



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν τοξίνες σε στελέχη σταφυλόκοκκων
που απομονώθηκαν από γάλα και αρμεκτικές μηχανές»**

Τρικαλινού Κωνσταντίνα

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
- Φθενάκης Γεώργιος, Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της αναπαραγωγής των ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος 2020



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**

FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**« Detection of genes encoding toxins in staphylococcal strains isolated from
milk and milking machines »**

Trikalinou Constantina

Biochemist- Biotechnologist

Three-membered examination committee:

- Petinaki Efthimia, Professor of Medical Biopathology - Clinical Microbiology, Department of Medicine, University of Thessaly, Supervisor
- Fthenakis Georgios, Professor of Physiopathology of Animal Reproduction, Department of Veterinary Medicine, University of Thessaly
- Speletas Mattheos, Professor of Medical Immunology, Department of Medicine, University of Thessaly

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, October 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	13
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	15
1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ.....	16
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	16
1.3.2 Γονιδίωμα.....	18
1.3.3 Ένζυμα και πρωτεΐνες	19
1.3.4 Τοξίνες.....	20
1.3.5 Σχηματισμός βιομεμβράνης	27
1.5 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ ΣΕ ΖΩΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ.....	28
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	35
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
I. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	37
3.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	37
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	38
3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ.....	38
3.3.1 Χρώση κατά Gram	38
3.3.2 Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης.....	40
3.3.3 Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης.....	41
3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕ ΤΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ BD Phoenix™	42
II. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
Η ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες (τοξίνες) έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τυποποίηση των στελεχών έγινε βάσει της μεθόδου MLST στην περίπτωση του <i>S. aureus</i>	43
3.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA extraction).....	43
3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	44
3.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΤΟΞΙΝΕΣ	49
3.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	51
3.8.1 Γονίδια της μεθόδου MLST για τον <i>S. aureus</i> , ένζυμα και αντιδράσεις.....	52
3.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR	55
2.10 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	57

3.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ MLST (Sequencing).....	58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ	60
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΩΝ, ΕΠΙΔΕΡΜΟΛΥΤΙΚΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ, ΛΕΥΚΟΚΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΞΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΛΗΞΙΑΣ.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram-θετικά βακτήρια με περισσότερα από 50 είδη και σημαντικότερο βακτήριο τον *S. aureus*. Αποτελούν αποικιστές του δέρματος των ζώων και των ανθρώπων και είναι υπεύθυνοι για ένα πλήθος λοιμώξεων. Έχουν διαφορετικών ειδών πρωτεΐνες επιφανείας και παράγουν μεγάλο εύρος λοιμογόνων παραγόντων. Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι εντεροτοξίνες (SEs), η λευκοκτονίνη (PVL), οι επιδερμολυτικές ή αποφολιδωτικές τοξίνες (ETs) και η τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1). Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση των γονιδίων των τοξινών των σταφυλόκοκκων από γάλα προβάτων και αρμεκτικές μηχανές.

Συνολικά μελετήθηκαν 213 μικροοργανισμοί, από τους οποίους οι 122 ήταν σταφυλόκοκκοι. Η ταυτοποίηση των ειδών έδειξε ότι 15 ήταν στελέχη *S. aureus* και 107 CoNS. Ακολούθησε ανίχνευση των γονιδίων *pvl*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel*, *seq*, *ser*, *sep*, *ses*, *set*, *seo*, *sem*, *sei*, *seu*, *sen*, *seg*, *eta*, *etb* και τυποποίηση των στελεχών *S. aureus* με την μέθοδο MLST. Τοξίνες ανιχνεύθηκαν σε 32 σταφυλόκοκκους, εκ των οποίων 16 προήλθαν από γάλα και 16 από αρμεκτικές μηχανές και συγκεκριμένα σε 14 στελέχη *S. aureus*, 18 στελέχη CoNS (*S.xylosum*, *S.sciuri*, *S.capitis*, *S.equorum*, *S.hominis*, *S.caprae*, *S.chromogenes*, *S.gallinarum*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*). Σχεδόν σε όλα τα στελέχη ανιχνεύθηκαν εντεροτοξίνες (31/32), ενώ η ETA ανιχνεύθηκε σε 2 στελέχη και η TSST-1 σε ένα στέλεχος. Κανένα στέλεχος δεν έφερε το γονίδιο PVL. Η MLST έδειξε ότι ο επικρατέστερος ήταν ο κλώνος ST133 (7/14) και ακολούθησαν οι κλώνοι ST5 (3/14), ST47 (2/14), ST522 (1/14) και CC1 (1/14).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία αποδεικνύουν ότι οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζουν πλήθος λοιμογόνων παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να μεταφέρονται σε τρόφιμα ή προϊόντα τροφίμων. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων σε ζώα και σε ανθρώπους, κάνοντας αναγκαία την μελέτη των εν λόγω στελεχών με στόχο την αποφυγή τέτοιων καταστάσεων.

ABSTRACT

Staphylococci are Gram-positive cocci with more than 50 species and the most important representative is *S. aureus*. They are part of the normal animal and human flora and but they are also responsible for a number of infections. They have different types of surface proteins and produce a wide range of infectious agents. Particularly, important are enterotoxins (SEs), leukocidin (PVL), epidermolytic or exfoliative toxins (ETs) and toxic shock syndrome toxin (TSST-1). The aim of the present study was to detect the genes of staphylococcal toxins isolated from ewes milk and milking machines.

A total of 213 microorganisms were studied, of which 122 were staphylococci. Identification showed that 15 were *S. aureus* and 107 CoNS. Detection of *pvl*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel*, *seq*, *ser*, *sep*, *ses*, *set*, *seo*, *sem*, *sei*, *seu*, *sen*, *seg*, *eta*, *etb* was performed. Molecular typing of was also performed in toxin-positive strains of *S.aureus*. Toxins were detected in 32 staphylococcal strains, of which 16 derived from milk and the rest of them from milking machines. Particularly toxins detected in 14 strains of *S.aureus* and 18 CoNS (*S.xylosum*, *S.sciuri*, *S.capitis*, *S.equorum*, *S.hominis*, *S.caprae*, *S.chromogenes*, *S.gallinarum*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*). Almost all strains were carried genes encoding for Enterotoxins (31/32), while ETA was detected in 2 strains and TSST-1 in one strain. No strains carried the PVL gene. MLST showed that the predominant clone was ST133 (7/14), followed by clones ST5 (3/14), ST47 (2/14), ST522 (1/14) and CC1 (1/14).

In conclusion, the results demonstrate that staphylococci have a number of infectious agents that can be transmitted to food or food products. This can lead to pathological conditions in animals and humans, making it necessary to study these strains in order to avoid such conditions.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

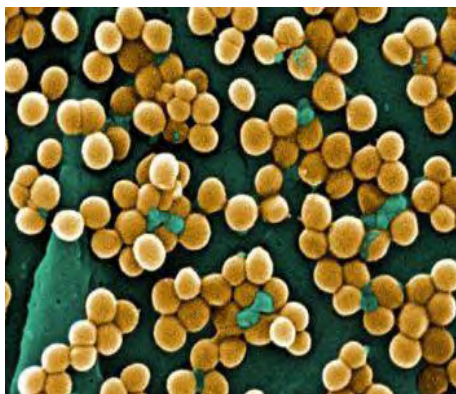
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

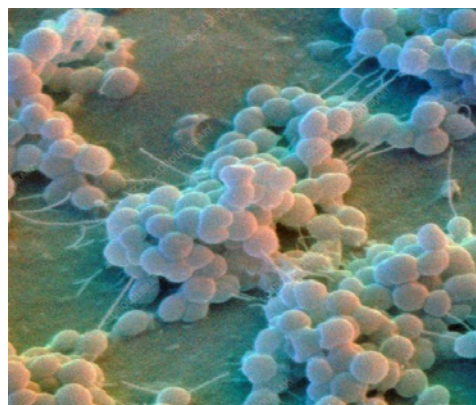
Ιστορικά, τα είδη των βακτηρίων που ανήκουν στα συγγενικά είδη *Staphylococcus* και *Micrococcus* θεωρήθηκε ότι ανήκουν στα γένη *Stomatococcus* και *Planococcus* ως μέρος της οικογένειας Micrococcaceae. Αργότερα, η μοριακή ανάλυση σε συνδυασμό με τη φυλογενετική και χημειοταξινομική πληροφορία αποκάλυψαν ότι οι *Staphylococci* και οι *Micrococci* δεν είναι στενά συνδεδεμένοι. Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην ομάδα του *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, το οποίο περιλαμβάνει Gram-θετικά βακτήρια με χαμηλή περιεκτικότητα σε G/C του χρωμοσωμικού DNA. Το 2004 έγινε διαφορετική ταξινόμηση του γένους *Staphylococcus* σε μια νέα οικογένεια που ονομάστηκε Staphylococcaceae, μαζί με τα γένη *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* and *Gemella*. Η οικογένεια των Staphylococcaceae μαζί με τις Bacillaceae, Planococcaceae, Listeriaceae και άλλες οικογένειες είναι μέρη της τάξης των Bacillales. (1)

Μία από τις πρώτες αναφορές στα διαφορετικά είδη βακτηρίων που ονομάζονταν «*Micrococcus*» έγινε από τον Ogston το 1881, ο οποίος ονόμασε το σύμπλεγμα των μικρόκοκκων «σταφυλόκοκκους» από τις ελληνικές λέξεις «σταφύλι» και «κόκκος». (2) Λίγα χρόνια αργότερα, το 1884, ο Γερμανός χειρουργός Anton J. Rosenbach απομόνωσε δύο στελέχη σταφυλόκοκκων, τα οποία ονόμασε σύμφωνα με την εμφάνιση των αποικιών: *Staphylococcus aureus* από τη λατινική λέξη «*aurum*» που σημαίνει χρυσός και *Staphylococcus albus* (τόρα ονομάζεται *Staphylococcus epidermidis*), από τη λατινική λέξη «*albus*» που σημαίνει λευκός. (3) Τις πρώτες δεκαετίες διερεύνησης των βακτηρίων αυτών, η ταξινόμηση του γένους *Staphylococcus* βασίστηκε στη μορφοποίηση των αποικιών, παρόλο που αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε τελικά αναξιόπιστη με τον εν λόγω διαχωρισμό να οδηγήσει σε ερωτήματα σχετικά με την παθογένεια αυτών των δύο σταφυλόκοκκων. (4)

Εκτός όμως από το χρώμα των αποικιών, τα δύο αυτά είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους από την ικανότητα ή μη των στελεχών να προκαλούν πήξη του πλάσματος καθώς βρέθηκε ότι ο *S. aureus* προκαλεί πήξη του πλάσματος μέσα σε μερικές ώρες, ενώ ο *S. albus* δεν είχε αυτή την ικανότητα. Συνεπώς, γύρω στο 1930 αρχίζει να εφαρμόζεται η μέθοδος της πηκτάσης (ή αλλιώς κοαγκουλάσης) μία μέθοδος που βασίζεται στην αντίχνευση του ενζύμου της κοαγκουλάσης. Η δοκιμασία αυτή βοήθησε τους επιστήμονες να διακρίνουν τον *S.aureus* ως κοαγκουλάση-θετικός σταφυλόκοκκος (*coagulase-positive staphylococci (CoPS)*) από άλλους σταφυλόκοκκους, οι οποίοι είναι κοαγκουλάση-αρνητικοί (*coagulase-negative staphylococci (CoNS)*).

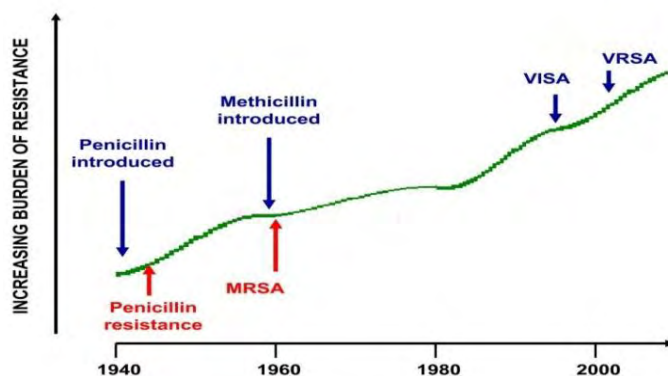


Εικόνα 1: Αποικίες *S. aureus*



Εικόνα 2: Αποικίες *S. epidermidis*

Όσον αφορά τη θεραπεία, το 1941 ο ρυθμός θνησιμότητας της βακτηριαμίας από τον *S. aureus* ολοένα και αυξάνονταν, φτάνοντας σε ποσοστό 81%. Αξιοσημείωτο είναι ότι εκείνη την χρονιά ένας από τους ασθενείς που νοσεί, θεραπεύεται από την πενικιλίνη με αποτέλεσμα την εισαγωγή της πενικιλίνης στην κλινική πράξη. Παρόλα αυτά, λόγω της κακής χρήσης και της κατάχρησης του εν λόγω αντιβιοτικού μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '40, εμφανίζονται όλο και περισσότεροι σταφυλόκοκκοι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1959, όταν η πενικιλίνη δε μπορούσε πλέον να θεραπεύσει σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις, ένα νέο φάρμακο, η μεθικιλίνη, αρχίζει να εμφανίζεται. Πολύ γρήγορα όμως, το 1961, προκύπτουν σταφυλόκοκκοι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη, γνωστοί ως MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), στελέχη τα οποία μέσα στην επόμενη δεκαετία αρχίζουν να εξαπλώνονται σε Ευρώπη, Αυστραλία και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. (5) Μία από τις τελευταίες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων αποτελούσε η βανκομυκίνη. Ωστόσο, το 2002 οι γιατροί άρχισαν να καταγράφουν τα πρώτα στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στην βανκομυκίνη προβληματίζοντας την επιστημονική κοινότητα. Αν και υπήρχε ο φόβος ότι τα στελέχη *S. aureus* θα εμφάνιζαν γρήγορα ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, τα βανκομυκίνη-ανθεκτικά στελέχη, γνωστά ως VRSA (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) είναι σπάνια μέχρι στιγμής.



Εικόνα 3: Ανθεκτικότητα του *S. aureus* σε αντιβιοτικά κατά το πέρασμα των χρόνων. MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. VISA: Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. VRSA: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Παρόλο που ο *S. aureus* είναι το κύριο βακτήριο αυτού του γένους, περισσότερα από 50 είδη σταφυλόκοκκων έχουν καταγραφεί στη List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature database, η οποία είναι διαθέσιμη στη διεύθυνση <http://www.bacterio.net>. (6), (7), (8)

ΕΙΔΟΣ	ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Schleifer et al.	1985
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach	1884
<i>Staphylococcus auricularis</i>	Kloos and Schleifer	1983
<i>Staphylococcus capitis</i>	Kloos and Schleifer	1975
<i>Staphylococcus caprae</i>	Devriese et al.	1983
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Schleifer and Fischer	1982
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Schleifer et al.	1982
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Hájek et al.	1987
<i>Staphylococcus delphini</i>	Varaldo et al.	1988
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Schleifer and Kloos	1975
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Evans	1916
<i>Staphylococcus equorum</i>	Schleifer et al.	1985
<i>Staphylococcus felis</i>	Igimi et al.	1989
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	Vernozy-Rozand et al.	2000
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Devriese et al.	1983
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Schleifer and Kloos	1975
<i>Staphylococcus hominis</i>	Kloos and Schleifer	1975
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Hájek	1976

<i>Staphylococcus lentus</i>	Schleifer et al.	1983
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Freney et al.	1988
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Chesneau et al.	1993
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	Trülzsch et al.	2007
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	Kilpper-Bälz and Schleifer	1984
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Shaw et al.	1951
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Freney et al.	1988
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Kloos et al.	1976
<i>Staphylococcus simulans</i>	Kloos and Schleifer	1975
<i>Staphylococcus vitulus</i>	Webster et al.	1994
<i>Staphylococcus warneri</i>	Kloos and Schleifer	1975
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Schleifer and Kloos	1975

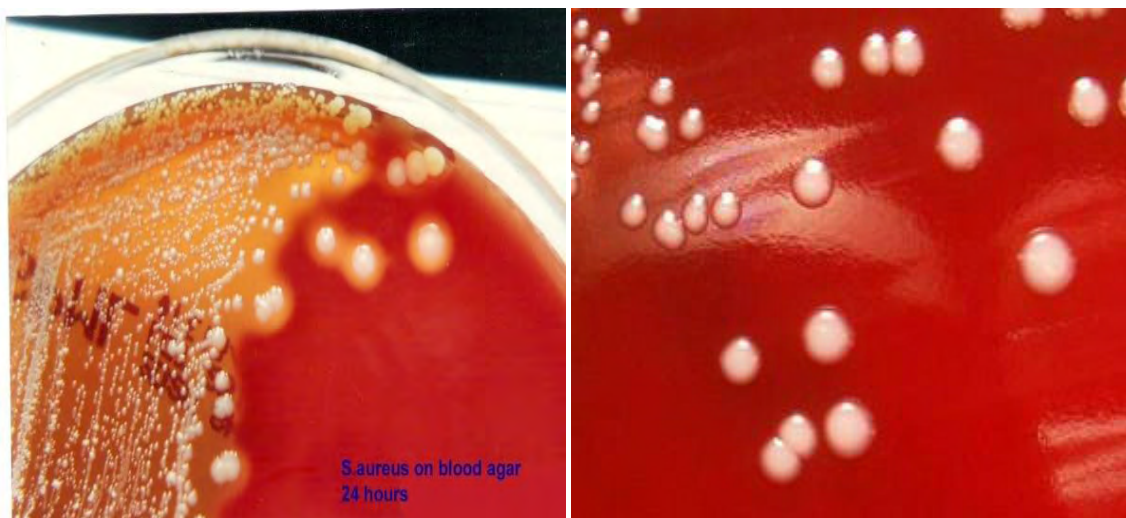
Ωστόσο, η αλληλούχιση του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα ή σε γονίδια οικονομίας (housekeeping) , οι φυλογενετικές αναλύσεις, ο υβριδισμός DNA–DNA, το προφίλ πρωτεϊνών και οι γονοτυπικές τεχνικές έχουν οδηγήσει σε ανακατάταξη ή δημιουργία νέων ειδών και υποειδών. (9) (10) (11) Καθώς αυτές οι τεχνικές εξελίσσονται, νέοι σταφυλόκοκκοι ανακαλύπτονται, κυρίως σε διαφορετικά ζώα, όπως ο *S. nepalensis* που απομονώθηκε από τις κατσίκες, ο *S. stercorarius* από μικρά άγρια ζώα, ο *S. pseudintermedius*, ο οποίος απομονώθηκε από αρκετά κατοικίδια ζώα, όπως σκύλοι, γάτες, άλογα και παπαγάλοι και ο *S. agnetis* από βοοειδή με υποκλινική και κλινική μαστίτιδα. (12) (13) (14) (15) (16)

