



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αν. Καθηγήτρια Ευθυμία Πετεινάκη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΧΡΥΣΙΖΟΝΤΑ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟ ΖΩΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ**

ΣΤΥΛΙΑΝΗ Χ. ΣΑΡΡΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

Λάρισα, 2016

© 2016 Στυλιανή Σάρρου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (N. 5343/32 απ 202 παρ. 2).

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

«ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΧΡΥΣΙΖΟΝΤΑ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟ ΖΩΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ»

ΣΤΥΛΙΑΝΗ Χ. ΣΑΡΡΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Ευθυμία Πετεινάκη** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2. Ίρις Σπηλιοπούλου - Σδούγκου** Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρων
- 3. Χαράλαμπος Μπιλλίνης** Καθηγητής Ιολογίας – Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- | | |
|---|--|
| 1^{ος} Εξεταστής
(επιβλέπουσα) | Ευθυμία Πετεινάκη,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 2^{ος} Εξεταστής | Ίρις Σπηλιοπούλου - Σδούγκου
Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Πατρων |
| 3^{ος} Εξεταστής | Χαράλαμπος Μπιλλίνης
Καθηγητής Ιολογίας - Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα
Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 4^{ος} Εξεταστής | Γεώργιος Φθενάκης
Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της αναπαραγωγής των
ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 5^{ος} Εξεταστής | Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 6^{ος} Εξεταστής | Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 7^{ος} Εξεταστής | Γεώργιος Σίμος
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ.....	12
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ.....	12
1.2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	12
1.3 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ <i>S. AUREUS</i> ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΖΩΑ.....	13
1.4 ΦΟΡΕΙΑ <i>S. AUREUS</i>	15
1.5 ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	17
1.5.1 β- λακταμικά αντιβιοτικά.....	19
1.5.2 Τετρακυκλίνες.....	21
1.5.3 Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη B(<i>MLS_B</i>).....	22
1.5.4 Αμινογλυκοσίδες.....	24
1.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>S. AUREUS</i>	24
1.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE</i>).....	25
1.6.2 Τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (<i>Multilocus Sequence Typing, MLST</i>).....	26
1.6.3. Τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης A (<i>spa-typing</i>)....	28
1.6.4. Τυποποίηση ρυθμιστικού συστήματος (<i>accessory gene regulator, agr</i>).....	28
1.6.5. Τυποποίηση βάσει σταφυλοκοκκικής χρωμοσωμικής κασέτας <i>mec</i> (<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec, Scmec</i>).....	29
1.7. ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>S. AUREUS</i> : HOSPITAL-ASSOCIATED, HA; COMMUNITY-ASSOCIATED, CA; LIVESTOCK-ASSOCIATED, LA.....	30
1.7.1 <i>Hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, HA-MRSA</i>	32
1.7.2 <i>Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, CA-MRSA</i>	35
1.7.3 <i>Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, LA-MRSA</i>	39
ΣΚΟΠΟΣ.....	45
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
I. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	47
2.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	47
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	47
2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΩΣ <i>S. AUREUS</i>	48
2.3.1 Χρώση κατά Gram.....	48
2.3.2 Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης.....	49
2.3.3 Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης.....	50
2.3.4 Ταυτοποίηση με το αυτοματοποιημένο σύστημα <i>Vitek 2 (bioMérieux)</i>	52
2.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	52
2.4.1 Έλεγχος ευαισθησία με το αυτοματοποιημένο σύστημα <i>Vitek-2</i>	52
2.4.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων.....	53
II. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
2.4.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα.....	57
2.4.5 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA υψηλής ποιότητας.....	58
2.4.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.....	59
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	61
2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	64
2.6.1 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στη μεθικιλίνη.....	64
2.6.2 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή σε Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη B (<i>MLS_B</i>).....	65
2.6.3 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στην τετρακυκλίνη.....	67
2.7 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	67
2.7.1 Τυποποίηση βάσει <i>Multi Locus Sequence Typing, (MLST)</i>	67
2.7.2 Τυποποίηση βάσει του γονιδίου της <i>Staphylococcus protein A (spa typing)</i>	69

