*. Χωρίζονται σε δύο ομάδες, A (νταλφοπριστίνη) και B (κινόπριστίνη).

Η αντοχή των σταφυλόκοκκων οφείλεται σε τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού και στην ύπαρξη μηχανισμού αντλίας εκροής για την ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού από το μικρόβιο (Caneparietal, 1985; Chambers, 1997; Chambers, 1999).

Διακρίνονται τρεις φαινότυποι αντοχής:

- 1) Ο φαινότυπος M με υπεύθυνα γονίδια *ereA* και *ereB* τα οποία υδρολύουν τον λακτονικό δακτύλιο των 14μελών και 15μελών μακρολίδων μόνο.
- 2) Ο φαινότυπος MS_B ο οποίος κωδικοποιείται από το πλασμιδιακό γονίδιο *msrA* και χαρακτηρίζεται από αντοχή στις μακρολίδες (14μελείς και 15μελείς) καθώς και τη στρεπτογραμμίνη B. Η δραστηριότητα της κλινδαμυκίνης δεν επηρεάζεται (Leclercq, 2002,). Η αντοχή αυτή είναι συχνότερη στους CNS σταφυλόκοκκους παρά τον *S.aureus*.
- 3) Ο φαινότυπος MLS_B όπου μεθυλάσες τάξης *erm* (erythromycinribosomemethylase) προκαλούν τη μεθυλίωση της αδενίνης 2058 του 23S τμήματος rRNA της 50S υπομονάδας με αποτέλεσμα την αδυναμία της ένωσης του αντιβιοτικού με το στόχο δράσης του (ριβόσωμα). Οι μεθυλάσες αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ermA*, *ermB* και *ermC* με συχνότερη την ύπαρξη των *ermA* και *ermC* για τους σταφυλόκοκκους ειδικότερα. Τα *ermA* γονίδια βρίσκονται στο τρανσποζόνιο Tn554 και τα *ermC* εδράζουν σε πλασμίδιο (Spiliopoulouetal, 2004; Schmitzetal, 2000). Ο φαινότυπος αυτός αντοχής είναι επαγωγίμος (inducibleresistancephenotype) όπου οι 14-μελείς και 15-μελείς μακρολίδες αποτελούν τον επαγωγέα του μηχανισμού εκροής, ενώ οι 16-μελείς μακρολίδες, οι λινκοσαμίδες και οι στρεπτογραμμίνες ομάδας B παραμένουν δραστικές.

3.2.1.5 Αντοχή στα Γλυκοπεπτίδια

Τα πρώτα δύο στελέχη του *S. aureus* ανθεκτικά στη βανκομυκίνη (VRSA) απομονώθηκαν το 2002 στις Η.Π.Α. (Martin and Cuhna, 2008). Μέχρι τότε τα

γλυκοπεπτίδια με κύρια τη βανκομυκίνη αποτελούσαν φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση σοβαρών MRSA λοιμώξεων. Τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται ολοένα και περισσότερα στελέχη με μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στα γλυκοπεπτίδια.

Τα γλυκοπεπτίδια είναι μια ομάδα βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών που παράγονται από ακτινομύκητες με κυριότερα μέλη τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Παρουσιάζουν ένα στενό φάσμα δράσης κατά των Gram θετικών βακτηρίων μόνο. Δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος εμποδίζοντας τον πολυμερισμό της πεπτιδογλυκάνης (WalshandHowe, 2002).

Ο μηχανισμός αντοχής των σταφυλόκοκκων στα γλυκοπεπτίδια δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Φαίνεται ότι οφείλεται σε μορφολογικές αλλαγές του κυτταρικού τοιχώματος και συγκεκριμένα σε πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος με περιορισμένο πολυμερισμό της πεπτιδογλυκάνης (Cuietal, 2003). Πιθανώς η βανκομυκίνη παγιδεύεται στο παχύ κυτταρικό τοίχωμα και έτσι δεν μπορεί να συνδεθεί με την D-αλανίνη και να δράσει. Η ελαττωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη φαινοτυπικά μπορεί να εκδηλωθεί ως ενδιάμεση αντοχή (VancomycinIntermediate*S.aureus*, VISA) αλλά και ως ετεροαντοχή (hetero-VISA, hVISA) με τα στελέχη να εμφανίζουν MICs εντός της υποτιθέμενης ευαισθησίας και παράλληλα να περιλαμβάνουν λίγους υποπληθυσμούς VISA (Appelbaum, 2006; Appelbaum, 2007; WalshandHowe, 2002).

Τα στελέχη *S. aureus* που παρουσίασαν πλήρη αντοχή στη βανκομυκίνη (VRSA) έφεραν το γονίδιο *vanA*, το οποίο κωδικοποιεί την αντοχή στελεχών εντερόκοκκου στη βανκομυκίνη (Nobleetal, 1992; PerichonandCourvalin, 2009). Το γονίδιο αυτό προκαλεί την αντικατάσταση του διπεπτιδίου D-alanyl-D-alanine από το D-alanyl-D-lactate το οποίο παρουσιάζει μειωμένη σύνδεση με τη βανκομυκίνη (WalshandHowe, 2002). Το γονίδιο *vanA* εδράζει στο τρανσποζόνιο Tn1546 σε στέλεχος *E. faecalis* ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και μεταφέρεται από αυτό σε στέλεχος *S. aureus* όπου και ενσωματώνεται σε πολυανθεκτικό συζευκτικό πλασμίδιο (Appelbaum, 2007; PerichonandCourvalin, 2009).

3.2.1.6 Αντοχή στις Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικά αντιβιοτικά ευρέος φάσματος τα οποία αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Συνδέονται με αντιστρεπτό τρόπο με το σημείο A της 30S υποομάδας των ριβοσωμάτων εμποδίζοντας τη σύνθεση του aminoacyl-tRNA καθιστώντας έτσι αδύνατη τη σύνθεση νέων αμινοξέων στη πεπτιδική αλυσίδα (Χαλεβελάκης και συν, 1994).

Το φαινόμενο της αντοχής του σταφυλόκοκκου στις τετρακυκλίνες οφείλεται σε δύο μηχανισμούς: 1) ενεργητική αποβολή του αντιβιοτικού: είναι ο συνηθέστερος μηχανισμός. Ρυθμίζεται από τα γονίδια *tetK* και *tetL* που βρίσκονται σε πλασμίδια (Guayetal, 1993; KhanandNovick, 1983), και τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αυξημένη απέκκριση του αντιβιοτικού από το μικροβιακό κύτταρο προστατεύοντας έτσι τα ριβοσώματα (ChopraandRoberts, 2001), 2) παραγωγή προστατευτικών πρωτεϊνών οι οποίες εμποδίζουν την ένωση των τετρακυκλινών με τα ριβοσώματα. Υπεύθυνα είναι τα γονίδια *tetM* και *tetO* τα οποία

εδράζουν σε τρανσποζόνια ή στο χρωμόσωμα (Bismuthetal, 1990; Nesinetal, 1990; Schmitzetal, 2001; Trzcinskietal, 2000; Warsaetal, 1996). Τα στελέχη *S. aureus* που φέρουν μόνο το *tetK* γονίδιο παρουσιάζουν αντοχή στην τετρακυκλίνη, και ευαισθησία στη μινοκυκλίνη, ενώ τα στελέχη εκείνα που διαθέτουν το *tetM* γονίδιο εμφανίζουν αντοχή σε όλες τις τετρακυκλίνες (Bismuthetal, 1990; Schmitzetal, 2001; Warsaetal, 1996).

3.2.1.7 Αντοχή στις Κινολόνες

Οι κινολόνες (ναλιδιζικό οξύ και νεότερες φθοριοκινολόνες) είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά, ευρέος φάσματος, τα οποία αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA στον πυρήνα του βακτηριακού κυττάρου. Παρεμβαίνουν στη δράση της DNA-γυράσης A (τοποϊσομεράση II), ένζυμο που συνεισφέρει στην υπερέλικωση του βακτηριακού DNA και τη δράση της τοποϊσομεράσης IV, ένζυμο απαραίτητο για την αποπεριέλιξη του βακτηριακού DNA ώστε να ακολουθήσουν οι διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης. Η αντοχή είναι χρωμοσωμική και οφείλεται στα γονίδια *gyrA*, *gyrB* και στα *parC* και *parE* αντίστοιχα (Χαλεβελάκης και συν, 1994; Lowy, 2003).

3.2.1.8 Αντοχή στο Φουσιδικό Οξύ

Παράγεται από το μύκητα *Fusidiumcoccineum* και δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση αφού επεμβαίνει στην απελευθέρωση του παράγοντα επιμήκυνσης G (EF-G) από το ριβόσωμα. Έχει περιγραφεί γρήγορη και συχνότερη αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία και όχι σε συνδυασμό με άλλα αντισταφυλοκοκκικά φάρμακα όπως η ριφαμπικίνη.

Υπεύθυνο για την αντοχή στο φουσιδικό οξύ είναι το χρωμοσωμικό γονίδιο *fusA* το οποίο κωδικοποιεί τον παράγοντα G (Besieretal, 2003; O'Neilletal, 2001; O'Neilletal, 2007).

3.2.1.9 Αντοχή στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφοναμίδες

Χρησιμοποιούνται μαζί αφού έχουν συνεργική δράση. Και τα δύο αντιβιοτικά επηρεάζουν τη σύνθεση του φυλλικού οξέος. Οι σουλφοναμίδες παρεμποδίζουν την διυδρο-πτερική συνθετάση (dihydro-pteratesynthetase, DHPS) η οποία καταλύει τη μετατροπή του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (para-aminobenzoicacid, PABA) σε διυδροφυλλικό οξύ (dihydrofolate). Στο επόμενο στάδιο του μεταβολικού κύκλου του φυλλικού οξέος, η τριμεθοπρίμη (TMP) αναστέλλει τη διυδροφυλλική αναγωγή (dihydrofolatereductase, DHFR) η οποία καταλύει το σχηματισμό τετραϋδροφυλλικού οξέος από το διυδροφυλλικό οξύ, με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA αφού το τετραϋδροφυλλικό οξύ συμβάλλει στη μεθυλίωση της ουρακίλης και τον επακόλουθο σχηματισμό της θυμίνης (Χαλεβελάκης και συν, 1994). Η αντοχή της TMP

είναι πλασμιδιακή και οφείλεται στην παραγωγή μιας διαφορετικής διυδροφυλλικής αναγωγάσης η οποία είναι ανθεκτική στο αντιβιοτικό (Daleetal, 1995).

Η αντοχή στις σουλφοναμίδες οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων όπως του DHPS, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η τεταρτογενής δομή του ενζύμου συνθετάσης του διυδροπτεροϊκού οξέος. Η συνέργεια βασίζεται στο ότι αναστέλλουν δύο διαφορετικά αλλά συνάμα διαδοχικά στάδια της μεταβολικής οδού.

3.2.1.10 Αντοχή στη Χλωραμφενικόλη

Τα στελέχη *S. aureus* που είναι ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη διαθέτουν ένα επαγώγιο ένζυμο το οποίο αδρανοποιεί το αντιβιοτικό μέσω της ακετυλίωσης παρουσία του ακέτυλο-συνενζύμου A.

Η χλωραμφενικόλη έχει βακτηριοστατική δράση. Συνδέεται στη 50S ριβοσωμική υπομονάδα και αναστέλλει το στάδιο της τρανσπεπτιδίωσης (transpeptidation) για την πρωτεϊνοσύνθεση. Ο μηχανισμός αντοχής στους *S. aureus* στηρίζεται πιο συχνά στη δράση του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (chloramphenicolacetyltransferase, CAT).

Τα γονίδια για το CAT εδράζουν σε πλασμίδια (MurrayandShaw, 1997; Schwarzetal, 2004).

3.2.1.11 Αντοχή στις Οξαζολιδινόνες-Λινεζολίδη

Οι οξαζολιδινόνες αποτελούν μια νέα κατηγορία συνθετικών αντιβιοτικών. Η λινεζολίδη είναι το πιο σημαντικό μέλος της κατηγορίας αυτής. Έχουν βακτηριοστατική δράση και αναστέλλουν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συνδέονται στο 23S τμήμα του ριβοσωμικούRNA στην υποομάδα 50S με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν το σύμπλοκο έναρξης 70S το οποίο είναι απαραίτητο στη διαδικασία μεταγραφής (Livermore, 2003).

Λόγω του γεγονότος ότι είναι συνθετικό παράγωγο και λόγω του ότι η περιοχή V του 23SrRNA κωδικοποιείται από γονίδια που εδράζουν σε πολλαπλά αντίγραφα, σε ένα είδος η ανάπτυξη αντοχής είναι δύσκολη (Xiongetal, 2000). Να αναφέρουμε ειδικά για τον *S.aureus* ότι διαθέτει 4 έως 7 αντίγραφα γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν την περιοχή V του 23SrRNA και για να επιτευχθεί αντοχή πρέπει να πραγματοποιηθούν μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα αντίγραφα (Swaneyetal, 1998).