1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί κόκκοι με διάμετρο 0,5-1mm χωρίς κίνηση, μη σποριογόνιοι, μεμονωμένοι ή σε ζευγάρια. (17) Οι αποικίες μπορεί να είναι αδιαφανείς, άσπρες ή μπεζ και λιγότερο συχνά κίτρινες και πορτοκαλί. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 30°-37°C. Έχουν κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκά οξέα. Είναι ικανοί να αναπτυχθούν παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλατιού (10% NaCl) η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των σταφυλόκοκκων και όχι άλλων οργανισμών (με εξαίρεση τους εντερόκοκκους). Το ποσοστό G/C στο χρωμοσωμικό DNA των σταφυλόκοκκων είναι κατά προσέγγιση 33–40%. (18)

Τα περισσότερα είδη είναι προαιρετικά αναερόβια. Εξαιρέση αποτελούν οι *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. equorum*, *S. vitulinus* και *S. lentus*, οι οποίοι αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό σε αναερόβιες συνθήκες και συνήθως χρειάζονται 24-36 h για να γίνουν διακριτές οι αποικίες τους. Μπορούν να αναπτυχθούν σε τρυβλία με άγαρ, αιματούχα και σοκολατόχρωμα. Στα αιματούχα τρυβλία μπορεί να παρατηρηθεί αιμόλυση των κυττάρων. (19) Για παράδειγμα, ο *S. aureus* είναι αιμολυτικός, σε αντίθεση με τον *S. epidermidis* που δεν κάνει αιμόλυση, με αποτέλεσμα να υπάρχει μία αρχική διάκριση στο αιματούχο τρυβλίο. (20)



Εικόνα 4: Αριστερά: Αιμόλυση κυττάρων *S. aureus* σε αιματούχο τρυβλίο. Δεξιά: Τα κύτταρα του *S. epidermidis* δεν παρουσιάζουν αιμόλυση σε αιματούχο τρυβλίο

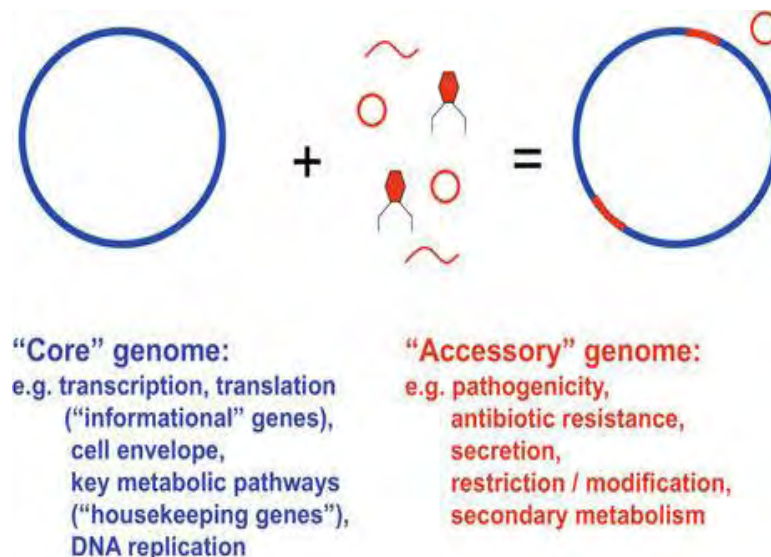
Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί στην παρουσία του ενζύμου της καταλάσης, η οποία χρησιμοποιείται ως δοκιμασία για το διαχωρισμό τους από τους υπόλοιπους Gram θετικούς κόκκους (στρεπτόκοκκοι, εντερόκοκκοι) και αρνητικοί στην οξειδάση με εξαίρεση *S. sciuri* group (*S. sciuri*, *S. lentus* and *S. vitulinus*), *S. fleuretti* και *Macrococcus* group, το οποίο περιλαμβάνει τον *S. caseolyticus*. Οι CoPS αντιπροσωπεύουν τα κύρια είδη παθογένειας του γένους αυτού και έχουν την κοαγκουλάση, ένα ένζυμο ικανό να προκαλεί πήξη του αίματος μετρατέποντας το ινωδογόνο σε ινώδες. Από την άλλη, οι CoNS που υστερούν του ενζύμου της κοαγκουλάσης επίσης μπορούν να προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις στους ξενιστές τους αν και είναι λιγότερο παθογόνοι. (18)

1.3.2 Γονιδίωμα

Ένα τυπικό γονιδίωμα σταφυλόκοκκου αποτελείται από ένα κυκλικό DNA ανάμεσα σε 2,5-3 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, το οποίο περιλαμβάνει και πλασμίδια. Αυτό δικαιολογεί τα 2500-3000 περίπου ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ή τις κωδικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών (CDSs), καθώς και tRNAs, rRNAs, μη κωδικά RNAs και ψευδογονίδια. Το 2001 αλληλουχήθηκε το πρώτο σταφυλοκοκκικό γονιδίωμα και άνηκε στο παθογονικό είδος *S. aureus*. Μέχρι στιγμής έχουν καταχωρηθεί 50000 λίστες ολόκληρων γονιδιωμάτων στη βάση δεδομένων Genbank, από τα οποία περιλαμβάνουν τουλάχιστον 31 διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκων. (21) Το γονιδίωμα των σταφυλόκοκκων αποτελείται από δύο βασικά μέρη: το βασικό (core genome) και το βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome).

Το **βασικό γονιδίωμα (core genome)** είναι καλά συντηρημένο ανάμεσα στα είδη. Κωδικοποιεί γονίδια τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα και κωδικοποιούν απαραίτητες για το βακτήριο μεταβολικές και ρυθμιστικές λειτουργίες, όπως γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό και την αντιγραφή και δομικά και ρυθμιστικά γονίδια. (22) Το βασικό γονιδίωμα του *S. epidermidis* έχει καταγραφεί ότι είναι σε ποσοστό 80%, ενώ αυτό του *S. aureus* είναι πολύ μικρότερο, δηλαδή 55-70%.

Το **βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome)** περιλαμβάνει τα μεταθετά γενετικά στοιχεία (MGEs), δηλαδή γονίδια που υπάρχουν σε ένα υποσύνολο στελεχών και κωδικοποιούν για μη απαραίτητα γονίδια παρέχοντας το πλεονέκτημα της επιλογής στον ξενιστή σε μια συγκεκριμένη περιβαλλοντική θέση. (23) Τα MGEs αποτελούν χωριστά κομμάτια DNA που επαναλαμβάνονται από μόνα τους ή ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα του ξενιστή και περιλαμβάνουν βακτηριοφάγους, νησίδες παθογονικότητας, πλασμίδια, τρανσποζόνια και τις σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες *mec* (SCC*mec*). Δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση τους, αλλά είναι σημαντικά καθώς κωδικοποιούν για μηχανισμούς που εξασφαλίζουν τη μεταφορά τους ανάμεσα στα βακτηριακά κύτταρα, λοιμογόνους παράγοντες, καθώς και μόρια που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά, γεγονός που έχει επίδραση στην εξάπλωση των σταφυλόκοκκων. (24) Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο του βοηθητικού γονιδιώματος που αναφέρθηκε προηγουμένως είναι η σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (SCC*mec*), η οποία παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεια των σταφυλόκοκκων. Τα μέλη της οικογένειας SCC*mec* διαφέρουν στο μήκος, τη δομή και το περιεχόμενο. Ωστόσο, κάθε SCC*mec* μοιράζεται μια εισαγωγή ενός γενωμικού κομματιού που σχετίζεται με κανονικές και ανεστραμμένες επαναλήψεις. Σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί SCC*mec* στον *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* και *S. aureus*, ο χαρακτηρισμός ή η γονοτύπηση των οποίων αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος σε παγκόσμιες μελέτες πληθυσμού. (25)



Εικόνα 5: Βασικό και βοηθητικό γονιδίωμα στους σταφυλόκοκκους

1.3.3 Ένζυμα και πρωτεΐνες

Οι σταφυλόκοκκοι έχουν διαφορετικών ειδών πρωτεΐνες επιφανείας που βασίζονται στη διαφορετική δομή και λειτουργία τους. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και ποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα για την επιβίωσή τους ως αποικιστές ή παθογόνα. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών επιφανείας περιλαμβάνουν κυτταρική προσκόλληση, εισβολή και αποικισμό στους ιστούς του ξενιστή και παραγωγή βιομεμβράνης που βοηθά την προσκόλλησή τους σε ιατρικές συσκευές, όπως προσθετικές βαλβίδες, κεντρικοί και περιφερειακοί καθετήρες και βηματοδότες, αποφεύγοντας την ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Οι CoNS παράγουν, επίσης, πρωτεάσες, λιπάσες και άλλα ένζυμα που τους δίνουν τη δυνατότητα να ευδοκιμούν στους ιστούς του ξενιστή. (26)

Μια ομάδα αυτών των πρωτεϊνών είναι τα **επιφανειακά μικροβιακά συστατικά που αναγνωρίζουν τα προσκολλητικά μόρια του υποστρώματος** (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, **MSCRAMMs**). Η οικογένεια των MSCRAMMs μοιράζεται μια κοινή μοριακή δομή που αποτελείται από έναν εξωτερικό παράγοντα (πεπτιδίο-σήμα) στο N τελικό άκρο, το οποίο ακολουθείται από έναν παράγοντα-περιοχή αναγνώρισης του ξενιστή και μία ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες περιοχές. Τα MSCRAMMs δεσμεύουν μόρια διαδραματίζοντας έναν βασικό ρόλο στην έναρξη λοιμώξεων. (27)

Μια από τις πρωτεΐνες που έχει βρεθεί μόνο στον *S. aureus* είναι η **πρωτεΐνη A**, η οποία αποτελεί μία δομή του κυτταρικού τοιχώματος της πεπτιδογλυκάνης. Πρόκειται για μια

δεσμευτική πρωτεΐνη που συνδέεται στην Fc περιοχή του αντισώματος IgG και έχει ρόλο την αναστολή της φαγοκυττάρωσης αποτρέποντας την εξάλειψη μέσω των αντισωμάτων. (28) Ειδικότερα, αποτρέπει την αναγνώριση του βακτηρίου από τα ουδετερόφιλα και ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος πυροδοτώντας την παραγωγή της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) και τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων προωθώντας τη φλεγμονή και τη βλάβη των ιστών. (29)

Η **κοαγκουλάση** ή αλλιώς πηκτάση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στον *S. aureus* και προκαλεί πήξη του πλάσματος μετατρέποντας το ινωδογόνο σε ινώδες. Ο *S. aureus* παράγει δύο είδη κοαγκουλάσης: την ελεύθερη και τη δεσμευμένη. Η δεσμευμένη κοαγκουλάση (clumping factor) είναι ενσωματωμένη στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και αντιδρά άμεσα με το ινωδογόνο. Αυτό οδηγεί στην αλλαγή της σύστασης του ινωδογόνου, με αποτέλεσμα να προκαλεί πήξη των κυττάρων όταν ένα βακτηριακό εναιώρημα αναμιγνύεται με το πλάσμα. Η ελεύθερη κοαγκουλάση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του παράγοντα CRP (coagulase reacting factor), το οποίο είναι τροποποιημένο ή παράγωγο μόριο της θρομβίνης σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα που έχει την ικανότητα να μετατρέψει το ινωδογόνο σε ινώδες. (30)

Εκτός από τα παραπάνω, οι σταφυλόκοκκοι παράγουν και μια ποικιλία ενζύμων τα οποία συμβάλλουν στην παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλούν αλλά δεν παρουσιάζουν τοξική ή κυτταρολυτική δράση. Ένα από τα ένζυμα αυτά είναι η θερμοανθεκτική **νουκλεάση**, η οποία υδρολύει το κολλώδες DNA και αποτελεί βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό του *S. aureus*, καθώς έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή πηκτάσης για την ταυτοποίηση του. Άλλα ένζυμα που περιλαμβάνουν είναι η υαλουρονιδάση, η ινωδολυσίνη, και οι λιπάσες. Τα ένζυμα αυτά βοηθούν επίσης στην επέκταση των βακτηρίων και συγκεκριμένα η **υαλουρονιδάση** αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει τα υαλουρονικά οξέα που βρίσκονται στους συνδετικούς ιστούς προάγοντας έτσι την εξάπλωση των σταφυλόκοκκων, η **ινωδολυσίνη** (ή αλλιώς σταφυλοκινάση) μπορεί να διαλύει τους θρόμβους ινικής και τέλος, διάφορες **λιπάσες** υδρολύουν τα λιπίδια εξασφαλίζοντας την επιβίωση των σταφυλόκοκκων στις σημηματογόνες περιοχές του σώματος.

1.3.4 Τοξίνες

Εκτός από τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τα συμπτώματα και τη σοβαρότητα των λοιμώξεων που προκαλούνται από τους σταφυλόκοκκους. (31) Πρόκειται για τις τοξίνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τους σταφυλόκοκκους στην εξωκυτταρική στοιβάδα κατά τη διάρκεια των

φάσεων της μετα-εκθετικής και στο αρχικό στάδιο της φάσης στασιμότητας. Αυτές οι πρωτεΐνες συνήθως συμμετέχουν στη διείσδυση στους ιστούς και καθιστούν ικανά τα βακτήρια να εισβάλουν στον ξενιστή. Επίσης, είναι κυτταρολυτικές και βοηθούν την ανάπτυξη των βακτηρίων με το να αποκτούν τα απαραίτητα συστατικά, όπως για παράδειγμα σίδηρος από λυμένα κύτταρα. (32)

Ειδικότερα, οι τοξίνες που παράγονται από τους σταφυλόκοκκους είναι οι εξής: οι **αιμολυσίνες** α, β, γ, δ, οι **εντεροτοξίνες** (Staphylococcal Enterotoxins, SEs), η **λευκοκτονίνη** (Panton-Valentine Leukocidin, PVL), οι **επιδερμολυτικές ή αποφολιδωτικές τοξίνες** (Exfoliative Toxins, ETs) και η **τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας** (Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1). Κύριος εκπρόσωπος της οικογένειας των σταφυλόκοκκων που παράγει τις εν λόγω τοξίνες είναι ο *S.aureus*. Ωστόσο, κάποιες μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτές οι τοξίνες ανιχνεύονται και στους CoNS. (33)

Στις αιμολυσίνες ανήκουν η άλφα, βήτα, γάμα και δέλτα τοξίνη. Η ανακάλυψη της **άλφα αιμολυσίνης** έγινε σε μια πόλη της Αυστραλίας το 1928 όπου βρέθηκε ότι ένα στέλεχος *S.aureus* προκαλούσε αιμόλυση με αποτέλεσμα 12 παιδιά να καταλήξουν. (34) Είναι μια επταμερής τοξίνη και το γονίδιο που την κωδικοποιεί τοποθετείται στο βακτηριακό χρωμόσωμα αποτελώντας μία από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες τοξίνες. Έχει βρεθεί να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις λοιμώξεις από τον *S. aureus* συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας, των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών ιστών, τη σήψη και σηπτική αρθρίτιδα, τα απόστημα εγκεφάλου και τις μολύνσεις του κερατοειδούς. (35) Η ανακάλυψη της **βήτα αιμολυσίνης** έγινε το 1935 από τους Glenny και Stevens και προήλθε κατά τη διάρκεια μιας έρευνας για δύο παρασκευές της άλφα αιμολυσίνης, καθώς παρατήρησαν ότι κατά τη διάρκεια επώασης δειγμάτων αυτής της τοξίνης παρουσία ευαίσθητων ερυθροκυττάρων στους 37°C ακολουθούμενη από ψύξη στους 4°C, προκλήθηκε κλιμάκωση της αιμόλυσης. (34) Η βήτα αιμολυσίνη δε σχηματίζει πόρους στην κυτταρική μεμβράνη του πλάσματος, αλλά αποτελεί μία εξαρτώμενη από μαγνήσιο-σφιγγομυελινάση που υδρολύει τη σφιγγομυελίνη, η οποία είναι ένα λιπίδιο της μεμβράνης του πλάσματος, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει και στο σχηματισμό της βιομεμβράνης, μία δραστηριότητα ανεξάρτητη της δράσης της σφιγγομυελινάσης. (36) Επιπρόσθετα, η τοξίνη αυτή έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην χρόνια οστεομυελίτιδα, αλλά και σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. (35) Η **γάμα αιμολυσίνη** περιγράφηκε από τους Smith και Price το 1938, καθώς βρέθηκε ότι ήταν περισσότερο ευαίσθητη στη θερμότητα από τις άλφα και βήτα, εφόσον καταστρεφόταν ολοκληρωτικά όταν βρισκόταν για 30 λεπτά στους 55°C. (34) Η γάμα αιμολυσίνη εμπλέκει δύο πολυπεπτίδια για το σχηματισμό πόρων που έχει ως αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου. (36) Επίσης, έχει βρεθεί ότι συνδέεται με λοιμώξεις στο

αίμα, όπως η βακτηριαμία και η σηπτική αρθρίτιδα, ενώ παράλληλα παίζει ρόλο και στην παθογένεια του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας. (35) Μερικά χρόνια αργότερα, το 1947, οι Williams και Harper ανίχνευσαν για πρώτη φορά τη δραστηριότητα της **δέλτα αιμολυσίνης** σε τρυβλία άγαρ που περιείχαν αίμα προβάτου. Πρόκειται για μια τοξίνη που παράγεται σχεδόν σε όλα τα στελέχη του *S. aureus* (97%) καθώς και σε κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους. Η αιμολυσίνη αυτή έχει την ικανότητα να λύει πολλούς κυτταρικούς τύπους και έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ασθενειών του δέρματος. (37) Η συγκεκριμένη αιμολυσίνη έχει τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς που εξηγούν την αιμολυτική δράση της, καθώς μπορεί α) να προσδεθεί στην κυτταρική επιφάνεια και να σχηματίσει διαμεμβρανικούς πόρους, β) να προσδεθεί στην επιφάνεια και να επηρεάσει την καμπυλότητα της μεμβράνης αποσταθεροποιώντας τη μεμβράνη του πλάσματος, γ) σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει την ικανότητα να διαλυτοποιεί τη μεμβράνη. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι κάποιες από τις προαναφερθέντες αιμολυσίνες, εκτός από την παρουσία τους στους σταφυλόκοκκους έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη, όπως για παράδειγμα *E.coli*, *L.monocytogenes* και άλλα. (36)

Η **λευκοκτονίνη P-V** (Panton-Valentine leukocidin, PVL) είναι μια εξωκυττάρια κυτταροτοξίνη, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Van de Velde το 1894. (37) Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PVL αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα νεκρωτικών ασθενειών. Είναι τοξίνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες, ο πολυμερισμός των οποίων οδηγεί στον σχηματισμό πόρου στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κατιόντων, με αποτέλεσμα τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης. (38) Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι εν λόγω υπομονάδες έχουν τοξική δράση μόνο ως διμερή, καθώς μεμονωμένες είναι ανενεργείς. Παρόλο που η συγκεκριμένη τοξίνη παράγεται σε ποσοστό μικρότερο από 50% από τον *S. aureus*, η PVL ανιχνεύεται σε μεγάλα ποσοστά σε στελέχη τα οποία μπορούν να προκαλέσουν δερματικά αποστήματα, νεκρωτικές δερματικές λοιμώξεις και νεκρωτική πνευμονία. (39) Οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλεί ο *S. aureus* και σχετίζονται με την PVL αφορούν κυρίως τα στελέχη MRSA που βρίσκονται στην κοινότητα. (40)