2.7.3	Τυποποίηση κατά <i>agr</i>	70
2.7.4	Διάκριση προέλευσης στελεχών <i>CC398</i>	70
2.8	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>ANTOXHΣ</i>	73
2.8.1	Χαρακτηριστικά του στελέχους <i>LAR2682</i>	73
2.8.2	Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	73
2.8.2.2	Κατκρήμνηση των πέψων	75
2.8.2.3	Ηλεκτροφόρηση πέψων	75
2.8.2.4	Απομόνωση DNA από πήκτωμαγαράζης (<i>Purelink Quick gel extraction kit, ThermoFisher SCIENTIFIC</i>).....	77
2.8.3	Ανάλυση κατά <i>Southern</i>	78
2.8.3.1	Σήμανση ανιχνευτών	78
2.8.3.2	Μεταφορά σε Νάilon Μεμβράνη	80
2.8.3.3	Υβριδοποίηση του Σημασμένου Ανιχνευτή.....	82
2.8.3.4	Ανίχνευση σήματος.....	83
2.8.4	Κλωνοποίηση.....	85
2.8.4.1	Επιλογή πλασμιδιακού φορέα.....	85
2.8.4.2	Σύνδεση DNA στο φορέα, αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA.....	86
2.8.4.3	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.....	87
2.8.4.3.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση	87
2.8.4.3.2	Μετασηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση	89
2.8.4.4	Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων	90
2.8.5	Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης (<i>Library screening</i>)	90
2.8.6	Ανάλυση αλληλουχίας DNA (<i>Sequencing</i>).....	93
2.8.7	Σύγκριση Αλληλουχιών DNA	94
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96
3.1	ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ- ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	96
3.1.1	ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	96
3.1.2	ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	97
3.2	ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ	97
3.2.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	97
3.2.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΖΩΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	100
3.3.	ΓΟΝΙΔΙΑ <i>ANTOXHΣ</i> ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ (<i>METHICILLIN- MLS_B ANTIBIOTIKA</i>).....	100
3.4.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>S. AUREUS</i>	102
3.5.	ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΑΛΛΗΛΙΟΥ <i>ARO</i>	102
3.6.	ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΛΩΝΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ <i>CC398</i>	104
3.6.1.	Μοριακή τυποποίηση στελεχών <i>CC398</i>	104
3.6.2.	Δημογραφικά στοιχεία στελεχών που ανήκουν στο <i>CC398</i>	105
3.6.3.	Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά στελεχών <i>CC398</i>	106
3.6.4.	Έλεγχος γονιδίων αντοχής στελεχών <i>CC398</i>	107
3.6.5.	Προέλευση στελεχών (ανθρώπινος – ζωικός κλάδος).....	108
3.6.6.	Πίνακας στελεχών κλωνικού συμπλέγματος <i>CC398</i>	109
3.7.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>lnu(B)</i>	111
3.7.1.	Απομόνωση και ποσοτικοποίηση DNA (πρωτόκολλο <i>Gram</i> θετικών κόκκων).....	111
3.7.2	Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	112
3.7.3	Αποτελέσματα υβριδισμού	112
3.7.4	Υβριδισμός κατά <i>Southern</i>	113
3.7.5	Κλωνοποίηση γενετικού περιβάλλοντος γονιδίου <i>lnu(B)</i> [Δημιουργία αντίγραφων αποικιών και ανίχνευση κλώνων].....	114
3.7.6	Αλληλούχιση νέων τμημάτων DNA.	116
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	119
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	127
	ABSTRACT	129
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟΣΗΜΕΙΩΜΑ

Στυλιανή Σάρρου

Όνομα πατρός: Χρήστος

Όνομα μητρός: Ευγενία

Ημ/νια γέννησης: 30/1/1983

Τόπος γέννησης: Λάρισα

Υπηκοότητα: Ελληνική

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Τηλ. επικοινωνίας: 2410235541, 6944301817

E-mail: stsarrou@yahoo.gr, ssarrou@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Δεκέμβριος 2013: Τίτλος Ιατρικής ειδικότητας: Ιατρική Βιοπαθολογία

16.12.2013 Επιτυχείς εξετάσεις για απόκτηση άδειας άσκησης ιατρικής ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας από την Περιφέρεια Θεσσαλίας. Ο τίτλος χορηγήθηκε στις 22.1.2014

2012 - σήμερα: Υποψήφια διδάκτωρ του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Θέμα διατριβής: «Μελέτη στελεχών χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου που απομονώνονται από λοιμώξεις ανθρώπων και από ζώα στην Ελλάδα: ανίχνευση, ταυτοποίηση και γενετικός χαρακτηρισμός υπεύθυνων γονιδίων αντοχής», επιβλέπουσα: Αν.Καθηγήτρια Ε. Πετεινάκη (Αρ. πρωτ.: 3012, 6η/11-7-2012 Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

2010 - 2011: Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, ειδίκευση «Βιολογία της Αναπαραγωγής», Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Λάρισα, Βαθμός «άριστα» (8,58/10).