Έχουν περιγραφεί κάποια σποραδικά στελέχη MRSAκαι MRCNS ανθεκτικά στη λινεζολίδη παγκοσμίως με τα περισσότερα όμως να απομονώνονται κυρίως στις Η.Π.Α. (Hilletal, 2010; Kellyetal, 2008; Potoskyetal, 2006).

Ο μηχανισμός αντοχής στη λινεζολίδη στηρίζεται σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο 23SrRNA ή στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3 και L4. Στους σταφυλόκοκκους έχει παρατηρηθεί συχνότερα η G2576T μετάλλαξη που προσδίδει αντοχή στα στελέχη

σταφυλόκοκκων (Hillel, 2010). Πρόσφατα έχει περιγραφεί και ένας άλλος πλασμιδιακός μηχανισμός αντοχής ο οποίος οφείλεται στο γονίδιο *cfr* (chloramphenicol-florfenicolresistancegene) (Kelly, 2008; Potosky, 2006) το οποίο κωδικοποιεί μια μεθλοτρανσφεράση (Mendes, 2008; Toh, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά Στελεχών *Staphylococcus* spp. στους Χοίρους

4. 1. Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά Στελεχών *S. aureus* στους Χοίρους

Η απομόνωση πολυανθεκτικών στελεχών *S. aureus* αποτελεί νέο αναδυόμενο πρόβλημα στην κτηνιατρική. Ολοένα και περισσότερο αυξάνεται παγκοσμίως η καταγραφή περιπτώσεων σταφυλοκοκκικής λοίμωξης και φορείας στα ζώα και πρόσφατες μελέτες δίνουν έμφαση στις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η επαγγελματική επαφή με τα ζώα στους κτηνοτρόφους και το κτηνιατρικό προσωπικό κυρίως των στελεχών που παρουσιάζουν αντοχή στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (Atanassova et al, 2001; Moodley et al 2006; Vosset al 2005).

Έρευνες μεταξύ των εκτρεφόμενων ζώων έχουν δείξει ότι οι χοίροι αποτελούν μια σημαντική δεξαμενή πολυανθεκτικών στελεχών *S. aureus*, ωστόσο τα ποσοστά παρουσίας τόσο του *S. aureus* και ειδικότερα των ανθεκτικών στελεχών διαφέρουν στις επιμέρους έρευνες (Lassok and Tenhagen, 2013). Ενδεικτικά να αναφέρουμε ότι σε χοίρους υψηλός επιπολασμός στελεχών *S. aureus* που ήταν ανθεκτικά εκτός των β-λακταμικών και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών καταγράφηκε σε αρκετές χώρες όπως στην Κίνα, την Ολλανδία, τη Γερμανία, το Βέλγιο και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Στην Ολλανδία μελετήθηκαν δείγματα απομονωθέντα από τις ρινικές κοιλότητες χοίρων και 39% των χοίρων έφεραν MRSA στελέχη. Σχεδόν όλα αυτά τα στελέχη ήταν ευαίσθητα ή μετρίως ευαίσθητα στη CIP και SXT, ενώ ήταν ανθεκτικά στην E, CC και τις αμινογλυκοσίδες GM, καναμυκίνη, τομπραμυκίνη και νεομυκίνη σε ποσοστό 30% (de Neeling et al, 2007). Οι Frana et al (2013) στην Iowa των Η.Π.Α απομόνωσαν MRSA σε 17,5% δειγμάτων χοίρων από τα οποία τα περισσότερα ήταν ανθεκτικά παράλληλα και στην TE ενώ λιγότερα από τα μισά έδειξαν αντοχή και στις αμινογλυκοσίδες GM και νεομυκίνη. Οι Van Duijkeren et al (2008) σε δείγματα που εξέτασαν από τις ρινικές κοιλότητες χοίρων απομόνωσαν MRSA σε ποσοστό 11%. Τα στελέχη αυτά εμφάνισαν ανθεκτικότητα επιπλέον στην TE, E και GM ενώ αξιοσημείωτη ήταν η ευαισθησία όλων των στελεχών στην SXT παρά τη συχνή και ευρεία χρήση της στους χοίρους. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Ho et al (2012) καταγράφει την παρουσία *S. aureus* στις ρινικές κοιλότητες στο 24,9% των χοίρων από τους οποίους 21,3% ήταν MRSA. Όλα τα MRSA και MSSA απομονωθέντα στελέχη εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα με την αντοχή στην CC και CIP να είναι 100% και στην TE 98,5%. Σημαντική αντοχή εμφάνισαν τα στελέχη και στη GM, E και C (Quinet al, 2002; van Duijkeren et al, 2008). Τέλος, σε μία συγκεντρωτική μελέτη της EFSA που πραγματοποιήθηκε το 2008 καταγράφηκε σε φάρμες χοίρων η παρουσία κυρίως *S. aureus* ανθεκτικού στα αντιβιοτικά σε 12 από 26 Ευρωπαϊκές χώρες (EFSA 2009).

Το 2003 περιγράφηκε για πρώτη φορά ένα νέο πολυανθεκτικό στέλεχος *S. aureus* με τύπο ακολουθίας (MultiLocusSequenceTyping, MLST) ST 398 ο οποίος έκτοτε έχει

καταγραφεί σε υψηλά ποσοστά σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα χοίρων στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τον Καναδά και τις Η.Π.Α. (Watersetal, 2011). Στις περισσότερες μελέτες ο κυρίαρχος κλώνος 398 επιδεικνύει υψηλά επίπεδα αντοχής στα περισσότερα κοινά αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, στελέχη MRSA CC398 που απομονώθηκαν από χοίρους εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα και ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά αντοχής στην ΤΕ. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα MSSA CC398 (MethicillinSensitive*S. aureus*) στελέχη επίσης παρουσίασαν υψηλά επίπεδα αντοχής κυρίως στην ΤΕ και τις μακρολίδες (Oppligeretal, 2012).

Οι διάφορες μελέτες στο σύνολό τους καταγράφουν στους χοίρους την αύξηση της παρουσίας στελεχών *S. aureus* που έχουν αναπτύξει αντοχή σε περισσότερα αντιβιοτικά παγκοσμίως με ποσοστά επιπολασμού που διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή (Normanno etal, 2007). Η ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής οφείλεται στην επαναλαμβανόμενη, μακροχρόνια, αλόγιστη και ακατάλληλη χρήση του συγκεκριμένου αντιμικροβιακού παράγοντα (Calderon-James etal, 2002). Οι ΤΕ για παράδειγμα αποτελούν τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην κτηνοτροφία για την αντιμετώπιση λοιμώξεων αλλά και ως αυξητικοί παράγοντες για την εκτροφή των ζώων. Γενικά όταν για την επιλογή ενός αντιβιοτικού ως θεραπευτική αγωγή του *S. aureus* πρέπει να έχουμε πάντα υπόψη μας το ενδεχόμενο ανάπτυξης πολυανθεκτικότητας (Mekuriaetal, 2013).

Πρόσφατες μελέτες περιγράφουν τη μετάδοση πολυανθεκτικών στελεχών *S. aureus* από τους χοίρους στον άνθρωπο ιδιαίτερα λόγω επαγγελματικής επαφής με το ζώο ή και μέσω των ζωικών προϊόντων (Oppligeretal, 2012). Επομένως ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στα ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* που απομονώνονται από φάρμες χοίρων καθώς ο μικροοργανισμός αποτελεί πηγή ανθρώπινης λοίμωξης είτε μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων είτε μέσω της επαφής με τα μολυσμένα ζώα (Lee, 2003).

Η στοματική κοιλότητα, κυρίως οι αμυγδαλές, παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού κατά των παθογόνων μικροοργανισμών αφού λειτουργούν ως δευτερογενές λεμφικό όργανο το οποίο ξεκινά την ανοσολογική αντίδραση εναντίον των παθογόνων (Horteret al, 2003). Γενικά, οι αμυγδαλές των χοίρων αποτελούν δεξαμενές παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων. Τα παθογόνα βακτήρια τα οποία συχνά παρατηρούνται στις αμυγδαλές των χοίρων περιλαμβάνουν *Salmonellaspp*, είδη της οικογένειας *Pasteurellaceae* και Gram θετικά βακτήρια όπως οι εντερόκοκκοι *E. faecalis* και *E. faecium*, ο *S. aureus* και *Streptococcus dysgalactiae* και *Streptococcus porcinius* (Devrieseetal, 1994; Loweetal, 2011).

4.2 MRSA και η Παρουσία του στους Χοίρους

Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* αρχικά περιορίστηκε στο χώρο των νοσοκομείων μέχρι το 1982, όταν πρωτοπεριγράφηκε στους χρήστες ναρκωτικών. Το 1998 τέσσερα παιδιά πέθαναν από MRSA οπότε και ο σταφυλόκοκκος πλέον εξελίχθηκε σε βακτήριο της κοινότητας (Daskalaki et al, 2010). Το 1944 όταν εισήχθη η πενικιλίνη περισσότερα από 94% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό αυτό. Αυτό

μειώθηκε στο μισό τη δεκαετία του 1950 και στις μέρες μας περίπου 80-90% των στελεχών αναπτύσσουν ανοχή.

Η εισαγωγή της μεθικιλίνης και των άλλων αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών όπως η οξακιλλίνη και η ανθεκτική στην πενικιλινάση μεθικιλίνη το 1959 ήταν ένα μεγάλο βήμα στη θεραπεία των σταφυλόκοκκων. Το 1961 έγινε η πρώτη αναφορά για MRSA (Jevons 1961, Normannoetal, 2007).

Τα τελευταία χρόνια ο *S. aureus* αποτελεί μείζον θέμα για τη δημόσια υγεία κι αυτό γιατί η επιδημιολογία του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) έχει αλλάξει. Αρχικά ήταν ένα ενδονοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο (Healthcareassociated, HA-MRSA), ενώ από το 1990 έχουν καταγραφεί περιστατικά σε ανθρώπους που δεν είχαν καμία επιδημιολογική σχέση με νοσοκομεία (Communityassociated, CA-MRSA). Πρόσφατες μελέτες κάνουν αναφορά για MRSA στελέχη σε χοίρους, πουλερικά, βοοειδή (Morcillo etal, 2015), ακόμη και σε εκτρεφόμενα ψάρια (Sergelidis etal, 2014). MRSA στελέχη έχουν απομονωθεί από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Normannoetal, 2007; Firinuetal, 2003) και το ενδιαφέρον για τα ζώα ως δεξαμενή για MRSA στελέχη έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε χοίρους έδειξαν υψηλόεπιπολασμόMRSAστελεχών σε αρκετές χώρες όπως στην Κίνα, την Ολλανδία, τη Γερμανία, το Βέλγιο και τις Η.Π.Α. Ενδεικτικά να αναφέρουμε ότι στην Ολλανδία μελετήθηκαν δείγματα απομονωθέντα από τις ρινικές κοιλότητες χοίρων και 39% των χοίρων έφεραν MRSA στελέχη (deNeelingetal, 2007). Οι Khannaetal (2007) αναφέρουν την ανίχνευση MRSA στο 25% των χοίρων σε δείγματα από τις ρινικές κοιλότητες. Οι Franaetal (2013) στην Iowa των Η.Π.Α απομόνωσαν MRSA σε 17,5% δειγμάτων χοίρων. Οι VanDuijkerenetal (2008) σε δείγματα που εξέτασαν από τις ρινικές κοιλότητες χοίρων απομόνωσαν MRSA σε ποσοστό 11%. Οι Hoetal (2012) αναφέρουν ότι από το 2005 έχουν αυξηθεί σημαντικά τα ποσοστά MRSA στους χοίρους. Συγκεκριμένα, εκείνοι καταγράφουν την παρουσία *S. aureus* στις ρινικές κοιλότητες στο 24,9% των χοίρων από τους οποίους 21,3% είναι MRSA. Αντίθετα, κανένα στέλεχος MRSA δεν απομονώθηκε από χοίρους σε κάποιες άλλες μελέτες όπως σε εκείνη των Leeetal (2003). Στην Ελβετία καταγράφηκε πολύ μικρό ποσοστό MRSA από τους Huberetal (2009) γεγονός που αποδόθηκε στην ελεγχόμενη και πολύ περιορισμένη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία στη χώρα αυτή, στην καλύτερη κατάσταση της υγείας των χοίρων συγκρινόμενη με άλλες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και τέλος στο χαμηλό ποσοστό εισαγόμενων ζωντανών χοίρων (<1%) στην χώρα.