Οι **επιδερμολυτικές τοξίνες (ETs)** είναι πρωτεάσες σερίνης που αναγνωρίζουν και υδρολύουν πρωτεΐνες στο δέρμα. Έχουν χαρακτηριστεί ως εξωτοξίνες στην επιδερμίδα του ξενιστή και έχουν σχετισθεί με την απολέπιση του δέρματος και το σχηματισμό κυψελών. Επιπλέον, σχετίζονται με τοπικές δερματικές λοιμώξεις, όπως το φυσαλιδώδες μολυσματικό κηρίο και γενικές ασθένειες, όπως το σταφυλόκοκκικό σύνδρομο αποκόλλησης της επιδερμίδας (Staphylococcal scalded skin syndrome - SSSS), το οποίο προκαλεί πυρετό, δερματική υπερευαισθησία, ερύθημα και ακολουθείται από επιφανειακό σχηματισμό κυψελών και διαχωρισμό του δέρματος αφήνοντας μεγάλες περιοχές απογυμνωμένου δέρματος. (41) Το SSSS

έχει δύο είδη: το τοπικό και το γενικό. Στο τοπικό ο *S. aureus* παράγει την τοξίνη τοπικά, ενώ στο γενικό ο *S. aureus* συνήθως, βρίσκεται σε μια απομακρυσμένη τοποθεσία. Οι τοξίνες τότε απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και η έλλειψη προστατευτικών αντισωμάτων επιτρέπουν στις τοξίνες να φθάσουν στην επιδερμίδα. Όταν γίνει αυτό, οι τοξίνες δρουν τοπικά προκειμένου να δημιουργήσουν δερματικές βλάβες. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι περίπου το 5% των στελεχών του *S. aureus* παράγουν επιδερμολυτικές τοξίνες, ενώ από τα συγκεκριμένα στελέχη υπάρχουν κάποια που παράγουν μόνο ETA, άλλα που παράγουν ETA και ETB και στελέχη που παράγουν ETB μόνο αντιπροσωπεύοντας το 88%, 8% και 4% των στελεχών, αντίστοιχα. (42)

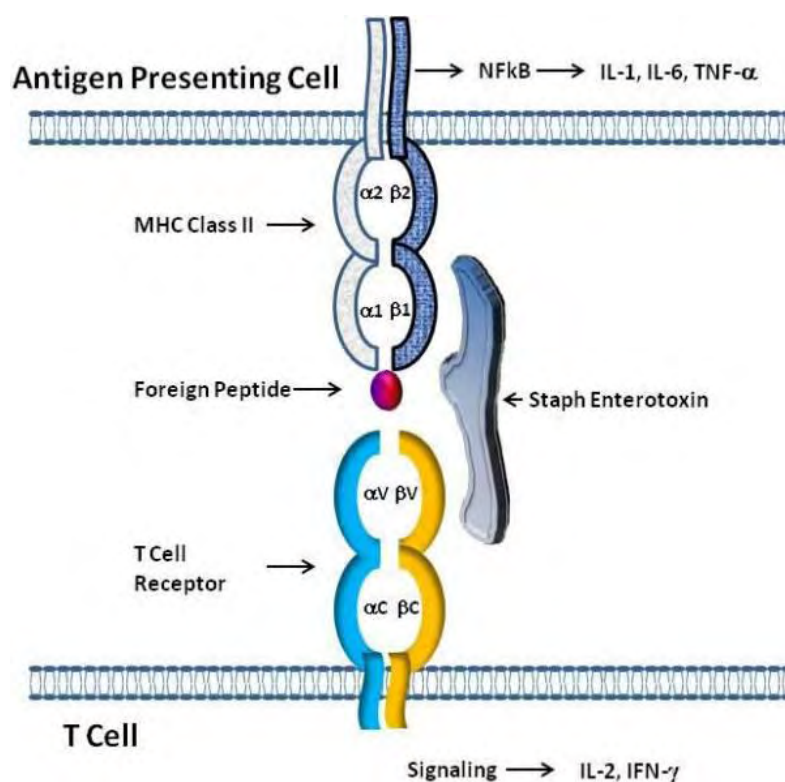


Εικόνα 6: Επίδραση των επιδερμολυτικών τοξινών στο δέρμα και σχηματισμός σταφυλοκοκκικού συνδρόμου αποκόλλησης της επιδερμίδας (Staphylococcal scalded skin syndrome - SSSS)

Η **τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1)** μαζί με τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs) είναι μέλη μιας τεράστιας οικογένειας εξωτοξινών που ονομάζονται υπεραντιγόνα (SAGs). Οι SAGs είναι πρωτεΐνες που δεν ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα όταν υπάρχει επαφή μεταξύ αντιγόνου-αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και T λεμφοκυττάρων. (43) Το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (Toxic shock syndrome - TSS), το οποίο είναι μία ασθένεια προκαλείται από τον *S. aureus*, περιγράφηκε αρχικά από τον Todd et al. το 1978 και αναφέρεται ότι παράγεται κυρίως από μία πρωτεΐνη των σταφυλόκοκκων που ονομαζόταν αρχικά, εντεροτοξίνη F και εξωτοξίνη C και αργότερα ονομάστηκε τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1). (44) Το γονίδιο *tsst-1* κωδικοποιεί για μια εξωτοξίνη που προκαλεί το TSS. Πρόκειται για μια σοβαρή ασθένεια που διακρίνεται από συμπτώματα, όπως ο πυρετός, εξανθήματα, υπόταση και δυσλειτουργία των πολυοργανικών συστημάτων. Τα

τελευταία ευρήματα κάνουν λόγο για μια συσχέτιση μεταξύ του TSS και της έμμυνου ρύσης στις γυναίκες. Ωστόσο, σήμερα αυτή η σοβαρή ασθένεια μπορεί να προκαλείται από ποικίλες καταστάσεις, όπως μία χειρουργική επιπλοκή ή τοπικές μολύνσεις, όπως είναι το δέρμα ή οι αναπνευστικές οδοί. (45) Χαρακτηριστικό είναι ότι η εν λόγω τοξίνη δεν ανιχνεύεται μόνο σε στελέχη σταφυλόκοκκων, αλλά και σε στελέχη *Streptococcus pyogenes* και *Clostridium sordellii*.

Οι **εντεροτοξίνες** (SEs) είναι μια οικογένεια σταφυλοκοκκικών τοξινών, τα περισσότερα γονίδια των οποίων βρίσκονται σε μεταθετά στοιχεία, όπως πλασμίδια, βακτηριοφάγοι ή νησίδες παθογονικότητας, με αποτέλεσμα να είναι συχνή η μεταφορά τους ανάμεσα στα στελέχη. (46) Σήμερα έχουν περιγραφεί 23 SEs, περιλαμβάνοντας από την SEA έως τη SEIV. Όλες έχουν υπεραντιγονική δραστηριότητα, ενώ μόνο μερικές (SEA μέχρι SEI, SER, SES, SET) έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν έμετο. Η Διεθνή Επιτροπή Ονοματολογίας συμφώνησε ότι οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες που θα χαρακτηρίζονται ως υπεραντιγόνα θα είναι αυτές που θα προκαλούν τάση προς έμετο μετά από του στόματος χορήγηση σε πειραματικά μοντέλα πρωτεύοντων. Η επιτροπή επιπλέον, ισχυρίστηκε ότι άλλες παρόμοιες τοξίνες που δεν προκαλούν εμετική τάση σε πρωταρχικά μοντέλα ζώων ή που δεν έχουν ελεγχθεί ακόμα θα έπρεπε να θεωρούνται ως **staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEI)**. (47)



Εικόνα 7: Δράση των εντεροτοξινών ως υπεραντιγόνα

Αρκετοί νέοι τύποι SEs και τοξίνες σχετιζόμενες με SEs περιγράφηκαν πρόσφατα με βάση την ομοιότητα ως προς τις αλληλουχίες γονιδίων με εκείνες των κλασικών SEs. Επιπρόσθετα, το 15% των καταλοίπων των αμινοξέων είναι διατηρημένο και τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στο κεντρικό και C-τελικό άκρο των αλληλουχιών. Οι SEs and SEI έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τις αμινοξικές αλληλουχίες σε πέντε ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιέχει τις SEA, SED και SEE, οι οποίες έχουν 53-81% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, όπως και οι καινούργιες SEIJ, SEIN, SEIO και SEIP. Η ομάδα δύο αποτελείται από τις SEB, SEC (συμπεριλαμβανομένων και των υποτύπων της), οι οποίες έχουν 66-98% ομολογία, όπως και οι SEG, SER, SEIU. Η τρίτη ομάδα περιέχει μόνο τις νέες SEs και SEIs, όπως οι SEI, SEIK, SEIL, SEIM, SEIQ ενώ στην τέταρτη ομάδα υπάρχει μόνο η TSST-1 και στην πέμπτη η SEH.

SEA

Η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη A (SEA) σχετίζεται σε ένα ποσοστό 70% με επιβεβαιωμένες περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκους. Ακόμη και σε μικρή συγκέντρωση (0.5 mg/ml) είναι ικανή να προκαλέσει εμφάνιση των συμπτωμάτων της τροφικής δηλητηρίασης. Όπως αναφέρθηκε, λειτουργεί ως υπεραντιγόνο, καθώς συνδέεται σε μόρια MCH κλάσης II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των περιφερειακών λεμφοκυττάρων και προάγοντας την παραγωγή ιντερφερονών το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε τοξικό σοκ. (48) Η SEA αποτελεί μία προτεΐνη δύο τμημάτων. Γενετικά πειράματα χαρτογράφησης έδειξαν ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για το SEA (*entA*) τοποθετείται μεταξύ των δεικτών της πουρίνης και της ισολευκίνης-βαλίνης στο χρωμόσωμα. Παρόλα αυτά, η δομή της έχει βρεθεί διατηρημένη και σε άλλες περιοχές, ενώ παράλληλα σε κάποιες περιπτώσεις είναι άγνωστη η ακριβής θέση της. (46)

SEB

Η εντεροτοξίνη B (SEB) έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνο κατηγορίας B, καθώς αποτελεί την πιο δραστική σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη και ακόμη σε μικρές δόσεις μπορεί να προκαλέσει τοξικές επιπτώσεις σε σύγκριση με άλλους χημικούς παράγοντες. (49) Σε μικρές συγκεντρώσεις έχει τη δυνατότητα να μεταφέρεται μέσω του αέρα, του φαγητού και του νερού, ενώ ταυτόχρονα έχει κατασκευασθεί και ως βιολογικό όπλο τον 20^ο αιώνα, λόγω της ικανότητάς της αυτής. Η SEB θεωρείται τοξίνη υψηλού κινδύνου, εξαιτίας της σχετικής ευκολίας να παραχθεί, της σταθερότητάς της ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία και της εξαιρετικής τοξικότητας που έχει κατά την οδό της αναπνοής. (50)

SEC

Η τύπου C εντεροτοξίνη των σταφυλόκοκκων (SEC) αποτελούν μια ομάδα καλά διατηρημένων πρωτεϊνών με σημαντική ανοσολογική αντίδραση. Παρόλο που τρεις SEC υπότυποι (SEC1, SEC2, and SEC3) έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι τα ισοηλεκτρικά σημεία των SEC από αρκετά στελέχη σταφυλόκοκκων διαφέρουν ανάμεσα στους τρεις υπότυπους. Πιθανόν η ετερογένεια της τοξίνης αυτής να οφείλεται στην επιλογή τροποποιημένων αλληλουχιών SEC που διευκολύνουν την επιβίωση των σταφυλόκοκκων στους αντίστοιχους ξενιστές. (51)

SED

Η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη D είναι μία από τις τοξίνες (μαζί με την SEA και SEC) που είναι εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό σε περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκους καθώς μικρές ποσότητες αυτής μπορούν να προκαλέσουν παθολογικές καταστάσεις.

SEE

Στην E εντεροτοξίνη (SEE) δεν έχουν γίνει κρυσταλλογραφικές μελέτες μέχρι σήμερα, αλλά η δομή της σχετίζεται στενά με αυτήν της τοξίνης SEA ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλεί καταστάσεις τροφικής δηλητηρίασης. (52)

SE-like

Παρά την ομολογία μεταξύ των SEs και SEI, ο ακριβής ρόλος των enterotoxin-like τοξινών παραμένει ακόμα άγνωστος. Παρόλα αυτά, η θέση των γονιδίων τους στις νησίδες παθογονικότητας μαρτυρά ότι αποτελούν λοιμογόνους παράγοντες και έχουν ένα αμυντικό ρόλο ενάντια στο ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή, δρώντας κατά τόσο της έμφυτης, όσο και της επίκτητης ανοσίας. (53) Βέβαια, υπάρχουν βιβλιογραφίες για κάποιες από τις τοξίνες, όπως η **SEF** που φαίνεται να εμπλέκεται στο συνδρόμο τοξικής καταπληξίας και οι **SEG, SEH, SEI**, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί πολύ, όπως οι προηγούμενες, αλλά έχουν γίνει αναφορές ότι συμμετέχουν στην τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκους. (54)

Το 2001 καταγράφηκε για πρώτη φορά η παρουσία ενός **egc (enterotoxin gene cluster)** οπερονίου που θεωρείται «ρεξερβουάρ» των γονιδίων SE/SEI κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. (55) Συγκεκριμένα, το γονιδιακό αυτό σύμπλεγμα εντεροτοξινών (*egc*) οργανώνεται σε ένα οπερόνιο που αποτελείται από δύο γονίδια εντεροτοξινών (*seg* και *sei*), τρία SE-like γονίδια εντεροτοξινών με δραστηριότητα υπεραντιγόνου, χωρίς όμως να προκαλούν εμετό (*selo*, *selm*

και *seln*) και δύο ψευδογονίδια (*φent-1* και *φent-2*). Έχουν γίνει αναφορές σχετικά με το ότι το *egc* προέκυψε μέσω διπλασιασμού και παραλλαγής γονιδίων από ένα προγονικό γονίδιο και ο ανασυνδιασμός των γονιδίων δημιούργησε ποικιλία τοξινών με διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες. Μέχρι σήμερα αρκετά ποικίλα αλληλία της *egc* τοξίνης έχουν περιγραφεί σε κλινικές περιπτώσεις, σε ζώα και τρόφιμα σε αποικίες τόσο του *S. aureus* όσο και των CoNS. (56) Αργότερα, περιγράφηκε ένα παράγωγο του *egc* που κωδικοποιεί μία καινούργια εντεροτοξίνη, την SEU, η οποία είναι αποτέλεσμα προσθήκης 15bp στο *φent-1*. Το παράγωγο αυτό εμφανίζεται πλέον με την ονομασία *egc-2*. (57) Γενικά, μαζί με το *egc-2* έχουν περιγραφεί συνολικά τέσσερις υπότυποι *egc*, οι οποίοι είναι:

- *egc1* (*selo*, *selm*, *seli*, *φent-1*, *φent-2*, *seln*, *seg*)
- *egc2* (*selo*, *selm*, *seli*, *selu*, *seln*, *seg*)
- *egc3* (*selo_v*, *selm_v*, *seli_v*, *selu_v*, *seln_v*, *seg_v*)
- *egc4* (*selo*, *selv*, *selu2*, *seln*, *seg*) (55)

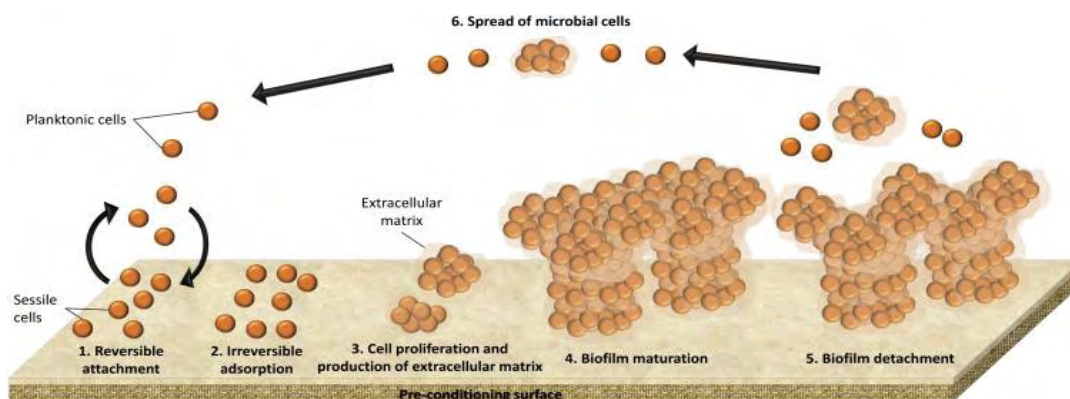
Επιπλέον, σε μια έρευνα παρατηρήθηκε ότι η *egc* περιοχή κάποιων στελεχών περιλάμβανε το πρώτο γονίδιο (*selo*), αλλά υστερούσε ενός ή περισσότερων γονιδίων του οπερονίου. (56) Ακόμα, μελέτες πάνω στα γονίδια που κωδικοποιούν για υπεραντιγόνα σε κλινικές αποικίες *S. aureus* έδειξαν ότι τα περισσότερα στελέχη είχαν τέτοια γονίδια και συγκεκριμένα ομάδες γονιδίων εντεροτοξινών (*clusters*), οποιαδήποτε ασθένεια και να προκαλούσαν. (58)

1.3.5 Σχηματισμός βιομεμβράνης

Τα κύτταρα των σταφυλόκοκκων έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται σε ένα μείγμα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και εξωκυτταρικού DNA σχηματίζοντας μια εξωκυττάρια πολυμερή ουσία (βιομεμβράνη), η οποία έχει την ικανότητα να προσκολλάται σε διάφορες επιφάνειες. Για τους σταφυλόκοκκους αυτό αποτελεί σημαντικό στοιχείο για να μπορέσουν να αποικίσουν στο δέρμα και σε βλενώδεις επιφάνειες και να προκαλέσουν μολύνσεις που σχετίζονται με ιατρικές συσκευές.

Ο σχηματισμός της βιομεμβράνης λαμβάνει χώρα σε τρεις φάσεις: πρώτα είναι η αρχική σύνδεση των κυττάρων των σταφυλόκοκκων με την επιφάνεια, στην συνέχεια ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τέλος η ωρίμανση της βιομεμβράνης και η κυτταρική απόσπαση και διασπορά. Αυτά τα στάδια οδηγούν στο σχηματισμό μιας πολυκυτταρικής και πολυεπίπεδης δομής με χαρακτηριστικά κανάλια ενσωματωμένα σε ένα μείγμα πολυσακχαριτών. (59) Ο *S. epidermidis* και ο *S. aureus* είναι κατά κύριο λόγο τα στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν

έκφραση γονιδίων στη βιομεμβράνη, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των σταφυλόκοκκων, καθώς συμβάλλουν στον βακτηριακό αποικισμό σε επιφάνειες (βιοτικές ή αβιοτικές) που ίσως λειτουργούν ως υπόστρωμα για τη μικροβιακή προσκόλληση όταν οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε στρεσογόνες καταστάσεις. (60)



Εικόνα 8: Σχηματισμός βιομεμβράνης

Αν και ο κύριος εκπρόσωπος των CoNS στις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις είναι ο *S. epidermidis*, δεν είναι το μοναδικό μέλος αυτής της κατηγορίας που έχει την δυνατότητα να σχηματίζει βιομεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα μέσω σχηματισμού βιομεμβράνης, έχει βρεθεί ότι ο *S. lugdunensis* έχει προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα, καθώς και λοιμώξεις που σχετίζονται με ιατρικές συσκευές, ο *S. haemolyticus* έχει συσχετισθεί κυρίως με λοιμώξεις σε νεογνά και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ο *S. capitis* με προσθετική βαλβίδα ενδοκαρδίτιδας και λοίμωξη βηματοδότη, ενώ ο *S. warneri* και ο *S. caprae* έχει αναφερθεί ότι προκαλούν ορθοπεδικές λοιμώξεις. (61) Αν και οι λοιμώξεις που έχουν προκληθεί μέσω του σχηματισμού βιομεμβράνης από τους CoNS δεν είναι τόσο σοβαρές (συγκριτικά με τις λοιμώξεις του *S. aureus*) συχνά είναι δύσκολη η αντιμετώπιση τους, καθώς η δημιουργία βιομεμβράνης μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες λοιμώξεις ή ακόμη και σε αφαίρεση της ιατρικής συσκευής με αποτέλεσμα τις περαιτέρω επιπλοκές. (62)

1.5 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ ΣΕ ΖΩΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Οι σταφυλόκοκκοι είναι διαδεδομένοι στη φύση, αλλά κατά κύριο λόγο είναι κοινοί αποικιστές των θηλαστικών και των πουλιών, καθώς έχουν βρεθεί σε περιβάλλοντα, όπως το δέρμα και οι βλεννώδεις μεμβράνες των θηλαστικών. Επιπρόσθετα, οι άνθρωποι αποικίζονται

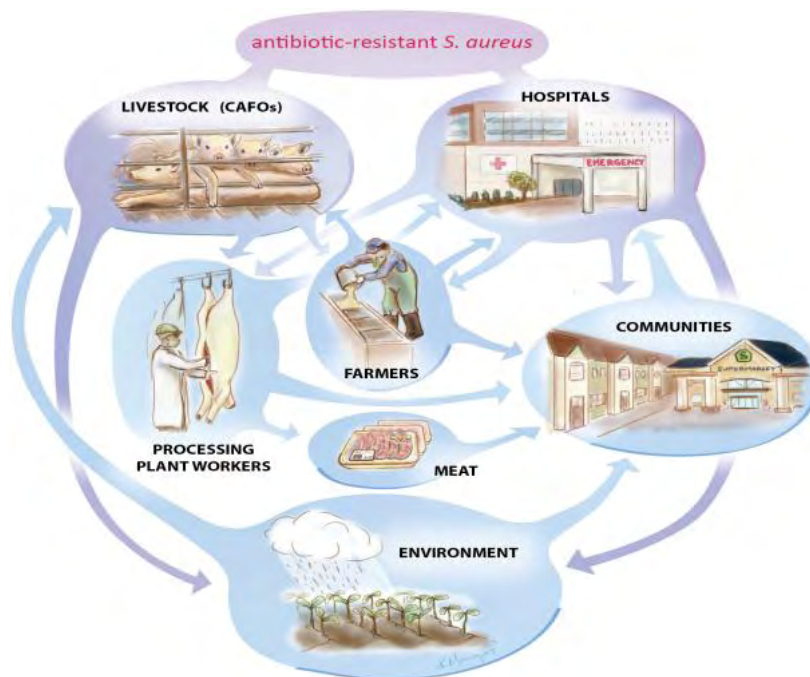
από διάφορα είδη σταφυλόκοκκων. Κάποιοι, όπως ο *S. epidermidis* ή ο *S. hominis* μπορούν να βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σώματος, ενώ κάποιοι άλλοι εμφανίζονται σε συγκεκριμένα σημεία, όπως ο *Staphylococcus auricularis*, ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικό του αυτιού. (63)

Οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν μία ομάδα ευκαιριακών παθογόνων, τα οποία δεν βρίσκονται μόνο σε ζώα και ανθρώπους, αλλά διαδίδονται ευρέως στο περιβάλλον, όπως στη σκόνη, το έδαφος, το νερό και τον αέρα και μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους. Στους ανθρώπους αποτελούν σημαντικά αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων, καθώς έχουν συσχετισθεί με ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία και λοιμώξεις του αίματος. Από την άλλη, στα ζώα έχει βρεθεί ότι οι σταφυλόκοκκοι σχετίζονται με λοιμώξεις που μπορούν να προκαλέσουν αρθρίτιδα, μαστίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Επιπλέον, οι CoNS-ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη (MRCoNS) έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις χαλασμένου κρέατος, πράγμα που αιτιολογεί τη μετάδοση των βακτηρίων στο φαγητό. (64)

Αξίζει να γίνει αναφορά σε μία θεμελιώδης βιολογική αρχή του *S. aureus* που είναι η ικανότητά του να αποικίζει ασυμπτωματικά τους υγιείς ανθρώπους, καθώς περίπου το 30% των ανθρώπων είναι ασυμπτωματικοί φορείς. Οι φορείς ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου μόλυνσης και αποτελούν μία σημαντική πηγή εξάπλωσης των στελεχών του *S. aureus* μεταξύ των ατόμων. Το αρχικό μοντέλο μετάδοσης του βακτηρίου είναι η άμεση επαφή, συνήθως από δέρμα σε δέρμα, με ένα άτομο μολυσμένο ή αποικισμένο, ενώ σημαντικό ρόλο ίσως να παίζει και η επαφή με μολυσμένα αντικείμενα και επιφάνειες. Αρκετοί παράγοντες του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας φυσικού φραγμού του δέρματος, παρουσία υποκείμενων νοσημάτων, όπως ο διαβήτης και το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας ή η μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προδιαθέτουν τη μόλυνση. (65)

Επιπρόσθετα, η μόλυνση από *S. aureus* είναι η κύρια αιτία για ασθένειες του δέρματος, των μαλακών μορίων και ιστών, του αναπνευστικού συστήματος, των αρθρώσεων και της καρδιάς. Είναι γνωστό ότι αποτελεί ένα πολύπλοκο και επικίνδυνο παθογόνο για τους ανθρώπους. Οι συχνότητες των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων που αποκτήθηκαν από την κοινότητα και αυτών που αποκτήθηκαν κατά τη διαμονή σε μονάδες υγείας έχουν αυξηθεί σταθερά. (66) Πιο συγκεκριμένα, οι MRSA ήταν κάποτε περιορισμένοι στα νοσοκομεία και στις μονάδες υγείας και ήταν γνωστοί ως νοσοκομειακά MRSA στελέχη (Hospital-Associated MRSA, HA-MRSA). Ωστόσο, τα τελευταία 20 χρόνια λοιμώξεις από MRSA έχουν παρατηρηθεί και στον υπόλοιπο πληθυσμό, δηλαδή σε άτομα τα οποία δεν είχαν εκτεθεί προηγουμένως σε κάποια μονάδα υγείας. Τα στελέχη που προκαλούν τέτοιες λοιμώξεις αναφέρονται ως στελέχη MRSA σχετιζόμενα με την κοινότητα (Community-Associated MRSA, CA-MRSA). (67) Επιπλέον, το

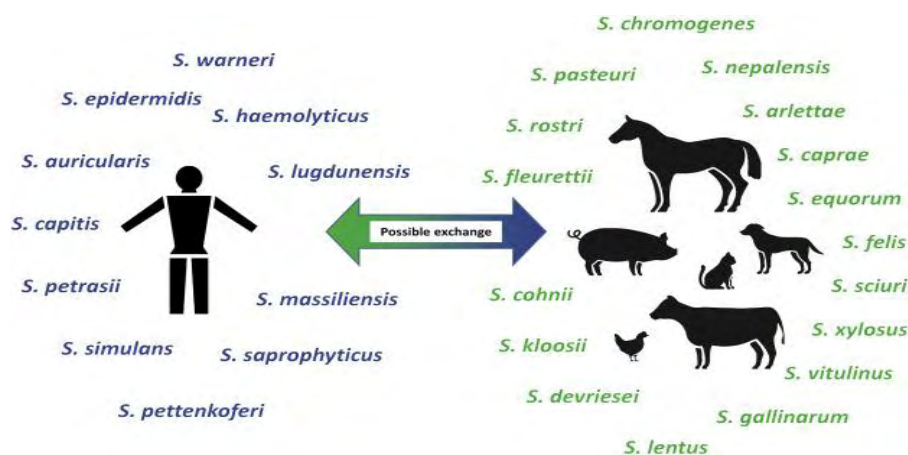
2005 περιγράφηκε για πρώτη φορά και στελέχη MRSA σχετιζόμενα με την κτηνοτροφία (Livestock associated MRSA, LA-MRSA), όπου αναγνωρίστηκε ένας καινούργιος κλώνος MRSA, ο ST398. Γενικότερα, τα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι διαφορετικά από αυτά που εμφανίζονται στους ανθρώπους και έχει βρεθεί ότι φέρουν και μερικούς διαφορετικούς λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι βοηθούν στην επιβίωση των εκάστοτε στελεχών.



Εικόνα 9: Διασπορά ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* σε ανθρώπους, ζώα και διάφορα περιβάλλοντα

Τα ζώα, ωστόσο, είναι συνήθης πηγή των σταφυλόκοκκων, καθώς τα βακτήρια αυτά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχουν την ικανότητα να αποικίζουν στο δέρμα, τη μύτη, την ουρογεννητική και γαστρεντερική οδό και με αυτόν τον τρόπο να μεταφέρονται στον άνθρωπο μέσω του χειρισμού τόσο των ζώων όσο και των προϊόντων ζωϊκής προέλευσης. Αυτό έχει ως συνέπεια την είσοδο των σταφυλόκοκκων στην τροφική αλυσίδα, με τον κίνδυνο να αποτελέσουν απειλή μελλοντικά για τους καταναλωτές των τροφών αυτών. (68) Είναι γνωστό ότι τα τρόφιμα πριν εισέλθουν στην αγορά προς πώληση υπόκεινται σε μία επεξεργασία ώστε να είναι ασφαλή προς τον καταναλωτή. Τέτοιου είδους επεξεργασία αποτελεί η παστερίωση η οποία περιλαμβάνει έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες (από 57 °C μέχρι 140°C) για ένα χρονικό διάστημα (από 4 δευτερόλεπτα έως 30 λεπτά), ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Όπως προαναφέρθηκε όμως οι εντεροτοξίνες εμφανίζουν αντοχή στην θερμότητα. Συγκεκριμένα

έκθεση του τρόφιμου σε θερμοκρασίες παστερίωσης μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του εντεροτοξινογόνου βακτηρίου αλλά όχι σε καταστροφή των τοξινών. Εκτός αυτού, έχουν την ικανότητα να διατηρούν την δραστικότητα τους και κατά την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, με αποτέλεσμα να μπορούν να εισέρχονται στο γαστρεντερικό σύστημα χωρίς να καταστρέφονται.



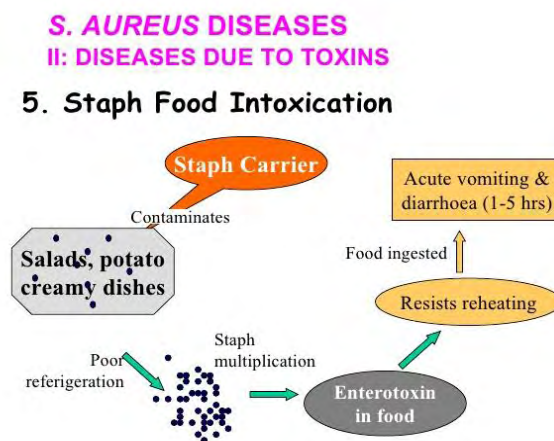
Εικόνα 10: Μετάδοση στελεχών των σταφυλόκοκκων από τον άνθρωπο στα ζώα και το αντίστροφο

Έτσι, μία από τις σημαντικότερες νόσους παγκοσμίως που οφείλονται στους λοιμογόνους παράγοντες των σταφυλόκοκκων είναι η τροφική δηλητηρίαση, καθώς μέσω των τοξινών που παράγουν αποτελούν αίτιο επιδημιών που σχετίζονται με το φαγητό (foodborne disease outbreak, FBO). Το 2016 αυτοί οι παράγοντες αντιπροσώπευαν τη δεύτερη πιο συχνή αιτία FBOs στην Ευρώπη, η οποία λάμβανε χώρα κυρίως σε καντίνες, χώρους εστίασης, σχολεία και μονάδες υγείας. (69)

Η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκους είναι μία ασθένεια του γαστρεντερικού συστήματος που προκαλείται από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν τοξίνες, οι οποίες παράγονται από τους σταφυλόκοκκους. Οι άνθρωποι που είναι φορείς σταφυλόκοκκων μπορούν να μεταδώσουν τα στελέχη αυτά στο φαγητό, αν προηγουμένως δεν λάβουν σωστά μέτρα (πλύσιμο χεριών). Αν το φαγητό περιέχει σταφυλόκοκκους, τα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιαστούν εκεί και να παράγουν τοξίνες. Παρόλο που οι υψηλές θερμοκρασίες μαγειρέματος οδηγούν στον θάνατο αυτών των βακτηρίων, οι τοξίνες έχουν την ικανότητα να διατηρούνται, καθώς εμφανίζουν αντοχή στην θερμότητα και κατά συνέπεια είναι ικανές να προκαλέσουν νόσο. Σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκους χαρακτηρίζεται από ξαφνική ναυτία, εμετούς και

κράμπες στο στομάχι, ενώ πολλοί άνθρωποι μπορεί να έχουν και διάρροια. Τα συμπτώματα συνήθως, εμφανίζονται μέσα σε 30 λεπτά μέχρι 8 ώρες μετά την κατανάλωση τροφής ή νερού που περιέχει σταφυλοκοκκικές τοξίνες και διαρκούν όχι περισσότερο από μία μέρα. Σε σπάνιες περιπτώσεις η ασθένεια γίνεται πιο σοβαρή, ενώ σημαντικό είναι ότι πρόκειται για μια μη μεταδοτική ασθένεια. (70) Τα τρόφιμα που σχετίζονται με την τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκους είναι το κρέας, το κοτόπουλο, τα αυγά, οι σαλάτες, τα γλυκά, τα σάντουιτς, το γάλα, καθώς και προϊόντα που προέρχονται από αυτές τις πρώτες ύλες. (71)

Η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση συμβαίνει εξαιτίας των τοξινών που παράγονται από τους σταφυλόκοκκους και συγκεκριμένα πρόκειται για τις εντεροτοξίνες (SEs) που αναφέρθηκαν προηγουμένως. (72) Όταν η μολυσματική τροφή καταναλωθεί, οι εντεροτοξίνες απορροφώνται στο αίμα στο γαστρεντερικό σωλήνα ενεργοποιώντας την τάση προς έμετο. (73)



Εικόνα 11: Σταφυλόκοκκοι σε τρόφιμα και τα συμπτώματα που προκαλούν

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους λοιμογόνους παράγοντες των σταφυλόκοκκων και συγκεκριμένα τις εντεροτοξίνες (SEs και SEIs), την Panton-Valentine λευκοκτονίνη (PVL), την τοξίνη τοξικού συνδρόμου (TSST-1) και τις επιδερμολυτικές τοξίνες (ETs).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

3.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) και μελετήθηκαν συνολικά 122 στελέχη σταφυλόκοκκων, από 213 κλινικά δείγματα, τα οποία απομονώθηκαν από γάλα προβάτων καθώς και από τα αρμεκτικές μηχανές. Παρακάτω εμφανίζεται ένας πίνακας με τους νομούς της Ελλάδος από όπου προήλθαν τα δείγματα:

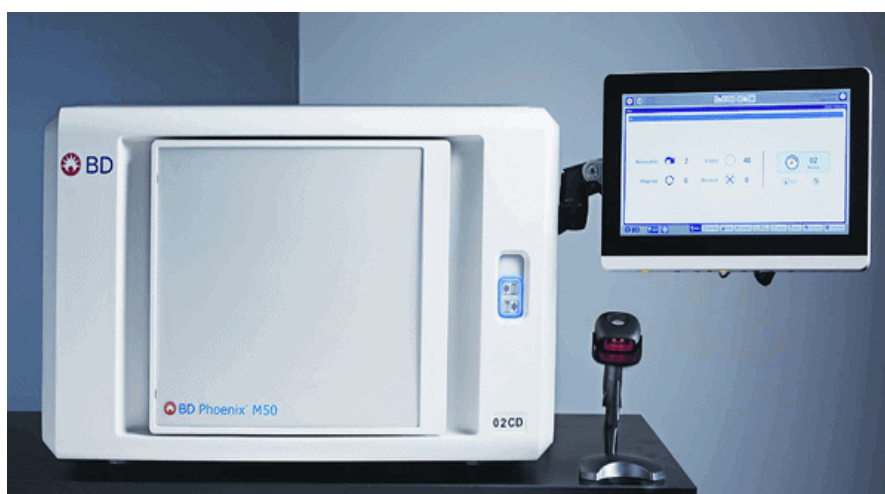
<u>ΣΤΕΛΕΧΗ</u>	<u>ΝΟΜΟΣ</u>
24	Αχαΐας
19	Ροδόπης
17	Δράμας
10	Θεσπρωτίας
9	Αιτωλοακαρνανίας
9	Καβάλας
6	Λακωνίας
5	Ηλείας
3	Αρκαδίας
3	Πέλλας
2	Άρτας
2	Φλώρινας
1	Κοζάνης
1	Ιωαννίνων
11	Άλλες περιοχές

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Αρχικά, τα κλινικά δείγματα καλλιεργήθηκαν σε άγαρ και επώαστηκαν στους 37° C για 24-48 ώρες. Στη συνέχεια από κάθε τρυβλίο επιλέχτηκαν μεμονωμένες αποικίες οι οποίες στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ με περιεκτικότητα 5% αίμα προβάτου και ακολούθησε επώαση για 18-22 ώρες στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες. Μετά από μία μέρα επώασης, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχτηκαν για το σκοπό της μελέτης βάσει της Gram-χρώσης και της δοκιμασίας καταλάσης.

3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ

Η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους έγινε βάσει της δοκιμασία της κοαγκουλάσης και βάσει βιοχημικών δοκιμασιών του αυτοματοποιημένου συστήματος συστήματος BD Phoenix™.



Εικόνα 12: Αυτοματοποιημένο σύστημα BD Phoenix™

3.3.1 Χρώση κατά Gram

Γενικά, η χρώση κατά Gram χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος, γι' αυτό και αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία. Η λειτουργία της βασίζεται στον αποχρωματισμό που δημιουργεί η αιθανόλη σε θετικά και αρνητικά κατά Gram κύτταρα και συνδέεται με τη διαφορά της δομής των δύο αυτών τύπων κυττάρων. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετνιακής και διάλυμα Lugol (ιώδιο) με αποτέλεσμα το

σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Αν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται. Έτσι, αποσταθεροποιείται η εξωτερική μεμβράνη και αυξάνεται η διαπερατότητά της. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο. Τότε το σύμπλοκο παίρνει ένα ερυθρό χρώμα από τη σαφρανίνη. Ενώ, στα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως είναι οι σταφυλόκοκκοι η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται, με αποτέλεσμα να εγκλωβίζει το σύμπλοκο του κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου της χρωστικής μέσα στο κύτταρο. Η μέθοδος αυτή είναι σημαντική κλινικά, γιατί οι αιτιολογικοί παράγοντες πολλών βακτηριακών μολύνσεων είναι ορατοί μέσω αυτής.