Το 2005 η παρουσία ενός ξεχωριστού κλώνου MRSA στους χοίρους (CC398) και η μετάδοσή του στους ανθρώπους καταγράφηκε για πρώτη φορά (Morcilloetal 2015; Rexaraetal 2010; Vossetal, 2005). Στη συνέχεια, υψηλό ποσοστό αποικισμού χοίρων με MRSA αναφέρθηκε σε πολλές χώρες (deNeelingetal, 2007; Dewaeleetal, 2008; Witteetal, 2007) που όμως δε συσχετίστηκε με κλινικά συμπτώματα και λοιμώξεις στους χοίρους.

Η πρώτη αναφορά στον MRSACC398 έγινε σε μια μελέτη που έγινε στη Γαλλία το 2003. Ακολούθησε μια σειρά από μελέτες σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες όπως το Βέλγιο, τη Δανία, τη Γερμανία, αλλά και τον Καναδά, τις Η.Π.Α. και τη Σιγκαπούρη οι οποίες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ευρείας φορείας και αποικισμού στις μύτες των χοίρων από το συγκεκριμένο είδος κλώνου MRSA, το CC 398 (clonalcomplex), γεγονός το οποίο

αρχικά είχε παρατηρηθεί στην Ολλανδία το 2004 (Cunyetal, 2009). Σχεδόν όλα τα στελέχη MRSA που απομονώνονται από τους χοίρους ανήκουν στο είδος κλώνου CC 398 (Cunyetal, 2009).

Ο Vossetal (2005) απομόνωσαν MRSA από ανθρώπους- ασθενείς που ήρθαν σε επαφή με χοίρους (deNeelingetal, 2007). Τα περισσότερα στελέχη MRSA που σχετίζονται με την κτηνοτροφία έχουν κοινό τύπο ακολουθίας(MultiLocusSequenceTyping, MLST) τον ST 398. Υπάρχουν κάποιες αναφορές για μετάδοση και λοιμώξεις στους ανθρώπους (Boschetal, 2010). Ο MRSAST 398 έχει μεταφερθεί από χοίρους στους κτηνοτρόφους στην Ολλανδία (Vossetal 2005) και ένα μεγάλο ποσοστό του ίδιου κλώνου MRSA περιγράφηκε στους χοίρους σφαγής (deNeelingetal, 2007). Το 2012 στελέχη MRSAST 398 έχουν καταγραφεί μεταξύ νοσούντων και αποικισμένων ανθρώπων και χοίρων στην Αυστρία και τη Γερμανία (Witteetal, 2007).Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι ο MRSACC398 μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο ως αποικιστής και μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη κλινική αν και όχι συχνά (Cunyetal. 2009). Στοιχεία από τη Ολλανδία δείχνουν αξιοσημείωτο αριθμό ανθρώπων με επαγγελματική επαφή με τους χοίρους οι οποίοι φέρουν τον MRSACC398 (Cunyetal, 2009).

Όπως στους ανθρώπους, ο MRSA μπορεί να αποικίσει το δέρμα, μύτη και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας στα υγιή ζώα ή να προκαλέσει φλεγμονές κυρίως σε τραύματα όπου υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος (Moodleyetal, 2006). Μελέτες έχουν απομονώσει MRSA στελέχη σε ζώα συντροφιάς όπως ο σκύλος και η γάτα (LeonardandMarkey, 2008) τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο όπως τα κλασικά ανθρώπινα στελέχη γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη επαφή των ζώων αυτών με τον άνθρωπο (Khannaetal, 2008). Στην Ολλανδία σήμερα η επαφή με τους χοίρους θεωρείται παράγοντας κινδύνου για MRSA φορεία (vanDuijkerenetal, 2008).

Η χρήση των αντιβιοτικών στους χοίρους αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εύρεση MRSA θετικών χοίρων. Πέρα από την αντοχή στα β-λακταμικά, έχει καταγραφεί αντοχή και στις τετρακυκλίνες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην Ολλανδία. Σε κάποιες μελέτες όπως του deNeelingetal (2007) βρέθηκε μικρότερο ποσοστό MRSA χοίρων από τον vanDuijkerenetal, (2008) γιατί στην πρώτη μελέτη η συλλογή των χοίρων έγινε στα σφαγεία, όπου μπορεί να έχει υπάρξει διασταυρούμενη επιμόλυνση. Αποικισμένο προσωπικό πιο συχνά βρέθηκε στις MRSA θετικές φάρμες, γεγονός που δείχνει ότι οι κτηνοτρόφοι και γενικά το προσωπικό στις φάρμες με θετικό MRSA έχουν μεγαλύτερο ποσοστό να αποικιστούν παρά στις MRSA αρνητικές φάρμες (vanDuijkerenetal, 2008).

Πολλά στελέχη *S. aureus* έχουν αναπτύξει αντοχή στην μεθικιλίνη και τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αυτά τα MRSA στελέχη είναι τόσα πολλά πλέον στο νοσοκομειακό περιβάλλον που η μεθικιλίνη δεν είναι το πρώτης επιλογής αντιβιοτικό για τη θεραπεία.

Την τελευταία δεκαετία τα στελέχη CA-MRSA έχουν προκαλέσει μια πανδημία κυρίως σε δερματικές λοιμώξεις και φλεγμονές μαλακών μορίων. Τα CA-MRSA στελέχη αυξάνονται συνεχώς και έχει αποδειχθεί ότι η κυτταρολυτική δράση της λευκοκυτταρικής τοξίνης PVL επιδημιολογικά συνδέεται με αυτές τις λοιμώξεις (Lietal, 2010). Επομένως, τα στελέχη CA-MRSA δεν έχουν σχέση με το νοσοκομείο, συνήθως σχετίζονται με την παρουσία της λευκοκτονίνης PVL και τη σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *SCCmec* τύπου IV και V. Τα HA-MRSA φέρουν την

SCC*mec*τύπου I, II και III, ενώ η παρουσία του γονιδίου για την PVL τοξίνη είναι σπάνια (Looetal, 2007). Τα LA-MRSA (Livestock-associated) στελέχη, στελέχη που σχετίζονται με την κτηνοτροφία δηλαδή, φέρουν την SCC*mec* τύπου IVα, V, και μία παραλλαγή του V, γονίδια τα οποία κωδικοποιούν αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες, αμινογλυκοσίδες, τριμεθοπρίμη και φλουοροκινολόνες. Η απουσία της PVL καθώς και άλλων παραγόντων λοιμογονικότητας διαφοροποιεί τα LA-MRSA από τα στελέχη CA-MRSA (LassokandTenhagen, 2013). Σύμφωνα με άλλη εργασία, υπάρχει σημαντική ομολογία στα γονίδια *mec* που βρίσκονται σε στελέχη *S. sciuri* (CNS) οι οποίοι απομονώνονται πιο συχνά σε ζώα και σε ζωικά τρόφιμα, και λιγότερο στους ανθρώπους (Coutoetal, 1996). Οι Antignacetal, (2009) παρατήρησαν ότι στελέχη *S. sciuri* που φέρουν το *mecA* γονίδιο είναι ευαίσθητα στη μεθικιλίνη διότι το γονίδιο αυτό δεν εκφράζεται (Antignacetal, 2009).

Είναι κατανοητό ότι η παρουσία *S. aureus* και περισσότερο η παρουσία στελεχών MRSA στους χοίρους μπορεί να αποτελέσει πηγή λοίμωξης για τον άνθρωπο και να συμβάλει στη διασπορά αυτού του μικροοργανισμού στην κοινότητα, γεγονός εξαιρετικής σημασίας για τη Δημόσια Υγεία.

4.3 Παρουσία Ανθεκτικών στα Αντιβιοτικά CNS στους Χοίρους

Τα τελευταία χρόνια η αντιμικροβιακή αντοχή των ειδών CNS έχει αυξηθεί δραματικά εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης των αντιβιοτικών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα για θεραπευτικούς σκοπούς ή μη (Podkowiketal, 2013).

Η ύπαρξη ανθεκτικών στη μεθικιλίνη CNS (MethicillinResistantCNS, MRCNS) περιγράφηκε για πρώτη φορά στα ζώα και συγκεκριμένα στα κοτόπουλα από τους Kawanoetal (1996). Έκτοτεσε πολλές μελέτες παγκοσμίως έχουν απομονωθεί στελέχη MRCNS σε παραγωγικά ζώα (Fessleretal, 2010; Haennietal, 2011) όπως βοοειδή, χοίρους, αίγες, πρόβατα, άλογα αλλά και σε σκύλους και γάτες (Huberetal, 2011; Tulinskietal, 2012; WeeseandvanDuijkeren, 2010). Οι MRCNS εκτός της αντοχής έναντι των β-λακταμικών εμφανίζουν επιπρόσθετα αντοχή και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών (Huberetal, 2011; vanDuijkerenetal, 2004).

Σύμφωνα με μία θεωρία, οι MRCNS θεωρούνται δεξαμενές γονιδίων αντοχής και κυρίως του *mecA* γονιδίου το οποίο βρίσκεται στην SCC και ευθύνεται για την αντοχή στη μεθικιλίνη (Huberetal, 2011; Shenetal, 2013). Σε πολλές εργασίες οι *S. sciuri* (Kloosetal, 1997) και *S. fleurettii* (Tsubakishitaetal, 2010) καταγράφονται ως φυσική δεξαμενή του *mecA* γονιδίου. Η παρουσία του γονιδίου παρόμοιου με το *mecA* σε όλα τα στελέχη *S. sciuri* ενισχύει τη θεωρία ότι το *mecA* γονίδιο προήλθε και εξελίχθηκε από τους CNS ενώ εξαπλώθηκε και σε στελέχη *S. aureus* (Leclercq, 2009; Wuetal, 1996). Ωστόσο ο *S. sciuri* σπάνια απομονώνεται από τον άνθρωπο και το γονίδιο παρόμοιο με το *mecA* παρουσιάζει 80% ομοιότητα με το *mecA*, γεγονός που ενθαρρύνει την υπόθεση ότι η αντοχή στη μεθικιλίνη ξεκίνησε από τους CNS και μεταφέρθηκε οριζόντια στους *S. aureus* και στα άλλα είδη CNS όπως και σε άλλα γένη βακτηρίων (Shenetal, 2013). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επιπλέον από το ότι η αντοχή στη μεθικιλίνη στα κλινικά δείγματα που απομονώνονται από τον άνθρωπο είναι πιο διαδεδομένη στους CNS παρά στον *S. aureus* (Tulinskietal, 2011; MartinsandCunha, 2007). Επομένως ο

MRSAπιθανώς απέκτησε το SCC*mecA* από τους CNS. Το *mecA*γονίδιο είναι πλέον διαδεδομένο τόσο στους πηκτάση θετικούς σταφυλόκοκκους όσο και στους CNS (Huberetal, 2011).

Πρόσφατα πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί οι οποίες περιγράφουν την ύπαρξη MRCNS στα ζώα (Huberetal, 2011). Οι Huberetal(2011) στη μελέτη τους περιγράφουν την παρουσία στελεχών MRCNS στους χοίρους σε ποσοστό 36,3% από τα οποία σχεδόν τα μισά στελέχη ήταν *S. sciuri*(55,8%) και σχεδόν τα υπόλοιπα *S. fleurettii*(44,2%). Η ύπαρξη στελεχών MRCNS επίσης καταγράφεται στους χοίρους στην εργασία των Zhangetal (2009).

Οι CNS που απομονώνονται από τα ζώα συχνά εμφανίζουν πολυανθεκτικότητα καθώς και αντοχή έναντι των μη β-λακταμικών. Οι BhargavaandZhang (2012) στην έρευνα που πραγματοποίησαν στις Η.Π.Α. κατέγραψαν την παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών CNS (Multi-DrugResistantCNS, MDRCNS) στο 57,1% των χοίρων και συγκεκριμένα τα στελέχη αυτά εμφάνισαν αντοχή στα β-λακταμικά, τις μακρολίδες, την TE και τις στρεπτογραμμίνες, αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στις Η.Π.Α. στην κτηνοτροφία. Οι Huberetal(2011) στη μελέτη που πραγματοποίησαν στην Ελβετία περιγράφουν την παρουσία στελεχών MDRCNS σε ζώα γενικότερα στα οποία συμπεριλαμβάνονταν και χοίροι στο 48,2% ενώ υψηλά ήταν και τα ποσοστά αντοχής στα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά (E, TE και CC) γεγονός που υποδηλώνει ότι οι MDRCNS αποτελούν νεοεμφανιζόμενο πρόβλημα για την κτηνιατρική και τη Δημόσια Υγεία.