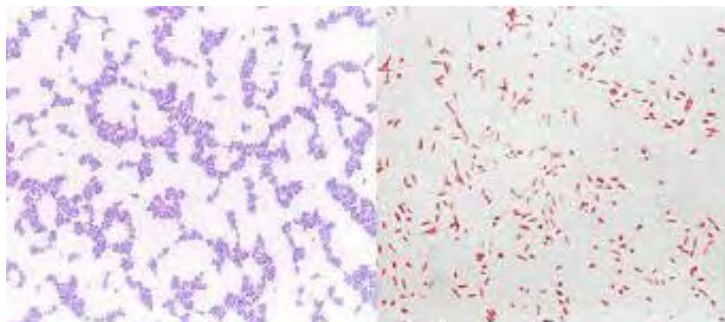
Για τη χρώση κατά Gram των σταφυλόκοκκων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit και ακολούθησε η εξής διαδικασία:

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
1. WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H ₂ O)
2. Διάλυμα crystal violet
3. Διάλυμα Lugol PVP
4. Διάλυμα αποχρωματισμού (αιθανόλη και ακετόνη)
5. Διάλυμα safranin
Αντικειμενοφόρες πλάκες
Οπτικό μικροσκόπιο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία ξεκίνησε με τη μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Ακολούθως, τα παρασκευάσματα καλύφθηκαν για 1 λεπτό με διάλυμα crystal violet και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, καλύφθηκαν και πάλι για 1 λεπτό με διάλυμα Lugol PVP και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης. Ακολούθησε αποχρωματισμός ξεπλένοντας τις αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα αιθανόλης και ακετόνη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε και πάλι χρωματισμός καλύπτοντας τα παρασκευάσματα για 10 δευτερόλεπτα με διάλυμα σαφρανίνης. Στο τέλος, τα παρασκευάσματα ξεπλύθηκαν με νερό

βρύσης, ξηράνθηκαν μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και αργότερα μικροσκοπήθηκαν. Με την χρώση κατά Gram τα Gram αρνητικά βακτήρια χρωματίζονται αγνά κόκκινα, ενώ τα Gram θετικά χρωματίζονται σκούρα ιώδη.



Εικόνα 13: Αριστερά: Χρώση κατά Gram (+) βακτηρίων. Δεξιά: Χρώση κατά Gram (-) βακτηρίων

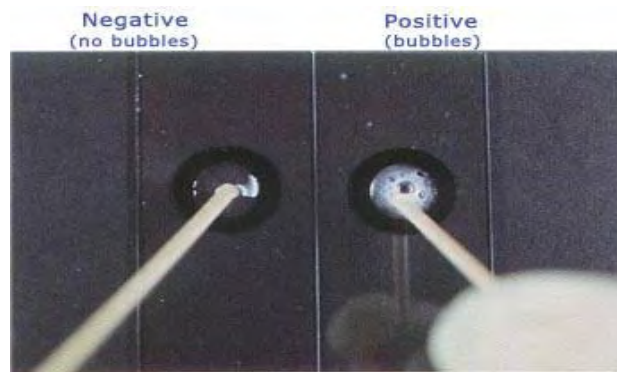
3.3.2 Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης είναι η πρώτη διαχωριστική μέθοδος μεταξύ των Gram θετικών κόκκων. Για τους σταφυλόκοκκους είναι θετική και αυτό τους διακρίνει από τους στρεπτόκοκκους και τους εντερόκοκκους, οι οποίοι είναι αρνητικοί στη δοκιμή αυτή. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 και παράγει μικρές φυσαλίδες. Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase με την παρακάτω διαδικασία:

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
1. Διάλυμα ID Color Catalase-ASE
2. Κρικοφόροι στυλεοί
3. Αντικειμενοφόρες πλάκες

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μέθοδος ξεκινά με την τοποθέτηση μίας σταγόνας καταλάσης πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολούθως, λαμβάνεται μία αποικία ή μέρος αυτής του υπό μελέτη στελέχους με κρικοφόρο στυλεό και τοποθετείται εντός της σταγόνας. Έπειτα, παρατηρείται η ύπαρξη ή μη φυσαλίδων εντός της σταγόνας με αποτέλεσμα αν το μικρόβιο παράγει καταλάση και συνεπώς είναι σταφυλόκοκκος να σχηματίζονται γρήγορα πολλές και μικρές φυσαλίδες.



Εικόνα 14: Δοκιμασία καταλάσης

3.3.3 Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης

Η πηκτάση (ή αλλιώς κοαγκουλάση) όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή είναι ένα ένζυμο που χαρακτηρίζεται από τη διαχωριστική ιδιότητα με την οποία διακρίνονται τα κοαγκουλάση-θετικά στελέχη (*S. aureus*) από τα κοαγκουλάση-αρνητικά στελέχη (CoNS) των σταφυλόκοκκων. Η ανίχνευση του ενζύμου πηκτάση έχει μεγάλη σημασία, καθώς αποτελεί την κύρια δοκιμασία ταυτοποίησης του *S. aureus*.

Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκε η παραγωγή της συνδεδεμένης πηκτάσης, παρουσίας πρωτεΐνης A και άλλων επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, με στόχο τον χαρακτηρισμό των σταφυλόκοκκων ως *S. aureus* ή CoNS. Η διαδικασία πραγματοποιείται με κυανά σωματίδια latex επικαλυμμένα με ινωδογόνο, IgG κουνελιού και ειδικά αντισώματα επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, της τάξεως των IgG ανοσοσφαιρινών.

Σε κάθε θετική δοκιμασία για *S. aureus* συμβαίνουν τα εξής:

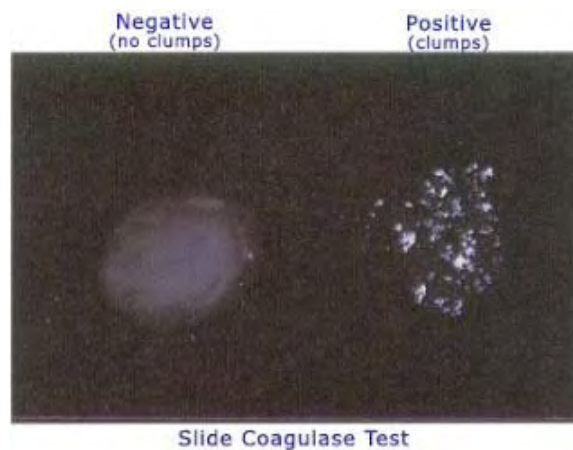
- α) η μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες, παρουσία της συνδεδεμένης πηκτάσης,
- β) η αντίδραση του Fc τμήματος της IgG κουνελιού με την πρωτεΐνη A
- γ) η δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ ειδικής IgG και επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus* και το αποτέλεσμα ερμηνεύεται από μία ορατή με γυμνό οφθαλμό αντίδραση συγκόλλησης.

Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης των υπό μελέτη στελεχών πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω μεθοδολογία:

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
1. Εμπορικό αντιδραστήριο
2. Καλλιεργήματα σταφυλόκοκκων σε αιματούχο άγαρ
3. Αναλώσιμες κάρτες πεδίων αντίδρασης
4. Κρικοφόροι στυλεοί

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, υπάρχει μία αναλώσιμη κάρτα πεδίων αντίδρασης όπου στον ένα κύκλο τοποθετείται μία σταγόνα αντιδραστήριου, σε θερμοκρασία δωματίου (18° -25oC). Η σταγόνα αυτή αναμιγνύεται με 3-6 μικρές αποικίες του προς μελέτη βακτηρίου με τη βοήθεια ενός κρικοφόρου στυλεού. Η αντίδραση παρατηρείται αφού περάσουν 20 δευτερόλεπτα κυκλικής ανάδευσης, υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού. Η δοκιμασία είναι θετική όταν κατά την ανάδευση θα σχηματιστούν μικρά και μεγάλα πήγματα και επομένως πρόκειται για *S. aureus*.



Εικόνα 15: Δοκιμασία κοαγκουλάσης

3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕ ΤΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ BD Phoenix™

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη σταφυλόκοκκων με την χρήση ενός καινοτόμου αυτόματου συστήματος, BD Phoenix™ (Biomérieux). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στα νοσοκομεία παρέχοντας τη

δυνατότητα για γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, αλλά και τον έλεγχο της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Επιπρόσθετα, συμπεριλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης με την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα, με αποτέλεσμα να δίνονται τόσο γρήγορα αποτελέσματα, όσο και να υπάρχει βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

II. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες (τοξίνες) έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τυποποίηση των στελεχών έγινε βάσει της μεθόδου MLST στην περίπτωση του *S. aureus*.

3.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA extraction)

Μετά την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των υπό μελέτη βακτηρίων πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του χρωμοσωμικού γενωμικού υλικού (DNA) τους. Το DNA αποτελεί την πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής ιατρικής και ειδικότερα της μοριακής μικροβιολογίας. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται με μεθόδους που βασίζονται στη λύση των κυττάρων με τη βοήθεια του ενζύμου της πρωτεΐνάσης K υπό την παρουσία αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και ενός ανιονικού απορρυπαντικού διαλύτη. Παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος απομόνωσης του χρωμοσωμικού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα, όπου χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή:

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
1. Αιματούχο άγαρ
2. Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer) (V _τ =50 mL):
• 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
• 1% Triton X-100
• 1 mM EDTA, pH 8.0
3. Πρωτεΐνάση K (20 mg/mL)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ξεκινώντας, πραγματοποιήθηκε δημιουργία εναιωρήματος βακτηρίων θολερότητας 2 της κλίμακας McFarland σε 1 mL dH₂O από 24ωρη καλλιέργεια (σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αιματούχο άγαρ) και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 rpm. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μL λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος και 2 μL πρωτεΐνης K. Το ίζημα επώασθηκε για μία ώρα στους 56°C. Κατόπιν, το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα του ληφθέντος DNA φυλάχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση (στους -20°C) και ενίσχυση – πολλαπλασιασμό τους με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία βιοχημική αντίδραση *in vitro* που στοχεύει στη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA στόχου. Το 1983 εμφανίστηκε για πρώτη φορά από τον Kary B. Mullis, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 καθώς πρόκειται για μία θεμελιώδης και ταυτόχρονα απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊκών θραυσμάτων σε ένα δείγμα. Το 1989 κρίθηκε ως «η μέγιστη επιστημονική ανακάλυψη της χρονιάς». Στα επόμενα χρόνια, μετά από σημαντικές βελτιώσεις, κυρίως από τον Saiki RK, εδραιώθηκε η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση-πολλαπλασιασμό των νουκλεϊκών οξέων. Η PCR χρησιμοποιεί τη θερμοανθεκτική DNA-πολυμεράση για την ενίσχυση ειδικών τμημάτων DNA σε ένα δείγμα, του DNA-στόχου δηλαδή, ανάμεσα σε διαφορετικά μόρια DNA. Επιπρόσθετα, αποτελεί μία ειδική και ευαίσθητη μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων βακτηρίων, ιών, μυκήτων και παρασίτων σε κλινικά, περιβαλλοντικά και δείγματα τροφίμων. Ταυτόχρονα, με την ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kits, την αύξηση της σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος, την αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για ειδικές αλληλουχίες DNA (μέσω τεχνικών αλληλούχισης - sequencing), επιλήθηκαν τα αρχικά προβλήματα εφαρμογής της μεθόδου στα διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια.

Βασικές αρχές της μεθόδου

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA είναι σημαντική για τη μοριακή ιατρική. Η PCR επικεντρώνεται στην επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Για την επίτευξη αυτού χρειάζονται τα εξής:

I. Μητρικό μόριο DNA

Αποτελεί την αλληλουχία-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο.

II. DNA πολυμεράση

Το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Είναι σημαντική η δράση τους στην αντιγραφή του DNA, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA και την χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και η επιμήκυνση γίνεται πάντα με κατεύθυνση 5'- 3'. Οι πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νουκλεοτίδια μόνο σε προϋπάρχον 3'- OH άκρο, με απαραίτητη την παρουσία αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων. Αρκετές πολυμεράσες έχουν ρόλο και στην επιδιόρθωση των λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA.

III. Αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινητές (primers)

Πρόκειται για ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA.

IV. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

Είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση.

Η PCR εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων. Σε κάθε κύκλο αντίδρασης η ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωση του επόμενου. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

a. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation) του DNA

Πραγματοποιείται με θέρμανση του μείγματος μέχρι τους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου και των εκκινητών, οι οποίοι είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

b. Στάδιο αναδιάταξης ή ανασύνδεσης ή υβριδισμού (annealing) των εκκινητών

Πραγματοποιείται αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης το μείγμα της αντίδρασης κυμαίνεται σε θερμοκρασία 40°C - 70°C. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του

ενός κλώνου, ενώ ο άλλος υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.

c. Στάδιο επιμήκυνσης (extension)

Γίνεται συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο μέσω δράσης μίας DNA πολυμεράσης. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου αυτού είναι 72°C.

Το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης. Οι κύκλοι της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνονται αρκετές φορές. Μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Αφού ολοκληρωθεί ο πρώτος κύκλος, το DNA - στόχος διπλασιάζεται και στη συνέχεια, ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά.

Η διεργασία της PCR διευκολύνθηκε πολύ με την χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, όπως της Taq DNA πολυμεράσης, οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και διατηρούν τη λειτουργία τους. Το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο ζει σε θερμές πηγές με θερμοκρασία 70°C - 75°C. Ακόμα, εμφανίζει δραστικότητα 800 bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτών στους 95°C. Αυτό του δίνει τη δυνατότητα να αντέχει σε συνεχείς αυξομειώσεις της θερμοκρασίας όταν πραγματοποιούνται οι επαναλαμβανόμενοι θερμοκοί κύκλοι της PCR. Γι' αυτό το λόγο το ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δεν χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Ακόμα, οι αντιδράσεις ανασύνδεσης και επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των μη ειδικών προϊόντων. Ένα μειονέκτημα του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση είναι ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης.

Η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων σταδίων κάτι που οδήγησε στην αυτοματοποίηση του συνόλου της τεχνικής αυτής με τη δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών. Μετά από ρύθμιση των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διαδικασία να εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου PCR

α)Χρόνος: Καθίσταται δυνατό να παραχθούν περισσότερα από 105 αντίγραφα ενός τμήματος DNA, εντός λίγων ωρών. Τα στάδια της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο της ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και της επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Επομένως, για περίπου 30 κύκλους μίας αντίδρασης PCR απαιτούνται μόλις 3-6 ώρες.

β)Ισχύς: Μπορεί να πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση (λόγω της επίδρασης του χρόνου ή άλλων αιτιών) ή που βρίσκονται σε μη προσπελάσιμες θέσεις (όπως σε μονιμοποιημένους ιστούς).

γ)Ευαισθησία: Παράγει αντίγραφα του DNA-στόχου σε ποσότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν υπάρχει έστω και ένα αντίγραφο αυτού. Η PCR είναι αρκετά διαδεδομένη σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών εφαρμογών, λόγω της ευαισθησίας της.

Ωστόσο, παρά τα θετικά της χαρακτηριστικά, η απόδοση της μεθόδου της PCR κρίνεται πολλές φορές ακατάλληλη για τον πολλαπλασιασμό του DNA, ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής της. Τα μειονεκτήματα της PCR αναλύονται παρακάτω:

α)Αλληλουχία-στόχος: Είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της αλληλουχίας-στόχου, ώστε να συντεθούν οι εκκινητές. Επιπρόσθετα, σημαντικός περιορισμός της μεθόδου αποτελεί και το μέγεθος των DNA-στόχων, οι οποίοι μπορούν να ενισχυθούν με αξιοπιστία καθώς μεγαλύτερη αξιοπιστία υπάρχει κατά την ενίσχυση αλληλουχιών με μήκος 200-1000 βάσεων

β)Δράση της Taq πολυμεράσης: Η Taq πολυμεράση δεν δρα πάντα με απόλυτη ακρίβεια, καθώς σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντιθέντων κλώνων μπορεί να περιλαμβάνεται κάποιο λάθος στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, τα οποία τοποθετούνται με τη βοήθεια του ενζύμου. Αυτό συμβαίνει λόγω της έλλειψης μηχανισμού διόρθωσης (proofreading). Το σφάλμα συνήθως, αφορά στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Άρα, το τελικό μείγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν και όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Με ανάλογο τρόπο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου συνεπάγοντας την ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

γ)Εκκινητές: Θα πρέπει να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτιδίων. Η αλληλουχία τους δεν επιτρέπεται να αποτελείται από επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε σειρά, κυρίως λόγω της συχνής παρουσίας τους στο γονιδίωμα οδηγώντας στη μειωμένη ειδικότητα της πολλαπλής αντιγραφής ενώ παράλληλα θα πρέπει να διασφαλίζεται και η απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών. Υπό άλλες συνθήκες, αν συμβεί το αντίθετο, μειώνεται η αποδοτικότητα της

πολλαπλής αντιγραφής. Επιπλέον, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR εξαρτώνται άμεσα από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών.

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
1. DNA βακτηρίου
2. WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H ₂ O)
3. Taq DNA πολυμεράση 5u/μL
4. 10x Taq Buffer με KCl (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
5. MgCl ₂ : 50 mM
6. Primer 1: 100 pmol/μL
7. Primer 2: 100 pmol/μL
8. Μείγμα dNTPs: 100mM
9. DNA Engine Peltier Thermal Cyclor
10. Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
11. Αυτόματος αναδευτήρας Vortex
12. Σωληνάρια erpendorf για PCR
13. Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
14. Αποστειρωμένα ρύγχη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εκτέλεση της PCR παρασκευάζεται το μείγμα έκαστης αντίδρασης τοποθετώντας ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης) σε erpendorf. Αυτές οι ποσότητες λαμβάνονται από τα εξής αντιδραστήρια (τελικός όγκος αντίδρασης 25μL):

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</u>	<u>ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)</u>
10x Taq Buffer με KCl	2,5
MgCl ₂ (50mM)	0,75
Μείγμα dNTPs (20mM)	0,5
Primer 1 (25 pmol/μL)	0,25
Primer 2 (25 pmol/μL)	0,25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0,2
dH ₂ O	18,05
DNA βακτηρίου	2,5
Τελικός όγκος	25

Ακολούθως, όλα τα erpendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής του χειριστή.

3.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΤΟΞΙΝΕΣ

Η παρουσία ή απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για τις εντεροτοξίνες, τις επιδερμολυτικές τοξίνες, τη λευκοκτονίνη και την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας επιβεβαιώθηκε με PCR ξεχωριστά για την ανίχνευση του κάθε γονιδίου. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τα γονίδια *pvl*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel*, *seq*, *ser*, *sep*, *ses*, *set*, *seo*, *sem*, *sei*, *seu*, *sen*, *seg*, *eta*, *etb*. Στους παρακάτω πίνακες περιγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων και οι συνθήκες PCR για το κάθε γονίδιο:

<u>Τοξίνη</u>	<u>Εκκινήτες</u>	<u>Αλληλουχία νουκλεοτιδίων</u>	<u>Βιβλ/κη αναφορά</u>
SEA	SEA-1	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEA-2	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	
SEB	SEB-1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEB-2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	

SEC	mpSEC-1	GTAAAGTTACAGGTGGCAAACCTTG	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpSEC-2	CATATCATAACCAAAAAGTATTGCCGT	
SED	SED-1	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SED-2	GCTGTATTTTTCCTCCGAGAGT	
SEE	SEE-1	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEE-2	CACCTTACCGCCAAAGCTG	
SEG	SEG-1	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEG-2	AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC	
SHE	SEH-1	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEH-2	CATCTACCCAAACATTAGCACC	
SEI	SEI-1	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	SEI-2	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	
SEJ	mpSEJ-1	TAACCTCAGACATATATACTTCTTTAACG	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpSEJ-2	AGTATCATAAAGTTGATTGTTTTTCATGCAG	
SEN	mpSEN-1	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpSEN-2	AACTCTGCTCCCACTGAAC	
SEO	mpSEO-1	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpSEO-2	ATCTTTAAATTCAGCAGATATCCATCTAAC	
SEM	mpSEM-1	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpSEM-2	TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	
SEK	SEK1	ATGAATCTTATGATTTAATTTCAGAATCAA	Varshney Et Al., 2009 (75)
	SEK2	ATTTATATCGTTTCTTTATAAGAAATATCG	
SEL	SEL1	ATGAAAAAAGATTATTATTTGTAATTGTTATTAC	Varshney Et Al., 2009 (75)
	SEL2	ATCATCTTTTTGAAATTTGACATCTAG	
SEQ	SEQ1	GGAAAATACACTTTATATTCACAGTTTCA	Varshney Et Al., 2009 (75)
	SEQ2	ATTTATTCAGTTTTCTCATATGAAATCTC	
SER	SER1	AGCGGTAATAGCAGAAAATG	Varshney Et Al., 2009 (75)
	SER2	TCTTGTACCGTAACCGTTTT	

SEP	SEP1	ATCATAACCAACCGAATCAC	Rajkovic Et Al., 2020 (76)
	SEP2	AGAAGTAACTGTTCAGGAGCTA	
SES	SES1	TGTTTCCTGTCTCTGAGTTATATA	Hait Et Al., 2012 (77)
	SES2	TGCATTGGAGAAGTATCTAAAAG	
SET	SET1	CGATAATCAATCTGTTTCATAGTT	Hait Et Al., 2012 (77)
	SET2	GTTTATCGAATCAATACATTAGACG	
SEU	SEU1	CCTTTAAGGGTAATGTGTACG	Nashev Et Al., 2007 (78)
	SEU2	ATCATGCTCGGTCACACC	
TSST-1	TST-1	TTCACTATTTGTAAGAGTGTCAGACCCACT	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	TST-2	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	
ETA	mpETA-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpETA-3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	
ETB	mpETB-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	mpETB-2	AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	
PVL	PVL-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	Jarraud Et Al., 2001 (74)
	PVL-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	

Συνθήκες PCR	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
Τοξίνες	95°C ► 3min	95°C ► 30sec	48-65°C ► 1min	72°C ► 30sec- 1min	34	72°C ► 10min

3.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Η μοριακή μέθοδος MLST χρησιμοποιεί επτά γονίδια του βασικού μεταβολισμού, τα οποία τοποθετούνται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις. Τα γονίδια αυτά που ονομάζονται γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή διατηρημένα γονίδια (housekeeping genes) βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα, ενώ δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής. Συνεπώς, τα διατηρημένα αυτά γονίδια έχουν

σημαντικό ρόλο τόσο σε μελέτες τυποποίησης, όσο και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών ενός είδους βακτηρίου.

Γενικά, επιλέγονται συγκεκριμένα γονίδια για κάθε είδος βακτηρίου. Η διαδικασία ξεκινά με την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος (internal fragment) του επιλεγέντος γονιδίου μήκους περίπου 450 bp. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η αλληλούχισή τους (sequencing). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και παρατίθενται στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές διεθνώς να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια (alleles) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα αλλήλια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των αλληλίων (allelic profile) των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων μεταβολισμού και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο, μοναδικό τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο, αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

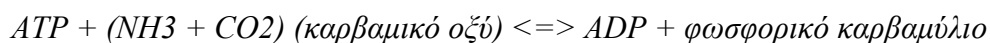
Όλες οι σχετικές με τη μοριακή μέθοδο MLST πληροφορίες, όπως οι αλληλουχίες αναφοράς των αλληλίων, οι ST τύποι και επιδημιολογικά δεδομένα είναι καταχωρημένα στις δύο επίσημες διαδικτυακές βάσεις δεδομένων της τεχνικής MLST www.mlst.net και www.pubmlst.org, που προέρχονται από το Imperial College, London και το Oxford University, αντίστοιχα.

3.8.1 Γονίδια της μεθόδου MLST για τον *S. aureus*, ένζυμα και αντιδράσεις

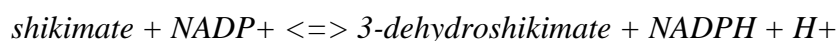
Ο *S. aureus* περιλαμβάνει επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού της MLST που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν ειδικές αντιδράσεις :

- 1) ***arcC* (Carbamate kinase)**: κωδικοποιεί το ένζυμο της καρβαμικής κινάσης (συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών, των αμινοξέων αργινίνης, προλίνης και στον μεταβολισμό του αζώτου). Πρόκειται για μία ATP καρβαμική φωσφοτρανσφεράση, η οποία καταλύει την

αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδας με ενέργεια από την μετατροπή του ATP σε ADP.



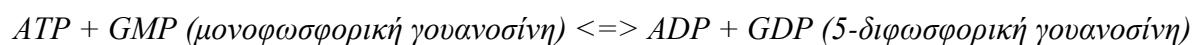
- 2) **aroE (Shikimate dehydrogenase)**: κωδικοποιεί μία αφυδρογονάση που συμμετέχει στο μεταβολισμό αμινοξέων, κυρίως της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του $NADP^+$ ως δέκτη πρωτονίων (H^+):



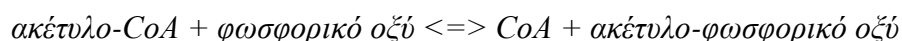
- 3) **glpF (Glycerol kinase)**: κωδικοποιεί την κινάση της γλυκερόλης. Πρόκειται για μία φωσφοτρανσφεράση που λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό των λιπιδίων και καταλύει την αντίδραση με χρήση ενέργειας από τη διάσπαση του ATP.



- 4) **gmk (Guanylate kinase)**: κωδικοποιεί το ένζυμο κινάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης. Είναι μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων της μεταβολικής οδού των νουκλεοτιδίων και ειδικά των πουρινών, με ενέργεια από το ATP.



- 5) **pta (Phosphate acetyltransferase)**: κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοτρανσακετυλάση. Αυτό το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων και ακετυλομάδων κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη και καταλύεται σε υπόστρωμα ακέτυλο-CoA.



- 6) **tpi (Triosephosphate isomerase)**: κωδικοποιεί μία ισομεράση. Αυτό το ένζυμο έχει δράση αναγωγής του υποστρώματος της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και προϊόν τη φωσφογλυκερόνη. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει το ένζυμο είναι οι οδοί της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης και η αντίδραση που καταλύει είναι αμφίδρομη.



- 7) **yqiL (Acetyl-CoA acetyltransferase)**: κωδικοποιεί ένζυμο μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμο A. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η συγκεκριμένη τρανσφεράση είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, η σύνθεση και

αποδόμηση των κετονικών σωμάτων, καθώς και αμινοξέων, όπως βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης.



Στην παρούσα μελέτη όλα τα στελέχη *S. aureus* που έφεραν έστω ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για τοξίνες, τυποποιήθηκαν μοριακά με τη μέθοδο MLST. Για το σκοπό αυτό σε κάθε στέλεχος τα γονίδια μεταβολισμού του *S. aureus* που ανιχνεύονται στη μέθοδο MLST ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR. Για κάθε γονίδιο της MLST που διερευνήθηκε παρασκευάστηκαν ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε γονίδιο. Οι συνθήκες αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης ήταν κοινές για όλα τα γονίδια του *S. aureus* που ανιχνεύθηκαν. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών αυτών με την μέθοδο MLST αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

<u>Εκκινητές</u>	<u>Αλληλουχία νουκλεοτιδίων</u>	<u>Βιβλ/κη αναφορά</u>
arcC-Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	Enright et al, 2000 (79)
arcC-Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	Enright et al, 2000 (79)
aroE-Dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
glpF-Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	Enright et al, 2000 (79)
glpF-Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
gmk-Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	Enright et al, 2000 (79)
gmk-Dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	
pta-Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	Enright et al, 2000 (79)
pta-Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
tpi-Up	TCGTTCACTCTGAACGTCGTGAA	Enright et al, 2000 (79)
tpi-Dn	TTGACCTTCTAACAATTGTAC	
yqiL-Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	Enright et al, 2000 (79)
yqiL-Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Συνθήκες PCR	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
MLST <i>S. aureus</i>	94°C ► 5min	94°C ► 1min	55°C ► 1min	72°C ► 2min	30	72°C ► 10min

Πρέπει να αναφερθεί ότι MLST πραγματοποιήθηκε μόνο σε στελέχη *S.aureus* καθώς κανένα από τα στελέχη *S.epidermidis* στην παρούσα μελέτη δεν έφερε κάποιο γονίδιο που κωδικοποιεί για τοξίνες. Επιπλέον, παρόλο που υπήρχε ανίχνευση γονιδίων ενδιαφέροντος σε στελέχη *S.haemolyticus*, *S.hominis* και *S.chromogenes* (στελέχη στα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί τυποποίηση μέσω της μεθόδου MLST) η εν λόγω μέθοδος πραγματοποιήθηκε μόνο σε στελέχη *S.aureus* λόγω της σημαντικής κλινικής σημασίας των στελεχών αυτών.

3.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μέθοδο που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση θραυσμάτων DNA. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από:

- το μέγεθος του DNA
- τη συγκέντρωση της αγαρόζης
- τη στερεοδιάταξη του DNA
- την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος.

Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA). Για τη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% με το οποίο ηλεκτροφορήθηκαν όλα τα προϊόντα της PCR. Για κάθε προϊόν PCR πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μετά την ενίσχυση του DNA του με PCR και μία μετά τον καθαρισμό του DNA. Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία αναλυτικά:

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H ₂ O για τις αραιώσεις)
10x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA)
Agarose SeaKem LE
Ethidium bromide (EtBr) solution 10 mg/ml
6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder
Λάμπα UV
Συσκευή ηλεκτροφόρησης
Τροφοδοτικό τάσης
Φούρνος μικροκυμάτων
Κωνική φιάλη 250 ml
Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μέθοδος ξεκινά με ανάμιξη 100 ml 1x TBE Buffer και 2 g αγαρόζης και προκύπτει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το διάλυμα αγαρόζης αναμειγνύεται με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει το διάλυμα διαυγές. Η θερμοκρασία κατεβαίνει περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο. Έπειτα, προστίθενται 2ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το διάλυμα έχει τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζει σε μήκος κύματος 290 nm. Το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στο εκμαγείο και αφού σταθεροποιηθεί είναι πλέον έτοιμο για την ηλεκτροφόρηση του DNA. Αυτό πραγματοποιείται με εμβάπτισή του σε διάλυμα 1x TBE Buffer της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, αναμειγνύονται 5µl από έκαστο δείγμα DNA με 2µl χρωστικής Loading Dye Solution (κυανό της βρωμοφαινόλης) και

ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πήκτωματος. Επίσης, χρησιμοποιείται ο 100bp DNA Ladder με σκοπό τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR, καθώς είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 120 Volts και ένταση 400 mA για 30 με 40 λεπτά. Τέλος, το πήκτωμα αγαρόζης που ηλεκτροφορήθηκε, τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.10 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Μετά την επιτυχή ενίσχυση των προϊόντων μέσω της PCR ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης, ώστε να απομακρυνθούν οι προσμίξεις της αντίδρασης. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να επακολουθήσει η αλληλούχισή τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA των σταφυλόκοκκων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

<u>ΥΛΙΚΑ</u>
Binding Buffer (B2/ B3)
Wash Buffer (W1)
Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (E1)
Στήλες φυγοκέντρησης με σωληνάρια συλλογής
Σωλήνες έκλουσης (1.7 ml)
Ισοπροπανόλη 100%
Αιθανόλη 96% - 100%
Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)
Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

1) Δέσμευση του DNA

Σε κάθε προϊόν PCR προστίθεται τετραπλάσιος όγκος αραιωμένου Binding Buffer (B2), σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος της PCR (το Binding Buffer B3 χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις όπου τα προϊόντα της PCR εμφάνιζαν μη ειδικές ζώνες (300bp και χαμηλότερες) στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης). Το μείγμα αναδεύεται καλά με αναρρόφηση. Έπειτα, μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink PCR, όπου το DNA δεσμεύεται στη στήλη, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και το διήθημα απορρίπτεται.

2) Καθαρισμός του DNA

Σε κάθε στήλη προστίθενται 650 μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash Buffer (W1). Το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 rpm), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Όλες οι στήλες τοποθετούνται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1.7 ml), ενώ οι προηγούμενοι σωλήνες συλλογής του διηθήματος απορρίπτονται.

3) Έκλυση του DNA

Προστίθενται 30-40μl Elution Buffer (E1) στο κέντρο κάθε στήλης προσεκτικά, ώστε η στήλη να διαβραχεί και κατόπιν να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από τη στήλη. φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις μέγιστες στροφές (13.000 rpm). Κάθε στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει πλέον το καθαρισμένο προϊόν της PCR, το οποίο και ηλεκτροφορείται επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ύπαρξη και τη ποιότητα του προϊόντος της PCR. Στο τέλος τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20oC μέχρι να αποσταλούν για αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

3.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ MLST (Sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για MLST του *S. aureus* πραγματοποιήθηκε σε ειδικό εξωτερικό εργαστήριο όπου αποστέλλονταν 30-40 μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20 μl από κάθε εκκινητή σε αραιώση 1 : 20 (συγκέντρωση 5

pmol/μl) για κάθε αντίδραση αλληλούχισης. Σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε και στις δύο έλικες των γονδιακών θραυσμάτων, δηλαδή από την 5' και από την 3' κατεύθυνση του προϊόντος ενίσχυσης, για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας των γονιδίων παρουσιάζεται με τη μορφή ενός ηλεκτροφερογράμματος (electropherogram), το οποίο αποτελείται από μία σειρά κορυφών. Κάθε κορυφή (peak) αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (A: Αδείνη, T: Θυμίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη) και εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το χρώμα φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, στο ηλεκτροφερόγραμμα αναπαρίσταται η ένταση των φθοριζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονδιακών θραυσμάτων, καθώς και η στοίχιση ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Mega 7.0. Η επεξεργασία αυτή καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώσιμες και συγκρίσιμες.

Μετά την επεξεργασία και τη μελέτη αλληλούχισης των νουκλεοτιδίων κατέστη πλέον γνωστή η ακριβής αλληλουχία καθενός από τα επτά διατηρημένα γονίδια του τυποποιημένου σχήματος της MLST για όλα τα στελέχη *S. aureus*. Στη συνέχεια, για τον καθορισμό των τύπων MLST οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες αναφοράς της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων της MLST και ανάλογα με τις διαφορές, τους αποδόθηκε ένας αριθμός αλληλόμορφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό αλληλικό προφίλ (allelic profile) για κάθε στέλεχος *S. aureus* και για κάθε μοναδικό συνδυασμό αποδόθηκε ένας αντίστοιχος αριθμός, ο οποίος αποτέλεσε τον τύπο αλληλουχίας (Sequence Type, ST) για κάθε στέλεχος. Μέσω της μεθόδου τυποποίησης MLST, η οποία κατέληξε στον καθορισμό του χαρακτηριστικού τους ST, τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν με αξιοπιστία και ακρίβεια. (80)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν συνολικά 122 σταφυλόκοκκοι και συγκεκριμένα τα 15 ήταν στελέχη *S. aureus* και 107 CoNS. Από τα στελέχη αυτά 67 προήλθαν από δείγματα γάλακτος ενώ 55 προήλθαν από αρμεκτικές μηχανές.

4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Με βάση το αυτοματοποιημένο σύστημα BD Phoenix™ έγινε η ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
<i>S. equorum</i>	23
<i>S. aureus</i>	15
<i>S. haemolyticus</i>	11
<i>S. simulans</i>	10
<i>S. capitis</i>	8
<i>S. warneri</i>	7
<i>S. xylosus</i>	7
<i>S. sciuri</i>	6
<i>S. saprophyticus</i>	6
<i>S. chromogenes</i>	5
<i>S. lentus</i>	5
<i>S. caprae</i>	2
<i>S. hominis</i>	2
<i>S. intermedius</i>	2
<i>S. pasteurii</i>	2
<i>S. auricularis</i>	2
<i>S. lugdunensis</i>	2
<i>S. vitulinus</i>	2
<i>S. kloosii</i>	1
<i>S. epidermidis</i>	1
<i>S. pettenkoferi</i>	1
<i>S. carnosus</i>	1
<i>S. gallinarum</i>	1

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΩΝ, ΕΠΙΔΕΡΜΟΛΥΤΙΚΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ, ΛΕΥΚΟΚΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΞΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΛΗΞΙΑΣ

Από τα 122 στελέχη σταφυλόκοκκων στα 32 εντοπίστηκαν τοξίνες, ενώ τα υπόλοιπα 90 ήταν αρνητικά για τις παραπάνω τοξίνες. Πιο συγκεκριμένα, οι τοξίνες εμφανίστηκαν σε 14 στελέχη *S. aureus*, σε 4 στελέχη *S. xylosus*, σε 3 στελέχη *S. sciuri*, σε 2 στελέχη *S. capitis*, *S. equorum*, *S. hominis* και σε 1 στέλεχος *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

<u>ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</u>	<u>ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</u>	<u>ΣΤΕΛΕΧΗ</u>	<u>ΤΟΞΙΝΕΣ</u>
5	151, 155, 160, 163, 1122	<i>S. aureus</i>	SEC
3	103, 122, 1046	<i>S. aureus</i>	SEB, SEO, SEM, SEI, SEU, SEN, SEG
2	31, 84	<i>S. aureus</i>	SEC, SEO, SEM, SEI, SEU, SEN, SEG
2	8, 107	<i>S. aureus</i>	TST, SEC
1	57	<i>S. aureus</i>	SEO, SEM
1	9	<i>S. aureus</i>	SHE
1	1004	<i>S. xylosus</i>	SEI
1	1022	<i>S. xylosus</i>	SER
1	1024	<i>S. xylosus</i>	SER, SEM
1	1033	<i>S. xylosus</i>	SEM
1	1025	<i>S. sciuri</i>	SEM, ETA
1	1032	<i>S. sciuri</i>	SEM
1	1035	<i>S. sciuri</i>	ETA
1	43	<i>S. capitis</i>	SEG
1	1150	<i>S. capitis</i>	SER
1	1017	<i>S. equorum</i>	SEO, SEG
1	1075	<i>S. equorum</i>	SER
1	60	<i>S. hominis</i>	SEP, SEG
1	56	<i>S. hominis</i>	SEP
1	1148	<i>S. caprae</i>	SER
1	1071	<i>S. chromogenes</i>	SEP
1	1021	<i>S. gallinarum</i>	SER
1	1147	<i>S. haemolyticus</i>	SER
1	35	<i>S. warneri</i>	SEG

4.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *S. AUREUS*

Η μέθοδος MLST πραγματοποιήθηκε για την μοριακή τυποποίηση των στελεχών *S. aureus* στα στελέχη στα οποία ανιχνεύθηκαν γονίδια τοξινών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αλληλούχισης προέκυψε ότι ο επικρατέστερος κλώνος είναι ο ST133, ο οποίος εμφανίζεται σε 7 από τα 14 στελέχη. Ο αμέσως επόμενος, σε συχνότητα εμφάνισης, είναι ο ST5 ο οποίος αντιστοιχεί σε 3 στελέχη. Επιπρόσθετα, ο ST47 εμφανίζεται σε 2 στελέχη, ενώ ο ST522 και το CC1 σε ένα στέλεχος *S. aureus* έκαστος. Όσο αφορά τις τοξίνες που παρήγαγαν τα στελέχη με τα συγκεκριμένα STs, αναφέρονται παρακάτω.