Οι *S. epidermidis* και *S. haemolyticus* σταυτοποιούνται συχνά ως αίτιο λοίμωξης στον άνθρωπο (Huberetal, 2011). Ο *S. haemolyticus* ειδικά από τους CNS εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά αντιμικροβιακής αντοχής (Barrosetal, 2012). Γενικότερα στα ζώα ο *S. haemolyticus* παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά πολυανθεκτικότητας με μεγαλύτερη αντοχή έναντι στα μη β-λακταμικά. Οι *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* και *S. sciuri* είναι στελέχη τα οποία εμφανίζουν πολυαντοχή κυρίως στα E, TE, CC, SXT και GM (Huberetal, 2011). Ο *S. haemolyticus* έχει παρατηρηθεί σε χοίρους σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους AdegokeandOkoh (2014). Οι Tulinskietal (2012) επίσης απομόνωσαν σε υψηλά ποσοστά στελέχη *S. haemolyticus* σε φάρμες χοίρων.

Στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Momohetal (2013) στη Νιγηρία απομονώθηκαν στελέχη *S. schleiferi* σε χοίρους τα οποία ήταν ανθεκτικά στην P, TE, SXT και C. Ο *S. schleiferi* είναι ένας δυνητικά παθογόνος μικροοργανισμός ο οποίος προκαλεί κυρίως δερματικές λοιμώξεις στα ζώα συντροφιάς και θα μας απασχολήσει στο μέλλον καθώς πρόσφατα έχει περιγραφεί ως παθογόνο στον άνθρωπο (Davisetal, 2013; Kumaretal, 2007; Tzamalisetal, 2012).

Συνοπτικά να τονίσουμε ότι στελέχη CNS που φέρουν τα παραγωγικά ζώα είναι δυνατό να μολύνουν τα προϊόντα ζωικής προέλευσης, να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα και να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των χειριστών τροφίμων και των καταναλωτών. Η εμφάνιση πολυανθεκτικών CNS θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή όταν ένα ζώο ή ένας άνθρωπος νοσήσει (BhargavaandZhang, 2012). Να προσθέσουμε ότι ο *S. haemolyticus* που απομονώνεται στα ζώα έχει ιδιαίτερη σημασία

για τη Δημόσια Υγεία αν λάβουμε υπόψη μας ότι ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό λοιμώξεων στον άνθρωπο (Huberetal, 2011;vanDuijkerenetal, 2004).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υλικό-Δείγματα

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 35 στελέχη *Staphylococcus*spp., τα οποία απομονώθηκαν από 77 δείγματα αμυγδαλών από σφάγια χοίρων. Τα δείγματα των αμυγδαλών συλλέχθηκαν με άσηπτο τρόπο κατά το χρονικό διάστημα από Νοέμβριο έως Δεκέμβριο του 2015 από βιομηχανικό σφαγείο της περιοχής της Περιφερειακής Ενότητας Καρδίτσας στην Περιφέρεια της Θεσσαλίας. Στο σύνολο των 77 δειγμάτων αμυγδαλών που εξετάστηκαν από σφάγια χοίρων στα 35 δείγματα απομονώθηκαν *Staphylococcus* spp. (45,45%) ενώ 13 από αυτά τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *S. aureus* (37,14%). Στο πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα απομονωθέντα στελέχη *Staphylococcus*spp. που εξετάστηκαν.

Πίνακας 2.1.Εξεταζόμενα στελέχη *Staphylococcus* spp. που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων.

	Αριθμός στελεχών
<i>Staphylococcus</i> spp.	35
<i>S. aureus</i>	13
<i>S. epidermidis</i>	7
<i>S. haemolyticus</i>	4
<i>S. saprophyticus</i>	4
<i>S. hyicus</i>	3
<i>S. lugdunensis</i>	2
<i>S. capitis</i>	1
<i>S. pasteurii</i>	1

1.2 Διερεύνηση Της Ικανότητας Παραγωγής Εντεροτοξινών από τα Απομονωθέντα Στελέχη *S. aureus*

Για την ικανότητα παραγωγής σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών τοξίνης εξετάστηκαν 13 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από τις αμυγδαλές χοίρων. Η ανίχνευση των κλασικών σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) πραγματοποιήθηκε με ειδική τυποποιημένη ανοσοενζυμική δοκιμή KitRidascreen, SET-Total (R-Biopharm, Germany) που βασίζεται στην τεχνική ELISA.

Τα στελέχη *S. aureus* εξετάστηκαν μετά από την ανακαλλιέργεια τους σε BHIB και επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Για την απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων οι καλλιέργειες διηθήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένο ηθμό (μεμβράνες με πόρους 0,2 μm) (WhatmanFP 30/0.2 CA- S, UK). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα υπερκείμενα καλλιέργειών σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0.25 ng/mL.

1.3 Έλεγχος Ευαισθησίας των Απομονωθέντων Στελεχών στα Αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας των 35 σταφυλοκοκκικών στελεχών σε 12 αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Τα αντιβιοτικά και οι αντίστοιχες ποσότητες που ελέγχθηκαν είναι τα παρακάτω: πενικιλίνη (P, 10 U), οξακιλλίνη (OX, 1μg), κεφοξιτίνη (FOX, 30 μg), ερυθρομυκίνη (E, 15 μg), τετρακυκλίνη (TE, 30 μg), κλινδαμυκίνη (CC, 2 μg), γενταμικίνη (GM, 10 μg), σπιροφλοξασίνη (CIP, 5 μg), φουσιδικό οξύ (FA, 10 μg), χλωραμφενικόλη (C, 30 μg), τριμεθοπρίμη- σουλφαμεθοξαζόλη (SXT, 1,25/23,75 μg), και τέλος βανκομυκίνη (VA, 30 μg).

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Διερεύνηση Της Ικανότητας Παραγωγής Εντεροτοξινών από τα Απομονωθέντα Στελέχη *S. aureus*

Εξετάστηκαν 13 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από τις αμυγδαλές χοίρων και δεν διαπιστώθηκε η παραγωγή τοξίνης σε κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη.

2.2. Έλεγχος Ευαισθησίας των Απομονωθέντων Στελεχών στα Αντιβιοτικά

Στο σύνολο των 77 δειγμάτων αμυγδαλών που εξετάστηκαν από σφάγια χοίρων στα 35 δείγματα απομονώθηκαν *Staphylococcus* spp. (45,45%) ενώ 13 από αυτά τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *S. aureus* (37,14%). Κανένα από τα στελέχη που απομονώθηκαν δεν ήταν ανθεκτικό στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (P, OX, FOX), ενώ αρκετά στελέχη ήταν πολυανθεκτικά εκφράζοντας αντοχή σε περισσότερα από τρία αντιβιοτικά. Στο σύνολο των στελεχών *Staphylococcus* spp. που εξετάστηκαν τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής παρουσιάστηκαν στην CC, TE με ποσοστά 68,57% (24 από τα 35 στελέχη) και 65,71% (23 από τα 35 στελέχη) αντίστοιχα. Η χαμηλότερη αντοχή στο σύνολο των στελεχών ανιχνεύθηκε στο FA με ποσοστό 15,62% (5 από τα 35 στελέχη) ενώ όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην GM και τη VA.

Αναλυτικά στον πίνακα 2.2 παρουσιάζεται η αντοχή των στελεχών *Staphylococcus* spp. που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, κανένα από τα 13 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν δεν ήταν ανθεκτικά στην P, OX, FOX, GM και VA. Αντίθετα όλα τα στελέχη *S. aureus* εμφάνισαν αντοχή στην TE, CC και SXT. Διαπιστώθηκε υψηλό ποσοστό στελεχών (92,3%) με αντοχή στην CIP (12 από τα 13 στελέχη), ακολουθούσε η αντοχή στην E με ποσοστό 30,76% (4 από τα 13

στελέχη) ενώ μόνο ένα στέλεχος *S. aureus* ήταν ανθεκτικό στο FA και ένα μόνο στη C (7,69%).

Πίνακας 2.2. Αντοχή των στελεχών *Staphylococcus spp.* που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

	Αριθμός και ποσοστό (%) ανθεκτικών στελεχών							
	<i>S. aureus</i> (n=13)	<i>S. epidermidis</i> (n=7)	<i>S. saprophyticus</i> (n=4)	<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	<i>S. hyicus</i> (n=3)	<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	<i>S. capitis</i> (n=1)	<i>S. pasteurii</i> (n=1)
P	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	-	-	-	-	-	-	-	-
FOX	-	-	-	-	-	-	-	-
E	4 (30,76%)	2 (28,57%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (66,66%)	1 (50%)	-	1 (100%)
TE	13 100%	7 (100%)	4 100%	3 75%	3 100%	2 (100%)	1 100%	1 100%
CC	13 (100%)	6 (85,71%)	-	4 (100%)	3 (100%)	-	1 (100%)	1 (100%)
GM	-	-	-	-	-	-	-	-
CIP	12 (92,3%)	-	-	-	-	-	-	-
FA	1 (7,69%)	1 (14,28%)	-	2 (50%)	-	1 (50%)	-	-
C	1 (7,69%)	2 (28,57%)	-	2 (50%)	1 (33,33%)	-	1 100%	-
SXT	13 (100%)	3 (42,85%)	-	-	3 (100%)	-	-	1 (100%)
VA	-	-	-	-	-	-	-	-

P: πενικιλίνη, **OX:** οξακιλλίνη, **FOX** κεφοξιτίνη, **E:** ερυθρομυκίνη, **TE:** τετρακυκλίνη, **CC:** κλινδαμυκίνη, **GM:** γενταμικίνη, **CIP:** σιπροφλοξασίνη, **FA:** φουσιδικόξύ, **C:** χλωραμφενικόλη, **SXT:** τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, **VA:** βανκομυκίνη.

Από τους CNS, όλα τα στελέχη *S. epidermidis* εμφάνισαν αντοχή στην TE, έξι στελέχη από τα επτά ήταν ανθεκτικά στη CC (85,71%) και τρία στελέχη από τα επτά εμφάνισαν αντοχή στη SXT (42,85%). Δύο στελέχη από τα επτά ήταν ανθεκτικά στην E και C (28,57%) ενώ μόλις ένα στέλεχος παρουσίασε αντοχή στο FA (14,28%). Τα στελέχη *S. saprophyticus* εμφάνισαν επίσης 100% αντοχή στην TE και 25% στην E ενώ παρέμειναν ευαίσθητα στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Υψηλή αντοχή στην TE παρατηρήθηκε και μεταξύ των στελεχών *S. haemolyticus* με ποσοστό 75% (3 από τα 4 στελέχη) ενώ τα μισά στελέχη ήταν ανθεκτικά στο FA και C. Όλα τα στελέχη *S. haemolyticus* παρουσίασαν αντοχή στην CC ενώ μόνο 1 στέλεχος ήταν ανθεκτικό στην E (25%). Το στέλεχος *S. capitis* ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός από την TE, CC και C, όπου παρουσίασε 100% αντοχή. Αντοχή 100% στην TE και CC εμφάνισε επίσης ο *S. pasteurii* και επιπλέον έδειξε αντοχή στην E και SXT (100%).

Τα στελέχη *S. hyicus* παρουσίασαν 100% αντοχή στην TE, CC και SXT ενώ υψηλή ήταν η αντοχή στην E (66,66%) (2 από τα 3 στελέχη) και χαμηλότερη στην C (33,33%) (1 από τα 3 στελέχη). Στα στελέχη *S. lugdunensis* η αντοχή στην TE ήταν 100% και 50% στην E και το FA.

Στον πίνακα 2.3 παρουσιάζονται αναλυτικά οι φαινότυποι αντοχής για το καθένα είδος *Staphylococcus* ξεχωριστά. Από τον πίνακα φαίνεται ότι τα περισσότερα *Staphylococcus* spp. εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα με φαινότυπους που ποικίλλουν ως προς τα αντιβιοτικά και τον αριθμό. Εντούτοις είναι χαρακτηριστικό ότι τα στελέχη *S. aureus* παρουσίασαν 100% πολυανθεκτικότητα. Αναλυτικά, μεταξύ των *S. aureus*, ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε επτά αντιβιοτικά (E, TE, CC, CIP, FA, C και SXT), δύο στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε πέντε αντιβιοτικά (E, TE, CC, CIP και SXT) ενώ δέκα στελέχη εμφάνισαν αντοχή σε τέσσερα αντιβιοτικά και πιο συγκεκριμένα ένα στέλεχος από αυτά τα δέκα ήταν ανθεκτικό στα E, TE, CC και SXT και τα υπόλοιπα εννέα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα TE, CC, CIP και SXT.

Από τους CNS, 54,54% (12 από τα 22 στελέχη) των στελεχών ήταν ανθεκτικά σε τρία ή περισσότερα αντιβιοτικά. Αναλυτικά, ένα στέλεχος *S. epidermidis*, ένα στέλεχος *S. haemolyticus* και ένα στέλεχος *S. hyicus* ήταν ανθεκτικά σε πέντε αντιβιοτικά με ξεχωριστούς φαινότυπους α) E, TE, CC, C και SXT, β) E, TE, CC, FA και C, γ) E, TE, CC, C και SXT αντίστοιχα για το κάθε είδος. Αντοχή σε τέσσερα αντιβιοτικά παρατηρήθηκε σε ένα στέλεχος *S. epidermidis*, σε ένα στέλεχος *S. hyicus* και στο στέλεχος *S. pasteurii* με κοινό φαινότυπο αντοχής E, TE, CC και SXT ενώ επίσης ένα στέλεχος *S. haemolyticus* παρουσίασε αντοχή στα τέσσερα αντιβιοτικά TE, CC, FA και C. Δύο στελέχη *S. epidermidis*, ένα στέλεχος *S. hyicus*, ένα στέλεχος *S. lugdunensis* και το στέλεχος *S. capitis* παρουσίασαν αντοχή σε τρία αντιβιοτικά με κοινή την TE. Τρία στελέχη εμφάνισαν αντοχή σε ένα μόνο αντιβιοτικό, αναλυτικά ένα στέλεχος *S. saprophyticus* και ένα *S. lugdunensis* στην TE ενώ ένα στέλεχος *S. haemolyticus* στην CC.

Πίνακας 2.3. Φαινότυποι αντοχής των στελεχών *Staphylococcus* spp. που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων στα αντιβιοτικά.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Αντιβιοαντοχή	Αριθμός Ανθεκτικών Στελεχών (%)
<i>S. aureus</i> (n=13)	E, TE, CC, SXT	1 (7,69%)
	TE, CC, CIP, SXT	9 (69,23%)
	E, TE, CC, CIP, SXT	2 (15,38%)
	E, TE, CC, CIP, FA, C, SXT	1 (7,69%)
CNS*		
<i>S. epidermidis</i> (n=7)	E, TE, CC, SXT	1 (14,28%)
	E, TE, CC, C, SXT	1 (14,28%)
	TE, CC	2 (28,57%)
	TE, FA	1 (14,28%)
	TE, CC, C	1 (14,28%)
	TE, CC, SXT	1 (14,28%)
<i>S. saprophyticus</i> (n=4)	TE	3 (75%)
	E, TE	1 (25%)
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	CC	1 (25%)
	TE, CC	1 (25%)
	TE, CC, FA, C	1 (25%)
	E, TE, CC, FA, C	1 (25%)
<i>S. hyicus</i> (n=3)	E, TE, CC, C, SXT	1 (33,33%)
	E, TE, CC, SXT	1 (33,33%)
	TE, CC, SXT	1 (33,33%)
<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	E, TE, FA	1 (50%)
	TE	1 (50%)
<i>S. capitis</i> (n=1)	TE, CC, C	1 (100%)
<i>S. pasteurii</i> (n=1)	E, TE, CC, SXT	1 (100%)

P: πενικιλίνη, **OX:** οξακιλλίνη, **FOX** κεφοξιτίνη, **E:** ερυθρομυκίνη, **TE:** τετρακυκλίνη, **CC:** κλινδαμυκίνη, **GM:** γενταμικίνη, **CIP:** σιπροφλοξασίνη, **FA:** φουσιδικόξύ, **C:** χλωραμφενικόλη, **SXT:** τριμεθοπρίμη-σουλφαιμεθοξαζόλη, **VA:** βανκομυκίνη.

* **CNS:** Πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci).

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ανίχνευση Εντεροτοξινογόνων Στελεχών *S. aureus*

Στην παρούσα έρευνα διαπιστώθηκε ότι κανένα από τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από τις αμυγδαλές χοίρου δεν εμφάνισε την ικανότητα παραγωγής των κλασικών σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών. Δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία ανάλογες μελέτες για την παραγωγή σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών από στελέχη *S. aureus* απομονωθέντα από τις αμυγδαλές χοίρων. Πιθανό τα στελέχη αυτά να μην εμπλέκονται στη πρόκληση τροφιμογενούς νόσου. Σχετικά με την ικανότητα παραγωγής εντεροτοξινών μεταξύ των στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα τροφίμων, έχει διαπιστωθεί ότι περίπου το 25% ήταν θετικά στην παραγωγή εντεροτοξινών. Τα στοιχεία διαφέρουν βέβαια σημαντικά ανάλογα με το είδος τροφίμου και από έρευνα σε έρευνα (Bergdoll, 1989; LeLoiretal, 2003). Ειδικότερα για το χοιρινό κρέας αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν διαπιστωθεί διαφορετικά ποσοστάστελεχών θετικών για την παραγωγή τοξινών μεταξύ των στελεχών που εξετάστηκαν αλλά και διαφορές ως προ το είδος της παραγόμενης τοξίνης. Στην Ιταλία 50% των στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από διάφορα προϊόντα κρέατος ήταν εντεροτοξινογόνα και συγκεκριμένα καταγράφηκαν δύο στελέχη που παρήγαν SEC από ψημένο χοιρινό κρέας, ενώ από νωπά αλλαντικά από χοιρινό κρέας τρία στελέχη παρήγαν SEA και δύο SED (Normanno etal, 2007). Οι Atanassovaetal (2001) στη Γερμανία σε μία έρευνά τους αναφέρουν παρουσία *S. aureus* σε δείγματα νωπού χοιρινού κρέατος σε ποσοστό 57,7% από τα οποία 57,1% βρέθηκαν θετικά σε γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών αφού εξετάστηκαν με PCR. Το 1997 στη Florida των Η.Π.Α 17 άνθρωποι προσβλήθηκαν από σταφυλοκοκκική τοξίνωση εξαιτίας κατανάλωσης χοιρομηριού, σε ένα δείγμα του οποίου ανιχνεύθηκε η SEA (Pexara etal, 2012).

Βέβαια παρότι δεν διαπιστώθηκε η ικανότητα παραγωγής των κλασικών σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών από τα συγκεκριμένα στελέχη δεν αποκλείει την πιθανότητα τα στελέχη να φέρουν τα γονίδια για την παραγωγή των τοξινών. Στην παρούσα μελέτη η ικανότητα των στελεχών *S. aureus* να παράγουν τοξίνες μπορεί να έχει υποεκτιμηθεί. Το αποτέλεσμα μας πιθανώς οφείλεται στους τεχνικούς περιορισμούς της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA. Επισημαίνεται ότι η ορολογική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύει μόνο τις κλασικές εντεροτοξίνες SEA-SEE. Η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA δεν μπορεί να ανιχνεύσει τις υπόλοιπες ΣΕς ή τοξίνες παρόμοιες με ΣΕς και όπως αναφέρουν οι Hennekinneetal (2012) εξαιτίας αυτού κάποιες τροφιμογενείς επιδημίες δεν αποδόθηκαν σε κάποιον αιτιολογικό παράγοντα. Από τις νέες εντεροτοξίνες, μόνο η SEH έχει συσχετιστεί ξεκάθαρα με την πρόκληση τροφιμογενούς επιδημίας. Ωστόσο διάφοροι ερευνητές έχουν περιγράψει την συχνή παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν τις νεότερες και πιο πρόσφατες ΣΕς και τοξίνες παρόμοιες με ΣΕς σε στελέχη *S. aureus* που μολύνουν τα τρόφιμα (Argudinetal, 2010). Μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία καταδεικνύει μία αύξηση εντεροτοξινογόνων στελεχών *S. aureus* τα οποία φέρουν επιπρόσθετα των κλασικών γονιδίων και τα νεότερα και πιο πρόσφατα *se* γονίδια. Οι McLauchlinetal (2000) στην εργασία τους περιγράφουν ότι σε 23 στελέχη σταφυλόκοκκων που προκάλεσαν τροφιμογενείς επιδημίες στη

Μεγάλη Βρετανία δεν ανιχνεύθηκαν τα κλασικά *se* γονίδια αλλά ένα ή περισσότερα από τα νεότερα *se*/*sel* γονίδια, πχ. *seg*, *seh*, *sei*, *sel* τα οποία πολύ πιθανό να ευθύνονται για αυτές τις επιδημίες λόγω της παραγωγής των αντίστοιχων ΣΕς. Επίσης πολύ ενδιαφέρον έχει το *ecg* σύμπλεγμα εντεροτοξινογόνων γονιδίων που κωδικοποιεί για διάφορες ΣΕς όπως τις SEG, SEI, SEM, SEN και SEO και έχει ανιχνευθεί πρόσφατα σε στελέχη *S. aureus* απομονωθέντα από τρόφιμα, ιδιαίτερα από ωμό χοιρινό στην Κορέα (Argudinetal, 2010).

3.2 Αντιβιοαντοχή των Απομονωθέντων Στελεχών *Staphylococcus spp.*

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι στο σύνολο των 77 δειγμάτων αμυγδαλών που εξετάστηκαν από σφάγια χοίρων στα 35 δείγματα απομονώθηκαν *Staphylococcus spp.* (45,45%) ενώ 13 από αυτά τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *S. aureus* (37,14%). Μικρότερα ποσοστά κατέγραψαν οι Loweetal (2011) στη μελέτη που πραγματοποίησαν στις Η.Π.Α. και συγκεκριμένα στο Michigan οι οποίοι απομόνωσαν από αμυγδαλές χοίρων *Staphylococcus spp.* στο 20,6%. Στην ίδια μελέτη σε περισσότερες από 50% των αμυγδαλών ταυτοποιήθηκαν με τις φαινοτυπικές μεθόδους στελέχη *S. aureus*, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από τη μελέτη μας. Αρκετά μεγάλη ήταν και η παρουσία στελεχών *S. epidermidis* ενώ στην παρούσα μελέτη το ποσοστό ήταν 20%. Σε μια άλλη εργασία που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα το 83,3% των στελεχών που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων ήταν MRSA και έφεραν το *mecA* γονίδιο. Επίσης, όλα τα στελέχη παρουσίασαν ευαισθησία στη VA και SXT ενώ τα περισσότερα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην CC (91,1%), ακολουθούσε η αντοχή στην P (90,0%) και στην E (85,6%). Τα ποσοστά αυτά είναι παρόμοια με μελέτες άλλων χωρών και αποδεικνύουν την κυρίαρχη χρήση αυτών των αντιβιοτικών στους χοίρους παγκοσμίως (Zhangetal, 2012). Στην παρούσα μελέτη παρόλο που δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος MRSA ή MRCNS, διαπιστώθηκε πολυανθεκτικότητα σε αρκετά στελέχη *Staphylococcus spp.* με μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής να σημειώνονται στην TE και CC. Τα *S. aureus* στελέχη ήταν επιπλέον ανθεκτικά στην E το οποίο συμφωνεί με τις παραπάνω εργασίες, και την SXT εύρημα που διαφέρει από τις άλλες εργασίες ενώ όλα τα στελέχη παρουσίασαν ευαισθησία στη VA όπως και στις άλλες μελέτες. Στο Βέλγιο, οι Baeleetal (2001) κατέγραψαν μεγάλο ποσοστό στελεχών *S. aureus* σε δείγματα αμυγδαλών από μικρούς σε ηλικία χοίρους που θανατώθηκαν μετά τον απογαλακτισμό τους (17 στα 20 χοιρίδια) όπως μεγάλα ήταν και τα ποσοστά των απομονωθέντων *S. hyicus* ενώ δεν απομονώθηκε *S. epidermidis* (Baeleetal, 2001). Σε μία άλλη μελέτη που έγινε στις Η.Π.Α. και συγκεκριμένα στη Minnesota από τους Linharesetal (2013) στο 62% των δειγμάτων που απομονώθηκαν από αμυγδαλές χοίρων βρέθηκαν στελέχη *S. aureus*, ποσοστό πολύ πιο υψηλό από την μελέτη μας, όμως κανένα από αυτά δεν ήταν MRSA, αποτέλεσμα παρόμοιο με την παρούσα μελέτη. Ο Davies (2012) σε μελέτη που πραγματοποίησε πάλι στη Minnesota των Η.Π.Α. αναφέρει ότι σε αμυγδαλές χοίρων ήταν κυρίαρχη η παρουσία *S. aureus* χωρίς όμως να έχει ταυτοποιηθεί στέλεχος MRSA. Αντίθετα στον Καναδά οι O'Sullivanetal (2010) αναφέρουν στην εργασία τους την παρουσία *S. aureus* και *S. hyicus* στο 3,5% και 10,9% αντίστοιχα σε δείγματα αμυγδαλών χοίρων, ποσοστό πολύ μικρότερο από την μελέτη μας για τον *S. aureus* (37,14%) και μεγαλύτερο για τον *S. hyicus* (8,57%).