- 5 στελέχη με ST133: *sec*
- 2 στελέχη με ST133: *tst, sec*
- 3 στελέχη με ST5: *seb, seo, sem, sei, seu, sen, seg*
- 2 στελέχη με ST 47: *sec, seo, sem, sei, seu, sen, seg*
- 1 στέλεχος με ST522: *seo, sem*
- 1 στέλεχος με CC1: *seh*

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα βακτήρια του γένους σταφυλόκοκκου περιέχουν αρκετά είδη και υποείδη, τα οποία βρίσκονται διαδεδομένα σε φυσικά περιβάλλοντα και κυρίως στο δέρμα και σε βλεννογόνους του ανθρώπινου σώματος. (31) Τα πιο διαδεδομένα είδη σταφυλόκοκκων με αλφαβητική σειρά είναι τα εξής: *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. vitulinus*, *S. warneri*, *S. xylosus*. Τα περισσότερα από αυτά είναι κοαγκουλάση αρνητικά (CoNS), ενώ κάποια έχουν το ένζυμο της κοαγκουλάσης και θεωρούνται κοαγκουλάση θετικά (CoPS), με κυριότερο εκπρόσωπο τον *S. aureus*. Το είδος με τη μεγαλύτερα παθογένεια και ταυτόχρονα το πιο καλά μελετημένο είναι ο *S. aureus* και ακολουθεί ο *S. epidermidis*. (81) Οι σταφυλόκοκκοι έχουν βρεθεί τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ζώα και προκαλούν διάφορες ασθένειες, όπως τροφική δηλητηρίαση, δερματικές λοιμώξεις, βακτηριαμία, πνευμονία, ερυσίπελας, κυτταρίτιδα, το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποκόλλησης της επιδερμίδας (SSSS) και το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TSS). (82) Πολλές κλινικές οντότητες οφείλονται στην παραγωγή τοξινών που προκαλούν σοβαρά σύνδρομα. Οι τοξίνες αυτές, οι οποίες και αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία είναι οι εξής: οι εντεροτοξίνες (SEs), η λευκοκτονίνη (PVL), οι επιδερμολυτικές ή αποφολιδωτικές τοξίνες (ETA, ETB) και η τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST). (83)

Όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα, το 50% των στελεχών που βρέθηκε να φέρουν έστω μία τοξίνη είναι στελέχη *S.aureus*. Τα στελέχη *S.aureus* βρέθηκε να φέρουν διάφορες εντεροτοξίνες με κύρια την εμφάνιση της εντεροτοξίνης SEC καθώς ανιχνεύθηκε σε 7 από τα 14 στελέχη, ενώ ταυτόχρονα σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι κανένα από αυτά τα στελέχη δεν έφερε τα γονίδια *pvl*, *tst*, *eta* και *etb* που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες τοξίνες PVL, TST, ETA και ETB. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι ανάμεσα στα στελέχη *S.aureus* κυρίαρχος είναι ο κλώνος ST133, στον οποίον ανήκουν 7 από τα 14 στελέχη. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές ο εν λόγω κλώνος έχει απομονωθεί από διάφορα κτηνοτροφικά είδη (πρόβατα, κατσίκες, βοοειδή), ζώα συντροφιάς, καθώς και άγρια ζώα (λιοντάρια, αγριόχοιρους), με τα πρόβατα και τις κατσίκες να αποτελούν τον κύριο ξενιστή αυτών των στελεχών. (84) (85) Όσον αφορά την παρουσία τοξινών σε αυτά τα στελέχη παρόμοιες μελέτες δείχνουν ότι ο κλώνος ST133 έχει βρεθεί να φέρει τα γονίδια *sec* και *tst* τόσο μόνα τους όσο και σε διάφορους

συνδυασμούς με άλλες τοξίνες. Οι συνδυασμοί των εν λόγω τοξινών έχουν αναφερθεί σε κάποιες περιπτώσεις ως ένας από τους κυρίαρχους συνδυασμούς σε στελέχη που απομονώθηκαν τόσο από κατσίκες και πρόβατα όσο και από το γάλα τους, αλλά σε πολλές περιπτώσεις αναφέρεται και η παρουσία και κάποιας SE-like εντεροτοξίνης. (86) (87) (88) Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο συγκεκριμένος κλώνος για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι απομονώνεται μόνο από ζώα και δεν είχε αναφερθεί για την παρουσία του στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά έχουν υπάρξει περιπτώσεις απομονώσεων των εν λόγω στελεχών από υγιείς ανθρώπους. (89) (90)

Ο δεύτερος σε συχνότητα κλώνος των στελεχών *S.aureus* που έφεραν γονίδια τοξινών είναι ο κλώνος ST5 και αντιστοιχεί σε 3 από τα 14 στελέχη. Παρόμοιες μελέτες αναφέρουν την παρουσία του συγκεκριμένου κλώνου σε χοίρου, βοοειδή, πουλερικά, καθώς και σε ζώα συντροφιάς. (91) (92) (93) (94) Εκτός όμως από την εμφάνισή του στα ζώα, ο κλώνος ST5 εμφανίζεται και στους ανθρώπους και είναι υπεύθυνος για μεγάλο εύρος λοιμώξεων και ασθενειών με εμφάνιση σε πολλές χώρες στην Ευρώπη, την Αμερική, την Ασία και την Αυστραλία. (94) (95) (96) (97) Στην παρούσα μελέτη τα στελέχη *S.aureus* ST5 βρέθηκε να φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την κλασική εντεροτοξίνη B καθώς και το *egc-2* συμπλεγμα. Παρόμοιες αναφορές δείχνουν τον κλώνο αυτό να φέρει τα συγκεκριμένα γονίδια είτε με τον ίδιο συνδυασμό είτε με διαφορετικούς συνδυασμούς γονιδίων οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τις κλασικές ή/και τις SE-like εντεροτοξίνες. (98) Εκτός της παρουσίας των εντεροτοξινών, μελέτες έχουν αναφέρει και την παρουσία των τοξινών TSST-1 και PVL είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό με κάποια εντεροτοξίνη. (99) Είναι ιδιαίτερος σημαντικό να αναφερθεί ότι τα στελέχη MSSA ST5 αποτελούν προγονικό κλώνο από τον οποίον εξελίχθηκε ο επιδημικός κλώνος Νέας Υόρκης/ Ιαπωνίας (ST5-SCCmec II) και ο παιδιατρικός κλώνος (ST5-SCCmec IV). (100) (101)

Ένας ακόμη κλώνος που φαίνεται να φέρει γονίδια τοξινών ήταν και ο κλώνος ST47 στον οποίον ανήκουν 2 στελέχη *S.aureus* από την παρούσα μελέτη και στα οποία ανιχνεύθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την κλασική εντεροτοξίνη C μαζί με το *egc-2* σύμπλεγμα. Ο εν λόγω κλώνος έχει εμφανισθεί να φέρει γονίδια εντεροτοξινών, σε συνδυασμό με τις τοξίνες TSST-1, PVL και τις επιδερμολυτικές τοξίνες. (102) Ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί ότι συχνά τα στελέχη του κλώνου ST47 φέρουν κάποια παραλλαγή του συμπλέγματος *egc* είτε μόνο του είτε με την ταυτόχρονη παρουσία κάποιας άλλης τοξίνης. (103) Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο συγκεκριμένος κλώνος δεν εμφανίζεται συχνά σε μελέτες αν και έχει αναφερθεί τόσο για την παρουσία του στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. (104) (105)

Τέλος, υπάρχουν 2 στελέχη *S.aureus* που ανήκουν στον κλώνο ST522 και στον ST1 και φέρουν τα γονίδια *seo-sem* και *seh* αντίστοιχα. Αναφορές έχουν δείξει ότι ο κλώνος ST522 εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα σε στελέχη που απομονώνονται από πρόβατα και κατσίκες συγκριτικά με τα βοοειδή. (106) (107) Ωστόσο, τα γονίδια που κυριαρχούν σε αυτές τις μελέτες διαφέρουν από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Όσον αφορά το στέλεχος *S.aureus* που ανήκει στο ST1 και φέρει το γονίδιο *seh* παρόμοιες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία τόσο του εν λόγω γονιδίου όσο και άλλων τοξινών σε στελέχη αυτής της ομάδας. (108) (109)

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές τα στελέχη *S.aureus* σε μεγάλο ποσοστό φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν τοξίνες. Παρόλα αυτά, εκτός των στελεχών *S.aureus* που προαναφέρθηκαν, παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για τοξίνες παρατηρήθηκε και σε στελέχη CoNS. Στην παρούσα μελέτη ένα από τα είδη CoNS που ανιχνεύθηκε να φέρει τοξίνες ήταν τα στελέχη *S. xylosus* στα οποία αντιστοιχούν 4 από τα 18 στελέχη CoNS και στα οποία ανιχνεύθηκαν οι τοξίνες SEI, SEM, SER είτε μεμονωμένα είτε με κάποιον συνδυασμό. Αν και στελέχη *S.xylosus* έχουν αποτελέσει αίτιο μαστίτιδας σε ζώα, το εν λόγω είδος είναι μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα είδη χωρίς παθογένεια. (110) Σε παρόμοια έρευνα σε γάλα βοειδών εντοπίστηκαν οι εντεροτοξίνες SEA και SEC, όπως και η TSST-1, καθώς και οι SE-like εντεροτοξίνες έχουν εντοπισθεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από προϊόντα σχετιζόμενα με φαγητό, ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί και η παρουσία των επιδερμολυτικών τοξινών. (111) (112)

Το αμέσως επόμενο σε συχνότητα είδος που βρέθηκε να φέρει γονίδια τοξινών ήταν ο *S.sciuri* στον οποίο αντιστοιχούν 3 στελέχη και στα οποία ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *sem* και *eta* είτε σε συνδυασμό είτε μεμονωμένα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε κανένα άλλο είδος της παρούσας μελέτης δεν ανιχνεύθηκε κάποια επιδερμολυτική τοξίνη. Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει βρεθεί σε ζώα συντροφιάς και άγρια ζώα καθώς και στον άνθρωπο τόσο σε νοσοκομειακές περιπτώσεις όσο και σε περιπτώσεις φορέας. (113) (114) Αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχουν λίγες μελέτες στις οποίες να πραγματοποιείται αναζήτηση των λοιμογόνων παραγόντων στα εν λόγω στελέχη και για αυτό ορισμένοι ερευνητές υποθέτουν ότι είναι μειωμένη η πιθανότητα παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για τοξίνες. (115) Παρόλα αυτά έχει υπάρξει αναφορά για την παρουσία τοξίνης (SEA, SEE) σε στελέχη *S.sciuri* προερχόμενα από φαγητό. (116) (117) (111)

Στην παρούσα μελέτη 2 στελέχη *S. hominis*, *S.capitis* και *S. equorum* έκαστος ανιχνεύθηκαν να φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν για τοξίνες. Συγκεκριμένα στα στελέχη *S. hominis* ανιχνεύθηκαν οι τοξίνες SEP-SEG και SEP. Αν και το είδος αυτό είναι μέρος της φυσιολογικής

χλωρίδας, έχει εμφανισθεί και σε καταστάσεις παθογένειας καθώς έχει βρεί σε περιπτώσεις σήψης σε νεογνά. (118) Σε παρόμοιες αναφορές που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα από γάλα βοοειδών, τα στελέχη *S. hominis* παρήγαγαν τοξίνες SEA, SEC και SEE ενώ παρουσία τοξινών έχει βρεθεί και σε στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους. (111) (119)

Επιπλέον, στα στελέχη *S. capitis* που εξετάστηκαν βρέθηκαν οι εντεροτοξίνες SEG και SER. Το είδος αυτό, όπως και ο *S. hominis*, αν και αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο έχει συσχετισθεί με περιπτώσεις σήψης σε νεογνα, ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί και σε περιπτώσεις μηνιγγιτίδας. (120) Στελέχη αυτού του είδους έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα και παρόλο που έχει βρεθεί ότι παράγουν εντεροτοξίνες δεν φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την πρόκληση τροφικής δημητηρίασης. (121) Παρόμοιες μελέτες έχουν αναφέρει την παρουσία στελεχών *S. capitis* που παράγουν εντεροτοξίνες. (111)

Παρότι στην παρούσα εργασία το είδος που απομονώθηκε περισσότερο ήταν ο *S. equorum* (23 από τα 122) μόνο 2 από τα 23 στελέχη έφεραν γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες, καθώς ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *seo-seg-ser* και *ser*. Το συγκεκριμένο είδος έχει απομονωθεί από υγιή ζώα καθώς και τρόφιμα που βρίσκονται στην φάση της ωρίμανσης, αν και η κύρια ανησυχία είναι αν αποτελούν αίτιο μαστίτιδας στα ζώα. (122) Σε παρόμοιες μελέτες τροφίμων έχει αναφερθεί η παρουσία γονιδίων τοξινών καθώς βρέθηκε ο *S. equorum* ότι παρήγαγε τόσο κλασικές και SE-like εντεροτοξίνες όσο και επιδερμολυτικές τοξίνες. (116) (123)

Ακόμα, στην παρούσα εργασία βρέθηκε 1 στέλεχος *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. chromogenes* και *S. gallinarum* έκαστος, καθένα από τα οποία έφερε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί εντεροτοξίνη. Συγκεκριμένα, υπήρχε ένα στέλεχος *S. haemolyticus*, το οποίο παρήγαγε εντεροτοξίνη SER, ενώ ταυτόχρονα έχουν υπάρξει αναφορές για παραγωγή διαφόρων εντεροτοξινών, είτε μεμονωμένων είτε σε συνδυασμό από στελέχη *S. haemolyticus* που απομονώθηκαν από γάλα βοοειδών. (111) (124) Επιπρόσθετα, το υπό μελέτη στέλεχος *S. warneri* παρήγαγε την SEG τοξίνη, ενώ στη βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι στελέχη *S. warneri* προερχόμενα από γάλα βοοειδών, αλλά και από προϊόντα κρέατος και γάλακτος παρήγαγε την εντεροτοξίνη SEC. (111) (116)

Τέλος, ένα στέλεχος *S. caprae* βρέθηκε να φέρει το γονίδιο *ser*. Το στέλεχος αυτό θεωρείται ένα από τα πρωταρχικά παθογόνα των ζώων αν και έχει βρεθεί και σε περιπτώσεις λοιμώξεων και σήψης. (125) Έχουν υπάρξει και άλλες αναφορές παραγωγής τόσο εντεροτοξινών όσο και της TSST-1. (125) (126) Ένα στέλεχος *S. chromogenes* βρέθηκε να παράγει την τοξίνη SEP ενώ παρόμοιες αναφορές έχουν δείξει ότι τα στελέχη αυτά μπορούν να φέρουν και γονίδια άλλων

εντεροτοξινών. (111) Τέλος, ο *S. gallinarum* που βρέθηκε στη συγκεκριμένη εργασία παρήγαγε την εντεροτοξίνη SER, ενώ σε παρόμοιες μελέτες από δείγματα προερχόμενα από προϊόντα κρέατος και γάλακτος ο *S. gallinarum* έφερε το γονίδιο που κωδικοποιούσε την τοξίνη SEC. (116)

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι ο *S. epidermidis* βρέθηκε σε ένα μόνο δείγμα και δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο παραγωγής τοξινών, παρόλο που σε παρόμοια μελέτη με δείγματα γάλακτος απομονώθηκαν στελέχη του *S. epidermidis*, τα οποία έφεραν γονίδια που κωδικοποιούν για εντεροτοξίνες. (127) Παρότι ότι ο *S. simulans* θεωρείται ότι είχε τα υψηλότερα ποσοστά παραγωγής εντεροτοξινών, στη δική μας εργασία δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος *S. simulans* να φέρει γονίδια που κωδικοποιούν για τοξίνες. (128) (129) (130)

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λόγω της ιδιαίτερης κλινικής σημασίας που εμφανίζουν τα στελέχη *S.aureus* οι μελέτες που επικεντρώνονται στην παρουσία/απουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν για τοξίνες είναι ιδιαίτερος εκτεταμένες. Από την άλλη παρά την αυξανόμενη σημασία που εμφανίζουν κάποια στελέχη CoNS τόσο σε περιπτώσεις λομώξεων ζώων όσο και ανθρώπων, οι μελέτες που επικεντρώνονται στην ανίχνευση λοιμογόνων παραγόντων είναι περιορισμένες, κυρίως όσα αφορούν διατροφή (πρωτογενή ή δευτερογενή). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τοξίνες βρίσκονται συχνά σε κινητά γενετικά στοιχεία υπάρχει ο κίνδυνος τα γονίδια αυτά να μεταφέρονται μεταξύ των διαφόρων ειδών σταφυλόκοκκων, κάτι που αποδεικνύεται τόσο από την παρούσα μελέτη όσο και από τις βιβλιογραφικές αναφορές. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η δυνατότητα ανίχνευσης γονιδίων που κωδικοποιούν τοξίνες. Δεδομένου ότι οι τοξίνες δεν καταστρέφονται με τη συνήθη παστερίωση, η οποία εφαρμόζεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, η παρουσία τους στα τρόφιμα μπορεί να σχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις. Η δυνατότητα ανίχνευσης γονιδίων που κωδικοποιούν τοξίνες εξασφαλίζει ασφάλεια στα τρόφιμα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gherardi G, Di Bonaventura G, Savini V. Chapter 1 - Staphylococcal Taxonomy. In: Savini V, editor. Pet-To-Man Travelling Staphylococci [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2020 Oct 10]. p. 1–10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128135471000017>
2. Orenstein A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. :2.
3. Todar K, Bacteriology PU of WD of. *Staphylococcus*. 2015 Aug 6 [cited 2020 Oct 10]; Available from: <http://metabase.uaem.mx/xmlui/handle/123456789/1239>
4. Coagulase-Negative Staphylococci | Clinical Microbiology Reviews [Internet]. [cited 2020 Oct 8]. Available from: <https://cmr.asm.org/content/27/4/870>
5. A Brief History of Staph | Proto Magazine [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <http://protomag.com/articles/a-brief-history-of-staph>
6. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on | Microbiology Society [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002786>
7. Rossi CC, Pereira MF, Giambiagi-deMarval M, Rossi CC, Pereira MF, Giambiagi-deMarval M. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 10];43(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415-47572020000300303&lng=en&nrm=iso&tlng=en
8. Sneath PHA, McGOWAN V, Skerman VBD. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1980 Jan 1;30(1):225–420.
9. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains | Journal of Clinical Microbiology [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://jcm.asm.org/content/45/9/2770.short>
10. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance - Ross Fitzgerald - 2009 - Veterinary Dermatology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2009.00828.x>
11. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis | Microbiology Society [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.028365-0>
12. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP | Request PDF [Internet]. [cited 2020 Oct 11]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/7251762_Clinical_characteristics_and_persistence_of_bovine_mastitis_caused_by_different_species_of_coagulase-negative_staphylococci_identified_with_API_or_AFLP

13. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47572020000300303&script=sci_arttext
14. *Staphylococcus pseudintermedius* Devriese et al., 2005 [Internet]. [cited 2020 Oct 11]. Available from: <https://www.gbif.org/species/111217737>
15. *Staphylococcus nepalensis* Spargser et al., 2003 [Internet]. [cited 2020 Oct 11]. Available from: <https://www.gbif.org/uk/species/3227674>
16. Hauschild T, Stepanović S, Zakrzewska-Czerwinska J. *Staphylococcus stepanovicii* sp nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst Appl Microbiol*. 2010 Apr 1;33:183–7.
17. Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2020 Oct 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
18. The Genera *Staphylococcus* and *Macrocooccus* [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120318/>
19. 22A: Identification of *Staphylococcus* Species - Biology LibreTexts [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/22A%3A_Identification_of_Staphylococcus_Species
20. *Staphylococcus aureus* [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
21. Ja L. *Staphylococci: Evolving Genomes*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Oct 10];7(6). Available from: <https://europepmc.org/article/med/31845645>
22. Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V, Palsson BØ. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jun 28;113(26):E3801–9.
23. Shittu AO, Udo EE, Lin J. Insights on Virulence and Antibiotic Resistance: A Review of the Accessory Genome of *Staphylococcus aureus*. *Wounds Compend Clin Res Pract*. 2007 Sep;19(9):237–44.
24. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Sep;67(18):3057–71.
25. Stephens AJ. The development of rapid genotyping methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [Internet] [phd]. Queensland University of Technology; 2008 [cited 2020 Oct 11]. Available from: <https://eprints.qut.edu.au/20172/>
26. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* from Blood Stream Infections: Frequency of Occurrence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular (*mecA*) Characterization of Oxacillin Resistance in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Mar 1;30(3):205–14.
27. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):870–926.

28. Staphylococcus aureus Characteristics - Gram Positive Cocci - Microbiology for Medicine [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: https://www.picmonic.com/pathways/medicine/courses/standard/microbiology-202/gram-positive-cocci-1158/staphylococcus-aureus-characteristics_325
29. Surface Proteins of Staphylococcus aureus | IntechOpen [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/the-rise-of-virulence-and-antibiotic-resistance-in-staphylococcus-aureus/surface-proteins-of-staphylococcus-aureus>
30. Aryal S. Coagulase Test- Principle, Procedure, Types, Interpretation and Examples [Internet]. Microbiology Info.com. 2015 [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://microbiologyinfo.com/coagulase-test-principal-procedure-types-interpretation-and-examples/>
31. Toxigenicity in Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects - Cunha, R.A.O. Calsolari, 2008 [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.4137/MBI.S796>
32. Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. Toxins. 2016 Mar;8(3):72.
33. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6671284/>
34. Wiseman GM. The hemolysins of Staphylococcus aureus. Bacteriol Rev. 1975 Dec;39(4):317–44.
35. Divyakolu S, Chikkala R, Ratnakar K, Sritharan V. Hemolysins of Staphylococcus aureus —An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. Adv Infect Dis. 2019 Jan 1;09:80–104.
36. Frontiers | Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? | Cellular and Infection Microbiology [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2012.00012/full>
37. Wiseman M. The Hemolysins of Staphylococcus aureus GORDON [Internet]. [cited 2020 Oct 11]. Available from: </paper/The-Hemolysins-of-Staphylococcus-aureus-GORDON-Wiseman/08dc4243a3066d4427d6925021e1d97a5526afa4>
38. Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000715>
39. Panton-Valentine Leukocidin [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <http://www.do-super.com.tw/h04c.files/history/PVL-S-aureus.asp>
40. Frontiers | Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical Staphylococcus aureus in an Urban Gambian Hospital: A 11-Year Period Retrospective Pilot Study | Cellular and Infection Microbiology [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00170/full>
41. Mariutti RB, Tartaglia NR, Seyffert N, Castro TL de P, Arni RK, Azevedo VA, et al. Exfoliative Toxins of Staphylococcus aureus. Rise Virulence Antibiot Resist IStaphylococcus Aureusi [Internet]. 2017 Mar 8 [cited 2020 Oct 10]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/the-rise-of-virulence-and-antibiotic-resistance-in-staphylococcus-aureus/exfoliative-toxins-of-staphylococcus-aureus>

42. Mohseni M, Rafiei F, Ghaemi EA. High frequency of exfoliative toxin genes among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in the north of Iran: Alarm for the health of individuals under risk. *Iran J Microbiol.* 2018 Jun;10(3):158–65.
43. Que Y-A, Moreillon P. 196 - *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* [Internet]. Philadelphia: Content Repository Only!; 2015 [cited 2020 Oct 10]. p. 2237-2271.e5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145574801300196X>
44. Valle J, Vadillo S, Piriz S, Gomez-Lucia E. Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Mar;57(3):889–91.
45. Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA. Distribution of *tsst-1* and *mecA* Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Specimens [Internet]. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2016 [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://sites.kowsarpub.com/jjm/articles/56605.html>
46. Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element | PNAS [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.pnas.org/content/81/16/5179>
47. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis.* 2004 Jun 15;189(12):2334–6.
48. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins.* 2010 Aug 18;2(8):2177–97.
49. FRIES BC, VARSHNEY AK. Bacterial Toxins—Staphylococcal Enterotoxin B. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2013 Dec [cited 2020 Oct 12];1(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5086421/>
50. Effective Treatment of Staphylococcal Enterotoxin B Aerosol Intoxication in Rhesus Macaques by Using Two Parenterally Administered High-Affinity Monoclonal Antibodies | Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://aac.asm.org/content/63/5/e02049-18>
51. Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Luper M, Davis WC, Bohach GA. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4254–62.
52. Structure of Staphylococcal Enterotoxin E in Complex with TCR Defines the Role of TCR Loop Positioning in Superantigen Recognition [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492778/>
53. (PDF) Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266476454_Staphylococcal_enterotoxins_Molecular_aspects_and_detection_methods
54. Staphylococcal Enterotoxins [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153290/>
55. *Staphylococcus aureus* harbouring *egc* cluster coding for non-classical enterotoxins, involved in a food poisoning outbreak, Romania, 2012 / *Staphylococcus aureus* purtător de gene codante pentru enterotoxine non-clasice (cluster *egc*), implicat într-un focar de toxiinfecție alimentară, România,

- 2012 in: *Revista Romana de Medicina de Laborator* Volume 23 Issue 3 (2015) [Internet]. [cited 2020 Oct 13]. Available from: <https://content.sciendo.com/view/journals/rrlm/23/3/article-p285.xml>
56. Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieu K, Etienne J, et al. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. *Infect Immun*. 2006 Aug;74(8):4724–34.
 57. Fueyo JM, Mendoza MC, Alvarez MA, Martín MC. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Feb 1;243(2):447–54.
 58. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, et al. egc, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):669–77.
 59. Coagulase Negative Staphylococci - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/coagulase-negative-staphylococci>
 60. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms | IntechOpen [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/microbial-biofilms-importance-and-applications/staphylococcal-biofilms-pathogenicity-mechanism-and-regulation-of-biofilm-formation-by-quorum-sensin>
 61. Coagulase Negative Staphylococci - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/coagulase-negative-staphylococci>
 62. Chapter 43. Coagulase-Negative Staphylococci and Their Role in Infection | Request PDF [Internet]. [cited 2020 Oct 11]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/282594473_Chapter_43_Coagulase-Negative_Staphylococci_and_Their_Role_in_Infection
 63. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*. 2010 Apr;5(2):183–95.
 64. Lu Y, Lu Q, Cheng Y, Wen G, Luo Q, Shao H, et al. High concentration of coagulase-negative staphylococci carriage among bioaerosols of henhouses in Central China. *BMC Microbiol*. 2020 Jan 28;20(1):21.
 65. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871281/>
 66. Deyno S, Fekadu S, Astatkie A. Resistance of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial agents in Ethiopia: a meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Aug 23;6(1):85.
 67. Kateete DP, Bwanga F, Seni J, Mayanja R, Kigozi E, Mujuni B, et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Jun 3;8(1):94.
 68. Multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci in food animals - Bhargava - 2012 - *Journal of Applied Microbiology* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05410.x>

69. Guidi F, Duranti A, Gallina S, Nia Y, Petruzzelli A, Romano A, et al. Characterization of A Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in A Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. *Toxins* [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2020 Oct 10];10(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315814/>
70. CDC. Staphylococcal Food Poisoning [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2018 [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>
71. Staph Food Poisoning | Michigan Medicine [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://www.uofmhealth.org/health-library/te6322spec>
72. Ercoli L, Gallina S, Nia Y, Auvray F, Primavilla S, Guidi F, et al. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jul 1;14(7):407–13.
73. Hait J, Tallent S, Melka D, Keys C, Bennett R. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. *J Appl Microbiol.* 2014;117(3):866–75.
74. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 70: 631-641. *Infect Immun.* 2002 Mar 1;70:631–41.
75. Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Wang X, Gialanella P, et al. Diverse Enterotoxin Gene Profiles among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates from the Bronx, New York. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Nov;75(21):6839–49.
76. Rajkovic A, Jovanovic J, Monteiro S, Decler M, Andjelkovic M, Foubert A, et al. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(4):1605–57.
77. Hait J, Tallent S, Melka D, Keys C, Bennett R. *Staphylococcus aureus* Outbreak Investigation of an Illinois Bakery. *J Food Saf.* 2012;32(4):435–44.
78. Nashev D, Toshkova K, Bizeva L, Akineden Ö, Lämmler C, Zschöck M. Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.* 2007;45(6):681–5.
79. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar 1;38(3):1008–15.
80. (PDF) Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 70: 631-641 [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/11561478_Jarraud_S_Mougél_C_Thioulouse_J_Lina_G_Meugnier_H_Forey_F_Nesme_X_Etienne_J_Vandenesch_F_Relationships_between_Staphylococcus_aureus_genetic_background_virulence_factors_agr_groups_alleles_and_human_d
81. *Staphylococcus* - microbewiki [Internet]. [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus>

82. Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 10];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00052/abstract>
83. Aryal S. Virulence Factors of Staphylococcus [Internet]. *Microbiology Info.com*. 2016 [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://microbiologyinfo.com/virulence-factors-of-staphylococcus/>
84. Eriksson J, Espinosa-Gongora C, Stamphøj I, Larsen AR, Guardabassi L. Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in Danish small ruminants. *Vet Microbiol*. 2013 Apr 12;163(1–2):110–5.
85. Gharsa H, Ben Slama K, Gómez-Sanz E, Lozano C, Zarazaga M, Messadi L, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from nasal samples of healthy farm animals and pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis* Larchmt N. 2015 Feb;15(2):109–15.
86. Mørk T, Kvitle B, Mathisen T, Jørgensen HJ. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Vet Microbiol*. 2010 Feb 24;141(1–2):134–41.
87. Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol*. 2004 Jun 21;101(2):101–7.
88. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia | *BMC Microbiology* | Full Text [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0789-1>
89. Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, et al. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2009 Oct;58(Pt 10):1343–53.
90. Benito D, Lozano C, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Detection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 Strains in Gut Microbiota of Healthy Humans in Spain. *Microb Ecol*. 2013 Jul 1;66(1):105–11.
91. Butaye P, Argudín MA, Smith TC. Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2016 Mar 1;3(1):19–31.
92. McMillan K, Moore SC, McAuley CM, Fegan N, Fox EM. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 29 [cited 2020 Oct 12];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4966798/>
93. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol*. 2003 Jun;185(11):3307–16.
94. Petinaki E, Spiliopoulou I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul;18(7):626–34.
95. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Healthy Pig Farmers, Human Controls, and Pigs. *Emerg Infect Dis*. 2005 May;11(5):711–4.
96. Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol*. 2009 Feb 16;134(1–2):29–36.

97. PubMLST - Public databases for molecular typing and microbial genome diversity [Internet]. PubMLST. [cited 2020 Oct 13]. Available from: <https://pubmlst.org/>
98. Argudín MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR. Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. *Microb Pathog*. 2013 Jan 1;54:26–33.
99. Lee HK, Kim J-B, Kim H, Jekarl DW, Kim YR, Yu JK, et al. Clonal spread of catalase-negative ST5/SCCmec II *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal enterotoxin A (sea), staphylococcal enterotoxin b (seb), and toxic shock toxin (tst) virulence genes. *Ann Clin Lab Sci*. 2014;44(4):394–8.
100. Dabul ANG, Camargo ILBC. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. *FEMS Microbiol Lett*. 2014 Feb;351(1):7–8.
101. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003 Aug;9(8):978–84.
102. Ma A, Mc M, Fj M, Mc M, B G, Mr R. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol*. 2009 May 20;47(7):2097–105.
103. Wehrhahn MC, Robinson JO, Pascoe EM, Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, et al. Illness Severity in Community-Onset Invasive *Staphylococcus aureus* Infection and the Presence of Virulence Genes. *J Infect Dis*. 2012 Jun 15;205(12):1840–8.
104. [PDF] An investigation of the occurrence of antibiotic resistance genes among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from animals and their relationship to human strains of *Staphylococcus aureus* | Semantic Scholar [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/An-investigation-of-the-occurrence-of-antibiotic-of-Robb/0e75b1d21e7014d114f9e54ae4fd600441365982>
105. Search by locus combinations [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: https://pubmlst.org/bigbdb?db=pubmlst_saureus_isolates&page=profiles
106. Porrero MC, Hasman H, Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Domínguez L, Aarestrup FM. Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small ruminants goats and sheep. *Vet Microbiol*. 2012 Apr 23;156(1–2):157–61.
107. Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol*. 2015 Mar 23;176(1–2):143–54.
108. Gharsa H, Ben Sallem R, Ben Slama K, Gómez-Sanz E, Lozano C, Jouini A, et al. High diversity of genetic lineages and virulence genes in nasal *Staphylococcus aureus* isolates from donkeys destined to food consumption in Tunisia with predominance of the ruminant associated CC133 lineage. *BMC Vet Res*. 2012 Oct 29;8:203.
109. Zhou Z, Zhang M, Li H, Yang H, Li X, Song X, et al. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goats in Chongqing, China. *BMC Vet Res* [Internet]. 2017 Nov 25 [cited 2020 Oct 12];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702051/>

110. Władyka B, Bonar E. Chapter 21 - Application of Staphylococci in the Food Industry and Biotechnology. In: Savini V, editor. Pet-To-Man Travelling Staphylococci [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2020 Oct 12]. p. 281–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128135471000212>
111. Bertelloni F, Fratini F, Ebani VV, Galiero A, Turchi B, Cerri D. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. *Dairy Sci Technol*. 2015 May 1;95(3):341–52.
112. Fijałkowski K, Struk M, Karakulska J, Paszkowska A, Giedrys-Kalemba S, Masiuk H, et al. Comparative analysis of superantigen genes in *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* isolates collected from a single mammary quarter of cows with mastitis. *J Microbiol*. 2014 May 1;52(5):366–72.
113. Staphylococci in healthy and diseased animals - Devriese - 1990 - Journal of Applied Bacteriology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01799.x>
114. Characteristics of staphylococci isolated from man, poultry and some other animals - Adegoke - 1986 - Journal of Applied Bacteriology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1986.tb03365.x>
115. Isolation of Members of the *Staphylococcus sciuri* Group from Urine and Their Relationship to Urinary Tract Infections | Journal of Clinical Microbiology [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://jcm.asm.org/content/41/11/5262>
116. HOVEIDA L, ATA EI B, AMIRMOZAFARI N, NOORMOHAMMADI Z. Species Variety, Antibiotic Susceptibility Patterns and Prevalence of Enterotoxin Genes in Staphylococci Isolated from Foodstuff in Central Iran. *Iran J Public Health*. 2020 Jan;49(1):96–103.
117. Safety Evaluation of the Coagulase-Negative Staphylococci Microbiota of Salami: Superantigenic Toxin Production and Antimicrobial Resistance [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/483548/#abstract>
118. Neonatal Meningitis - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/neonatal-meningitis>
119. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil - Vasconcelos - 2011 - Journal of Applied Microbiology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.05076.x>
120. Frontiers | Insights on virulence from the complete genome of *Staphylococcus capitis* | Microbiology [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00980/full>
121. Leroy S, Vermassen A, Talon R. *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2016 [cited 2020 Oct 12]. p. 140–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472006565>

122. Jeong D-W, Heo S, Ryu S, Blom J, Lee J-H. Genomic insights into the virulence and salt tolerance of *Staphylococcus equorum*. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jul 14 [cited 2020 Oct 12];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5511256/>
123. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures - PubMed [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18752861/>
124. Pinheiro L, Brito CI, De Oliveira A, Martins PYF, Pereira VC, Da Cunha MDLR de S. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. *Toxins*. 2015 Sep;7(9):3688–99.
125. Weir D, Jones C, Ammerman L, Dybdahl K, Tomlinson S. Report of a Strain of *Staphylococcus caprae* with the Genes for Enterotoxin A and Enterotoxin-Like Toxin Type P. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct;45(10):3476–7.
126. Hilliard CA, El Masri J, Goto M. *Staphylococcus caprae* bacteraemia and native bone infection complicated by therapeutic failure and elevated MIC: a case report. *JMM Case Rep* [Internet]. 2017 Sep 18 [cited 2020 Oct 13];4(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5643001/>
127. Cunha M de LR de S da, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz J Microbiol*. 2006 Mar;37(1):70–4.
128. Ünal N, Çinar OD. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod*. 2012 Feb 1;44(2):369–75.
129. Gómez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M, et al. Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environ Pollut*. 2016 May 1;212:71–6.
130. Μαντις) AJM (α Ι, Παπαγεωργίου) DKP (δ Κ. Conditions of staphylococcal enterotoxin production in milk and milk products. *J Hell Vet Med Soc*. 2003;54(3):242–52.