Αντίστοιχα δεδομένα δεν υπάρχουν για τη χώρα μας. Η ανάπτυξη αντοχής των σταφυλοκοκκικών στελεχών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα σχετίζεται με την αλόγιστη θεραπευτική χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική και κτηνιατρική πράξη καθώς και με την χρήση τους ως αυξητικών παραγόντων στην παραγωγή τροφίμων ζωικής προέλευσης (Barber, etal 2003; Normannoetal 2007). Να σημειώσουμε εδώ ότι η ΤΕ και η Ε αποτελούν αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συχνά στα ζώα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων παγκοσμίως. Σε άλλες χώρες όπως η Ολλανδία εξίσου διαδεδομένη είναι η χρήση της SXT (vanDuijkerenetal, 2008). Αντίθετα σε άλλες χώρες η VΑ και η CC δεν χρησιμοποιούνται στους χοίρους, γεγονός που εξηγεί την ύπαρξη ευαισθησίας στο αντιβιοτικό αυτό ενώ ακόμη και αν προκύψει αντοχή ίσως οφείλεται στη μεταφορά ανθεκτικών στελεχών μεταξύ ζώων, ανθρώπων και περιβάλλοντος (Mekuriaetal, 2013). Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, μπορούμε να εξηγήσουμε τις διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των εργασιών που έχουν δημοσιευθεί και της μελέτης μας. Η δημιουργία ανθεκτικών στελεχών οφείλεται στη μακροχρόνια χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων η οποία προκαλεί πίεση επιλογής τους με επακόλουθη διασπορά και επικράτηση πολυανθεκτικών κλώνων (Aarestrupetal, 2000; Chapinetal, 2005). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα αποτελέσματα της βιοαντοχής διαφέρουν όχι μόνο από χώρα σε χώρα αλλά και από περιοχή σε περιοχή ανάλογα με τα αντιβιοτικά που έχουν χορηγηθεί συχνότερα στους χοίρους της συγκεκριμένης φάρμας καθώς η μακροχρόνια διαδεδομένη χρήση ενός αντιβιοτικού ωθεί τους μικροοργανισμούς να αναπτύξουν νέους μηχανισμούς αντοχής ώστε να επιβιώσουν (Mekuriaetal, 2013). Επιπλέον οι σταφυλόκοκκοι έχουν την ικανότητα εύκολα να τροποποιούν και να προσαρμόζουν την συμπεριφορά τους ανάλογα με το αντιβιοτικό στο οποίο εκτίθενται.

Στην παρούσα μελέτη η παρουσία *S.aureus* σε ποσοστό 37,14% όπως και η παρουσία από τους CNS των *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* και *S.saprophyticus* σε ποσοστά 20%, 11,42% και 11,42% αντίστοιχα στις αμυγδαλές σφάγιων χοίρων έχει ιδιαίτερη βαρύτητα για τη Δημόσια Υγεία λόγω των επιπτώσεων των συγκεκριμένων στελεχών στον άνθρωπο αλλά και λόγω της αυξανόμενης συχνότητας των συγκεκριμένων CNS ως αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες χώρες ώστε να εκτιμηθεί ο επιπολασμός πολυανθεκτικών στελεχών με ιδιαίτερη βαρύτητα στην ανίχνευση MRSA στελεχών, να κατανοηθεί η δυναμική και ο τρόπος μετάδοσής τους όπως και να αποσαφηνιστεί η σχέση τους με την Δημόσια Υγεία. Οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει σε δείγματα που λαμβάνονταν από τις ρινικές κοιλότητες των χοίρων, πολύ λιγότερες σε δείγματα από τις αμυγδαλές χοίρων. Συνοπτικά να αναφέρουμε ότι σε μία συγκεντρωτική μελέτη που έγινε το 2008, η EFSA κατέγραψε την παρουσία MRSA σε εκτρεφόμενα κοπάδια χοίρων σε 12 από τις 26 Ευρωπαϊκές χώρες. Αναλυτικά, στη Γερμανία έχουν καταγραφεί ποσοστά MRSA σε υγιή κοπάδια χοίρων μεταξύ 45-70%, στην Ολλανδία στο 23- 71%, ενώ τα ποσοστά στο Βέλγιο, την Κροατία, τη Δανία και την Πορτογαλία κυμαίνονται σε ποσοστά 16,7-100%. Στελέχη MRSA έχουν αναφερθεί και σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στον Καναδά, τις Η.Π.Α., το Περού και κάποιες Ασιατικές χώρες (LassokandTenhagen, 2013).

Τέλος, να επισημάνουμε ότι οι αμυγδαλές των χοίρων αποτελούν δεξαμενή για τον δυνητικά παθογόνο *S.aureus* και όπως φαίνεται από τις διάφορες εργασίες ο

μικροοργανισμός αυτός απομονώνεται συχνά από τρόφιμα ζωικής προέλευσης γεγονός ιδιαίτερης σημασίας για τη Δημόσια Υγεία. Οι διαδικασίες σφαγής των χοίρων παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του *S.aureus* από τον χοίρο στο χοιρινό κρέας (Lassoketal, 2012). Επομένως, η υγιεινή των σφαγείων αλλά και οι διαδικασίες που ακολουθούνται κατά την αλυσίδα παραγωγής χοιρινού κρέατος επηρεάζουν την παρουσία του μικροοργανισμού στο τελικό προϊόν του κρέατος (Pearceetal, 2004).Επιμόλυνση είναι δυνατό να γίνει επίσης μέσω μολυσμένου μηχανικού εξοπλισμού όπως είναι οι επιφάνειες κοπής, άρα είναι σημαντική η εξυγίανση του εξοπλισμού, ή μέσω των εργαζομένων που αποικίζονται από τον μικροοργανισμό και οι οποίοι οφείλουν να τηρούν σχολαστικά τους κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής.

Στην παρούσα μελέτη δεν απομονώθηκαν στελέχη MRSA αλλά στελέχη MSSA τα οποία εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Επίσης όλα τα στελέχη των CNS ήταν ευαίσθητα στα β-λακταμικά, όμως αρκετά εμφάνισαν πολυανθεκτικότητα σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Η παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών *Staphylococcus* spp. στις αμυγδαλές χοίρων είναι εξαιρετικής σημασίας για τη Δημόσια Υγεία καθώς μπορεί να αποτελέσει πηγή πρόσληψης για τον άνθρωπο και να συμβάλει στη διασπορά αυτών των μικροοργανισμών στην κοινότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aarestrup, F. M., & Jensen, L. B. (2002). Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *Veterinary microbiology*, 89(1), 83-94.
2. Aarestrup, F. M., Kruse, H., Tast, E., Hammerum, A. M., & Jensen, L. B. (2000). Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microbial Drug Resistance*, 6(1), 63-70.
3. Adams M. R., Moss M. O., 2008. 3rd Edition Food Microbiology The Royal Society of Chemistry.
4. Adegoke, A. A., & Okoh, A. I. (2014). Species diversity and antibiotic resistance properties of *Staphylococcus* of farm animal origin in Nkonkobe Municipality, South Africa. *Folia microbiologica*, 59(2), 133-140.
5. Almazan, J., de la Fuente, R., Gomez-Lucia, E., & Suarez, G. (1987). Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from dog infections. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 264(1-2), 29-32.
6. Alouf, J. E., & Müller-Alouf, H. (2003). Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *International journal of medical microbiology*, 292(7-8), 429-440.
7. Andrews, M. M., Parent, E. M., Barry, M., & Parsonnet, J. (2001). Recurrent nonmenstrual toxic shock syndrome: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Clinical infectious diseases*, 32(10), 1470-1479.
8. Antignac, A., & Tomasz, A. (2009). Reconstruction of the phenotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by replacement of the staphylococcal cassette chromosome mec with a plasmid-borne copy of *Staphylococcus sciuri* pbpD gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 435-441.
9. Appelbaum, P. C. (2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(s1), 16-23.
10. Appelbaum, P. C. (2007). Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International journal of antimicrobial agents*, 30(5), 398-408.
11. Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In Mandell, Douglas, Bennett (ed) Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd Edition 1990, p.1511-1518
12. Archer, G. L., & Crossley, K. B. (1997). The staphylococci in human disease. *Churhill Livingstone Inc, New York*, 83-111.
13. Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773.
14. Asperger H, Zangerl P (2003) *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF. (eds), Encyclopedia of Dairy Sciences, vol. 4. Academic Press and Elsevier Science, pp 2563–2569

15. Atanassova, V., Meindl, A., & Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1), 105-113.
16. Αρσένη Α (1994). *Staphylococcus*. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων (σελ.94-113). Αθήνα: Εκδόσεις Ζήτα
17. Baele, M., Chiers, K., Devriese, L. A., Smith, H. E., Wisselink, H. J., Vaneechoutte, M., & Haesebrouck, F. (2001). The Gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *Journal of applied microbiology*, 91(6), 997-1003.
18. Baird Parker, A. C. (1990). The staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(S19).
19. Barber, D. A., Miller, G. Y., & McNamara, P. E. (2003). Modeling food safety and food-associated antimicrobial resistance risk to humans. *Journal of Food Protection*, 66(4), 700-709.
20. Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., Dos Santos, K. R. N., & Giambiagi-deMarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of clinical microbiology*, 50(1), 166-168.
21. Bautista, L., Gaya, P., Medina, M., & Nuñez, M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 566-569.
22. Becker, K., Keller, B., von Eiff, C., Brück, M., Lubritz, G., Etienne, J., & Peters, G. (2001). Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus intermedius*. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5551-5557.
23. Bergdoll MS (1967) The staphylococcal enterotoxins. In: Mateles RI, Wogan GN (eds) *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*. MA: MIT Press, Cambridge, pp 1–25.
24. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Danis JP (1991) A new staphylococcal enterotoxins, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 9:1007.
25. Bergdoll, M. S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York, p. 463–524.
26. Bergdoll, M. S., Crass, B. A., Reiser, R. F., Robbins, R. N., Lee, A. C. M., Chesney, P. J., Danis JP, Vergerott JM, & Wand, P. J. (1982). An enterotoxin-like protein in *Staphylococcus aureus* strains from patients with toxic shock syndrome. *Annals of internal medicine*, 96(6_Part_2), 969-971.
27. Bergdoll, M.S. Lee Wong, A.C, (2006) .Staphylococcal intoxications. In: Rieman, H.P, Cliver, D.O (Eds). *Foodborne Infections and Intoxications*, Academic Press Elsevier Inc, San Diego, California, pp.523-562.
28. Besier, S., Ludwig, A., Brade, V., & Wichelhaus, T. A. (2003). Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 47(2), 463-469.
29. Bhargava, K., & Zhang, Y. (2012). Multidrug-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in food animals. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1027-1036.

30. Bismuth, R., Zilhao, R., Sakamoto, H., Guesdon, J. L., & Courvalin, P. (1990). Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *34*(8), 1611-1614.
31. Boerema, J. A., Clemens, R., & Brightwell, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology*, *107*(2), 192-201.
32. Bosch, T., de Neeling, A. J., Schouls, L. M., van der Zwaluw, K. W., Kluytmans, J. A., Grundmann, H., & Huijsdens, X. W. (2010). PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC microbiology*, *10*(1), 40.
33. Boyce, J. M. (1997). Epidemiology and prevention of nosocomial infections. *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, NY, 309-329.
34. Brown, P. D., & Levine, D. P. (2002). Infective endocarditis in the injection drug user. *Infectious disease clinics of North America*, *16*(3), 645-665.
35. Calderón-Jaimes, E., Espinosa de los Monteros, L. E., & Avila-Beltrán, R. (2002). Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *salud pública de méxico*, *44*(2), 108-112.
36. Canepari, P., Varaldo, P. E., Fontana, R., & Satta, G. (1985). Different staphylococcal species contain various numbers of penicillin-binding proteins ranging from four (*Staphylococcus aureus*) to only one (*Staphylococcus hyicus*). *Journal of bacteriology*, *163*(2), 796-798.
37. Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, *10*(4), 781-791.
38. Chambers, H. F. (1999). Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *Journal of Infectious Diseases*, *179*(Supplement 2), S353-S359.
39. Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., & Schwab, K. (2005). Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental health perspectives*, 137-142.
40. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, *65*(2), 232-260.
41. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, *22*(6), 996-1006.
42. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2009). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
43. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24, CLSI, Wayne, PA, USA.
44. Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J. A., Hubner, R. J., Sanches Is & Tomasz, A. (1996). Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in

- natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*, 2(4), 377-391.
45. Cribier, B., Piemont, Y., & Grosshans, E. (1994). Staphylococcal scalded skin syndrome in adults: a clinical review illustrated with a new case. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(2), 319-324.
 46. Cribier, B., Prevost, G., Couppie, P., Finck-Barbancon, V., Grosshans, E., & Piemont, Y. (1992). Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections?. *Dermatology*, 185(3), 175-180.
 47. Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., & Ferraz, V. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 5-14.
 48. Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., Altmann, D., & Witte, W. (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One*, 4(8), e6800.
 49. Dale, G. E., Langen, H., Page, M. G., Then, R. L., & Stüber, D. (1995). Cloning and characterization of a novel, plasmid-encoded trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase from *Staphylococcus haemolyticus* MUR313. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9), 1920-1924.
 50. Daskalaki, M., Rojo, P., Marin-Ferrer, M., Barrios, M., Otero, J. R., & Chaves, F. (2010). Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 74-77.
 51. Davies P (2012). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in multiple site pig farms. The pork checkoff www. Pork.org
 52. Davis, M. F., Cain, C. L., Brazil, A. M., & Rankin, S. C. (2013). Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing?. *Frontiers in microbiology*, 4, 123.
 53. De Neeling, A. J., Van den Broek, M. J. M., Spalburg, E. C., van Santen-Verheuevel, M. G., Dam-Deisz, W. D. C., Boshuizen, H. C., . A. W. van de Giesen, E. van Duijkeren, & Huijsdens, X. W. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary microbiology*, 122(3), 366-372.
 54. Devriese, L. A., & Hajek, V. (1980). Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 49(1), 1-11.
 55. Devriese, L. A., Hommeze, J., Pot, B., & Haesebrouck, F. (1994). Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(1), 31-36.
 56. Dewaele, I., De Man, I., Stael, A., Delputte, P., Butaye, P., Vlaemynck, G., Herman L., Heyndrickx M., & Rasschaert, G. (2008, June). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Belgian pig farms. In *ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, Copenhagen, Denmark* (p. 23).
 57. Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16-34.
 58. Duthie, E. S. (1954). The production of free staphylococcal coagulase. *Microbiology*, 10(3), 437-444.

59. Eiff, C von., Peters, G., & Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet infectious diseases*, 2(11), 677-685.
60. Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: “Εισαγωγή στη Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα”, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 1987.
61. Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: “Ιατρική Βακτηριολογία”, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 1987
62. EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April 2008
63. European Food Safety Authority (2009). Assessment of the public health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods: Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal*; 993:1-73
64. European Food Safety Authority (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9, 1–378
65. European Food Safety Authority. (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 (1). Part A. MRSA prevalence estimates. *EFSA J.* 7:1376–1467.
66. European Food Safety Authority. (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA J.* 1496.
67. FDA, 2012. *Staphylococcus aureus*, in: Lampel, K.A., Al-Khalidi, S., Cahill, S.M. (Eds.), *Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Second Edition.* Center for Food Safety and Applied Nutrition, pp. 87–92
68. Fessler, A. T., Billerbeck, C., Kadlec, K., & Schwarz, S. (2010). Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65, 1576-1582.
69. Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Poggiu, A., Zuccon, F., Pirino, T., ...& Celano, G. V. (2003). Detection and enterotoxic characterization of *Staphylococcus aureus* from animal food products [Italy]. *Industria Alimentari (Italy)*.
70. Flier A, JVerhoef (1989). An Evaluation of the Role of Surface Hydrophobicity and Extracellular Slime in the Pathogenesis of Foreign-Body-Related Infections Due to Coagulase-Negative Staphylococci . *Journal of Investigative Surgery* 2 (4), 391-396
71. Foster T. *Staphylococcus*. In: *Medical Microbiology*. 4th edition. (ed) Baron S., Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
72. Frana, T. S., Beahm, A. R., Hanson, B. M., Kinyon, J. M., Layman, L. L., Karriker, L. A., Ramirez A., & Smith, T. C. (2013). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. *PLoS One*, 8(1), e53738.
73. Frénay, H. M. E., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Molkenboer, M. J. C. H., & Verhoef, J. (1992). Long-term carriage, and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after discharge from hospital. *Journal of Hospital Infection*, 22(3), 207-215.
74. Gammell, C. G. 1995. Staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Med. Microbiol.* 43:318-327

75. Gemmell, C. G. (1995). Staphylococcal scalded skin syndrome. *Journal of medical microbiology*, 43(5), 318-327.
76. Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., & Leong, D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*, 32(2), 335-351.
77. Guay, G. G., Khan, S. A., & Rothstein, D. M. (1993). The tet (K) gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid*, 30(2), 163-166.
78. Guirguitsova, B., D. Chankova, and B. Zozikov. "Staphylococci as uropathogens-frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity to antimicrobial agents." *Annalesd'urologie*. Vol. 36. No. 5. 2002.
79. Haenni, M., Châtre, P., Boisset, S., Carricajo, A., Bes, M., Laurent, F., & Madec, J. Y. (2011). Staphylococcal nasal carriage in calves: multiresistant *Staphylococcus sciuri* and immune evasion cluster (IEC) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66, 1927-1928.
80. Hájek, V., Horák, V., & Balusek, J. (1988). Phage typing coagulase-positive staphylococci from rooks and gulls. *Research in veterinary science*, 44(2), 247-250.
81. Hakenbeck, R., & Coyette, J. (1998). Resistant penicillin-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 54(4), 332-340.
82. Hanes, D. (2003). In *International handbook of foodborne pathogens*. Miliotis M.D. and Bier J.W. (eds). New York: M. Dekker, 147-159.
83. Hayes, J. R., English, L. L., Carter, P. J., Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D., & White, D. G. (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7153-7160.
84. Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), 815-836.
85. Hill, R. L., Kearns, A. M., Nash, J., North, S. E., Pike, R., Newson, T., Woodford N., Calver R., & Livermore, D. M. (2010). Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 442-445.
86. Ho, J., O'donoghue, M., Guardabassi, L., Moodley, A., & Boost, M. (2012). Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Pig Carcasses in Hong Kong. *Zoonoses and public health*, 59(6), 416-423.
87. Horter, D. C., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2003). A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Animal health research reviews*, 4(02), 143-155.
88. Huber, H., Koller, S., Giezendanner, N., Stephan, R., & Zweifel, C. (2010). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill*, 15(6), 7-10.
89. Huber, H., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G., Zweifel, C., & Stephan, R. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC veterinary research*, 7(1), 6.

90. Huong, B. T. M., Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Van Nhien, N., Mohammad, A., YamatoM, Ota F, Lam NT, Dao HTA... & Khan, N. C. (2010). Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control*, 21(2), 166-171.
91. Ing, M. B., Baddour, L. M., & Bayer, A. S. (1997). Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. *The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, NY*, 331-354.
92. Jevons, M. P. (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *British medical journal*, 1(5219), 124.
93. Jørgensen, H. J., Mørk, T., Høgåsen, H. R., & Rørvik, L. M. (2005). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 158-166.
94. Kahler, R. C., Boyce, J. M., Bergdoll, M. S., Lockwood, W. R., & Taylor, M. R. (1986). Case report: Toxic shock syndrome associated with TSST-1 producing coagulase-negative staphylococci. *The American Journal of Medical Sciences*, 292, 310-2.
95. Karakawa, W. W. (1992). The role of capsular antigens in *Staphylococcus aureus* immunity. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 277(4), 415-418.
96. Karchmer, A. W., Archer, G. L., & Dismukes, W. E. (1983). *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. *Annals of Internal Medicine*, 98(4), 447-455.
97. Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T., & Okamoto, R. (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2072-2077.
98. Kelly, S., Collins, J., Maguire, M., Gowing, C., Flanagan, M., Donnelly, M., & Murphy, P. G. (2008). An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(4), 901-907.
99. Khambaty, F. M., Bennett, R. W., & Shah, D. B. (1994). Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology and infection*, 113(01), 75-81.
100. Khan, S. A., & Novick, R. P. (1983). Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 10(3), 251-259.
101. Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C., & Weese, J. S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary microbiology*, 128(3), 298-303.
102. Kloos W, Bannerman TL. *Staphylococcus and Micrococcus*. (1995) In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed., Washington DC: American Society for Microbiology; p. 282-298
103. Kloos, W. E., & Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(1), 117-140.
104. Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1975). Isolation and Characterization of *Staphylococci* from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus*

- simulans1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(1), 62-79.
105. Kloos, W. E., & Wolfshohl, J. F. (1991). *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 284-289.
 106. Kloos, W. E., and J. H. Jorgensen. 1985. *Staphylococci*, p. 143-153. In: Lennette E. H, Bellows A., Hausler J Jr., and Shadomy H. J (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
 107. Kluytmans, J. A. J. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency?. *Clinical microbiology and infection*, 16(1), 11-15.
 108. Kluytmans, J., Van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 505-520.
 109. Kolle, W., & Otto, R. (1902). Die differencirung der staphylokokken mittelst der agglutination. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 41(1), 369-379.
 110. Koneman, WE., *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Gram-Positive Cocci. Part I: Staphylococci and Related Gram-Positive Cocci.* P 623-671. 6th Edition 2006
 111. Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food control*, 21(6), 805-815.
 112. Kumar, D., Cawley, J. J., Irizarry-Alvarado, J. M., Alvarez, A., & Alvarez, S. (2007). Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transplant Infectious Disease*, 9(4), 336-338.
 113. Κουσκούνη Ε., Τσελένη-Κωτσοβίλη Α. ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ. In: Ιατρική Μικροβιολογία Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. Τόμος ΙΙ, σελ. 15-23
 114. Ladhani, S., Joannou, C. L., Lochrie, D. P., Evans, R. W., & Poston, S. M. (1999). Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 224-242.
 115. Lassok, B., & Tenhagen, B. A. (2013). From pig to pork: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pork production chain. *Journal of food protection*, 76(6), 1095-1108.
 116. Laube T¹, Akgül H, Brockmann C, Höck K, Schüler A, Bornfeld N, Schilling H. Endogenous bacterial endophthalmitis: a retrospective study on 22 consecutive cases. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2004; 221(2):101-108
 117. Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63-76.
 118. Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482-492.
 119. Leclercq, R. (2009). Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(3), 224-231.

120. Lee, J. H. (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and environmental microbiology*, 69(11), 6489-6494.
121. Leonard, F. C., & Markey, B. K. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *The Veterinary Journal*, 175(1), 27-36.
122. Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., & Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1), 38-43.
123. Lew, D. P., & Waldvogel, F. A. (1997). Osteomyelitis. *New England Journal of Medicine*, 336(14), 999-1007.
124. Li, M., Cheung, G. Y., Hu, J., Wang, D., Joo, H. S., DeLeo, F. R., & Otto, M. (2010). Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1866-1876.
125. Linhares, L. L., Sreevatsan, S., Munoz-Zanzi, C. A., Torremorell, M., & Davies, P. R. (2015). The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(1), 55-60.
126. Livermore, D. M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(suppl 2), ii9-ii16.
127. Loeb, L. (1903). The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *The Journal of medical research*, 10(3), 407.
128. Lowe, B. A., Marsh, T. L., Isaacs-Cosgrove, N., Kirkwood, R. N., Kiupel, M., & Mulks, M. H. (2011). Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *Veterinary microbiology*, 147(3), 346-357.
129. Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-1273.
130. Λεγάκης ΝΙ. Μηχανισμοί Αντοχής των σταφυλοκόκκων στα αντιβιοτικά. *Ιατρική* 1991;59(6):553-560.
131. Marrack, P., & Kappler, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 248(4956), 705-712
132. Martins, A., & Cunha, M. (2007). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. *Microbiology and immunology*, 51(9), 787-795.
133. McLauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V., & O'Neill, G. (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of food protection*, 63(4), 479-488.
134. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin PM, Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607-625.
135. Mekuria A, Asrat, A. M. D., Woldeamanuel, Y., & Tefera, G. (2013). Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows and nasal swabs of farm workers in selected dairy farms around Addis Ababa, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 7(27), 3501-3510.
136. Mendes, R. E., Deshpande, L. M., Castanheira, M., DiPersio, J., Saubolle, M. A., & Jones, R. N. (2008). First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), 2244-2246.

137. Momoh, A. H., Kwaga, J. K. P., Bello, M., & Sackey, A. B. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of coagulase negative Staphylococci isolated from pigs and in-contact humans in Jos Metropolis, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 37(3), 140-147.
138. Moodley, A., Stegger, M., Bagcigil, A. F., Baptiste, K. E., Loeffler, A., Lloyd, D. H., ...& Guardabassi, L. (2006). spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1118-1123.
139. Moore, P. C. L., & Lindsay, J. A. (2001). Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2760-2767.
140. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., & Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus from milk and dairy products. *Veterinary microbiology*, 124(1), 66-72.
141. Morcillo, A., Castro, B., Rodríguez-Álvarez, C., Abreu, R., Aguirre-Jaime, A., & Arias, A. (2015). Descriptive Analysis of Antibiotic-Resistant Patterns of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) st398 Isolated from Healthy Swine. *International journal of environmental research and public health*, 12(1), 611-622.
142. Morcillo, A., Castro, B., Rodríguez-Álvarez, C., González, J. C., Sierra, A., Montesinos, M. I., R. Abreu, ...& Arias, Á. (2012). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs and pig workers in Tenerife, Spain. *Foodborne pathogens and disease*, 9(3), 207-210.
143. Morris, D. O., Rook, K. A., Shofer, F. S., & Rankin, S. C. (2006). Screening of Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius, and Staphylococcus schleiferi isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). *Veterinary dermatology*, 17(5), 332-337.
144. Mossel, D. A. A., & Netten, P. V. (1990). Staphylococcus aureus and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(S19).
145. Murray, I. A., & Shaw, W. V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(1), 1.
146. Nesin, M., Svec, P., Lupski, J. R., Godson, G. N., Kreiswirth, B., Kornblum, J., & Projan, S. J. (1990). Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, tetA (M), from a pathogenic, methicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(11), 2273-2276.
147. Noble, W. C., Virani, Z., & Cree, R. G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS microbiology letters*, 93(2), 195-198.
148. Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., & Di Giannatale, E. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. *International journal of food microbiology*, 98(1), 73-79
149. Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A., ...& Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial

- resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 290-296.
150. Notermans, S., & Heuvelman, C. J. (1983). Combined Effect of Water Activity, pH and Sub-optimal Temperature on Growth and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 48(6), 1832-1835.
 151. Novick, R. P., & Richmond, M. H. (1965). Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 90(2), 467-480.
 152. O'Sullivan, T., Friendship, R., Blackwell, T., Pearl, D., McEwen, B., Carman, S., Slavic D., & Dewey, C. (2011). Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(2), 106-111.
 153. Ogston, A. (1881). Report upon micro-organisms in surgical diseases. *British medical journal*, 1(1054), 369-b2.
 154. Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. L., Ueda, S., & Shinagawa, K. (2002). Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 857-862.
 155. O'Neill, A. J., Cove, J. H., & Chopra, I. (2001). Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 647-650.
 156. O'Neill, A. J., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, A. S., & Chopra, I. (2007). Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1737-1740.
 157. Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K. I., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa, K. (2008). Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and immunity*, 76(11), 4999-5005.
 158. Oppliger, A., Moreillon, P., Charrière, N., Giddey, M., Morisset, D., & Sakwinska, O. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. *Applied and environmental microbiology*, 78(22), 8010-8014.
 159. Pearce, R. A., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., Blair, I. S., & Harrington, D. (2004). Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 331-339.
 160. Périchon, B., & Courvalin, P. (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4580-4587.
 161. Pexara, A., Burriel, A., & Govaris, A. (2010). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in foodborne diseases. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(4), 316-322.
 162. Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A. (2012). Staphylococcal intoxication in meat and meat products. *Meat days 2012*
 163. Pfaller, M. A., & Herwaldt, L. A. (1988). Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(3), 281-299.

164. Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology*, 163(1), 34-40.
165. Potoski, B. A., Adams, J., Clarke, L., Shutt, K., Linden, P. K., Baxter, C., ... & Szabo, D. (2006). Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clinical infectious diseases*, 43(2), 165-171.
166. Pulvirenti, J. J., Kerns, E., Benson, C., Lisowski, J., Demarais, P., & Weinstein, R. A. (1996). Infective endocarditis in injection drug users: importance of human immunodeficiency virus serostatus and degree of immunosuppression. *Clinical infectious diseases*, 22(1), 40-45.
167. Quin, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. C. Donnelly, and F. C. Leonard. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*, 1st ed. Blackwell Science, Ltd., Oxford
168. Raimundo O¹, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, Garland SM. (2002) Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*;51:33-42
169. Rice, L. B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American journal of infection control*, 34(5), S11-S19.
170. Ronald A. (2002) The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American Journal of Medicine*;113 Suppl 1A:14S-19S
171. Rosenbach, A. J. F. (1884). *Mikro-organismen bei den Wund-infektionskrankheiten des Menschen*. JF Bergmann.
172. Rupp, M. E., & Archer, G. L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clinical Infectious Diseases*, 231-243.
173. Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2770-2778.
174. Schaberg, D. R., Culver, D. H., & Gaynes, R. P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *The American journal of medicine*, 91(3), S72-S75.
175. Schmitz, F. J., Krey, A., Sadurski, R., Verhoef, J., Milatovic, D., & Fluit, A. C. (2001). Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(2), 239-240.
176. Schmitz, F. J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Köhrer, K., ... & Fluit, A. C. (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 891-894.
177. Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67-75.
178. Sergelidis, D., Abraham, A., Papadopoulos, T., Soutos, N., Martziou, E., Koulourida, V., Govaris A., Pexara A, Zdragas A, & Papa, A. (2014). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. from ready-to-eat fish products. *Letters in applied microbiology*, 59(5), 500-506.
179. Shands, K. N., Schmid, G. P., Dan, B. B., Blum, D., Guidotti, R. J., Hargrett, N. T., ... & Fraser, D. W. (1980). Toxic-shock syndrome in menstruating women: as-

- sociation with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. *New England Journal of Medicine*, 303(25), 1436-1442.
180. Shen, L., Wu, H., Diep, D., Yamaguchi, S., D'Alessio, A. C., Fung, H. L., ...& Zhang, Y. (2013). Genome-wide analysis reveals TET-and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*, 153(3), 692-706.
181. Smith, C. L., & Cantor, C. R. (1987). [28] Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods in enzymology*, 155, 449-467.
182. Smith, J. L., Buchanan, R. L., & Palumbo, S. A. (1983). Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *Journal of Food Protection*, 46(6), 545-555.
183. Soldati, D., Mudry, A., & Monnier, P. (1999). Necrotizing otitis externa caused by *Staphylococcus epidermidis*. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 256(9), 439-441.
184. Spiliopoulou, I., Petinaki, E., Papandreou, P., & Dimitracopoulos, G. (2004). erm (C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 814-817.
185. Su, Yi-Cheng, and Amy C. Lee Wong. "Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins." *Journal of Food Protection* 60.2 (1997): 195-202.
186. Σπηλιοπούλου Ι., Σταφυλόκοκκοι In Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία & Εργαστηριακή Διαγνωστική, 2007, 11(2):122-131
187. Takamatsu, D., Osaki, M., Kobayashi, S., & Sekizaki, T. (2008). Role of SraP in adherence of *Staphylococcus aureus* to the bovine mammary epithelia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(7), 735-738.
188. Tatini, S. R. (1973). Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)*, 36(11), 559-563.
189. Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Stührenberg, B., Schleuter, G., Guerra, B., Hammerl, J. A., Hertwig, J. Kowall, U. Kampe, A. Schroeter. B. Appel. & Bräunig, J. (2009). Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *The Veterinary Record*, 165(20), 589-593.
190. Tirado, C., & Schmidt, K. (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43(1), 80-84.
191. Toh, S. M., Xiong, L., Arias, C. A., Villegas, M. V., Lolans, K., Quinn, J., & Mankin, A. S. (2007). Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular microbiology*, 64(6), 1506-1514.
192. Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (1988). Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of infectious diseases*, 157(4), 713-722.
193. Tranter, H. S. (1990). Foodborne staphylococcal illness. *The Lancet*, 336(8722), 1044-1046.
194. Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W., & Dowson, C. G. (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 763-770.

195. Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., & Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4352-4359.
196. Tulinski, P., Fluit, A. C., Wagenaar, J. A., Mevius, D., van de Vijver, L., & Duim, B. (2012). Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome mec elements. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 299-304.
197. Tzamalīs, A., Chalvatzis, N., Anastasopoulos, E., Tzetzis, D., & Dimitrakos, S. (2012). Acute postoperative Staphylococcus schleiferi endophthalmitis following uncomplicated cataract surgery: first report in the literature. *European journal of ophthalmology*, 23(3), 427-430.
198. Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 430-450.
199. Van Duijkeren, E., Box, A., Heck, M. E., Wannet, W. J. B., & Fluit, A. C. (2004). Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary microbiology*, 103(1), 91-97.
200. Van Duijkeren, E., Ikawaty, R., Broekhuizen-Stins, M. J., Jansen, M. D., Spalburg, E. C., De Neeling, A. J., Allaart, A. van Nes, J. A. Wagenaar & Fluit, A. C. (2008). Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms. *Veterinary microbiology*, 126(4), 383-389.
201. Van Duijkeren, E., Wolfhagen, M. J. H. M., Heck, M. E. O. C., & Wannet, W. J. B. (2005). Transmission of a Panton-Valentine leucocidin-positive, methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain between humans and a dog. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), 6209-6211.
202. Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., De Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., ... & Kluytmans, J. (2007). Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans. *Emergence*.
203. Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., & Richard, Y. (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in applied microbiology*, 39(6), 490-494.
204. Von Eiff, C., Peters, G., & Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *The Lancet infectious diseases*, 2(11), 677-685.
205. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. (2005). Methicillin resistant Staphylococcus aureus in pig farming. *Emerging Infectious Disease journal-CDC*, 11(1), 1965-1966
206. Wade, J. C., Schimpff, S. C., Newman, K. A., & Wiernik, P. H. (1982). Staphylococcus epidermidis: an increasing cause of infection in patients with granulocytopenia. *Annals of Internal Medicine*, 97(4), 503-508.
207. Waldvogel, F A. (1990). *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In : principles and practice of infectious disease. Mandell, G L, Douglas R G Jr. and Benneth, J E. (eds). 3rdedn. Churchill Livingstone, New York. pp 1489– 1510.
208. Walsh, T. R., & Howe, R. A. (2002). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 657-675.
209. Warsa, U. C., Nonoyama, M., Ida, T., Okamoto, R., OKUBO, T., Shimauchi, C., Shimauchi C., Kouga A., Inoue, M. (1996). Detection of tet (K) and tet (M) in

- Staphylococcus aureus of Asian countries by the polymerase chain reaction. *The Journal of antibiotics*, 49(11), 1127-1132.
210. Waters, A. E., Contente-Cuomo, T., Buchhagen, J., Liu, C. M., Watson, L., Pearce, K., ...& Keim, P. S. (2011). Multidrug-resistant Staphylococcus aureus in US meat and poultry. *Clinical Infectious Diseases*, 52(10), 1227-1230.
 211. Weese, J. S., & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 140(3), 418-429.
 212. Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 439-445.
 213. Weinstein RA, Kabins SA, Nathan C, Sweeney HM, Jaffe HW, Cohen S. (1982) Gentamicin-resistant staphylococci as hospital flora: epidemiology and resistance plasmids. *The Journal of Infectious Diseases*.;145(3):374-82
 214. White, D. G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., ...& Meng, J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant Salmonella from retail ground meats. *New England journal of medicine*, 345(16), 1147-1154.
 215. Witte, W., Hummel, R., Meyer, W., Exner, H., & Wundrak, R. (1977). Ecology of Staphylococcus aureus: characterization of strains from chicken. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 17(8), 639-646.
 216. Wu, S., Piscitelli, C., De Lencastre, H., & Tomasz, A. (1996). Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of mecA from a methicillin susceptible strain of Staphylococcus sciuri. *Microbial Drug Resistance*, 2(4), 435-441.
 217. Xiong, L., Kloss, P., Douthwaite, S., Andersen, N. M., Swaney, S., Shinabarger, D. L., & Mankin, A. S. (2000). Oxazolidinone Resistance Mutations in 23S rRNA of Escherichia coli Reveal the Central Region of Domain V as the Primary Site of Drug Action. *Journal of bacteriology*, 182(19), 5325-5331.
 218. Χαλεβελάκης ΓΕ, Λεγάκης ΝΙ, Περόγαμβρος ΤΗ. Αντιβιοτικά και συνήθειες λοιμώξεως. 1994 2^η έκδοση
 219. Ye, X., Fan, Y., Wang, X., Liu, W., Yu, H., Zhou, J., ...& Yao, Z. (2016). Live-stock-associated methicillin and multidrug resistant S. aureus in humans is associated with occupational pig contact, not pet contact. *Scientific reports*, 6.
 220. Yu, S. L., Bolton, D., Laubach, C., Kline, P., Oser, A., & Palumbo, S. A. (1999). Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1478-1481.
 221. Zhang, C., Song, L., Chen, H., Liu, Y., Qin, Y., & Ning, Y. (2012). Antimicrobial susceptibility and molecular subtypes of Staphylococcus aureus isolated from pig tonsils and cow's milk in China. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(4), 268-274.
 222. Zhang, Y., Agidi, S., & LeJeune, J. T. (2009). Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1375-1383.