2000 - 2007: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής, Τμήμα Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Βαθμός πτυχίου: «λίαν καλώς» (6,67/10).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Σεπτέμβριος 2015 - σήμερα: Απασχόληση στον ιδιωτικό τομέα. Υπεύθυνη του εργαστηρίου βιοπαθολογίας διαγνωστικού κέντρου «ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΙΑΤΡΙΚΗ», Λάρισα

Απρίλιος 2014 - Μάρτιος 2015: Υπηρεσία Υπαίθρου: Π. Ι. Κυψέλης (Κ.Υ. Αγιάς)

Νοέμβριος 2010 - Ιανουάριος 2014: Ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ιούλιος 2008 - Ιούλιος 2010: Ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Γιαννιτσών.

ΒΡΑΒΕΙΑ/ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Ιούλιος 2015: Συμμετοχή με υποτροφία από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) στο θερινό σχολείο «14th ESCMID Summer School, 4-11 July 2015, Istanbul, Turkey».

Φεβρουάριος 2013: Βραβείο «Γεώργιος Παπαευαγγέλου» για την εργασία «Μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* σε τριτοβάθμιο ελληνικό νοσοκομείο»

Α.Λιακόπουλος, Α. Μαυροειδή, Β. Μυριαγκού, Σ.Σάρρου, ΕΑ Κατσίφας, ΑΔ Καραγκούνη, Ε.Πετεινάκη. 6ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, 27.2-1.3.2013, Αθήνα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Papadimitriou-Olivgeris M, Filippidou S, Kolonitsiou F, Drougka E, Koutsileou K, Fligou F, Dodou V, **Sarrou S**, Marangos M, Vantarakis A, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. Pitfalls in the identification of Enterococcus species and the detection of vanA and vanB genes. Lett Appl Microbiol. 2016 Sep;63(3):189-95. doi: 10.1111/lam.12610
2. Chatzopoulos D.C., **Sarrou S**, Vasileiou N.G.C., Ioannidi K.S., Peteinaki E., Valiakos G., Tsokana K., Papadopoulos E., Spyrou V., Mavrogianni V.S., Giannakopoulos A., Sbiraki A., Lacasta D., Bueso J.P., Athanasiou L.V., Billinis C., Fthenakis G.C Dissemination of intestinal pathogens between lambs and puppies in sheep farms Small Ruminant Research. Jun 2016.
3. Drougka E., Foka A., Koutinas C.K., Jelastopulu E., Giormezis N., Farmaki O., **Sarrou S**, Anastassiou E.D., Petinaki E., Spiliopoulou I. Interspecies spread of Staphylococcus aureus clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. Prev Vet Med. 2016 Apr 1;126:190-8.
4. Oikonomou O, **Sarrou S**, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzarlis K, Zakynthinos E, Dalekos GN, Petinaki E. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant Acinetobacter baumannii in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC Infect Dis. 2015;15:559.
5. **Sarrou S**, Liakopoulos A, Tsoumani K, Sagri E, Mathiopoulos KD, Tzouvelekis LS, Miriagou V, Petinaki E Characterization of a Novel Isa(E)- and lnu(B)-Carrying Structure Located in the Chromosome of a Staphylococcus aureus Sequence Type 398 Strain. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Feb;60(2):1164-6. Impact Factor: 4.48 · DOI: 10.1128/AAC.01178-15

6. Giormezis N, Papakonstantinou K, Kolonitsiou F, Drougka E, Foka A, **Sarrou S**, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. Biofilm synthesis and its relationship with genetic characteristics in clinical methicillin-resistant staphylococci AIMS Bioengineering. 2015 Sep.
7. Papadimitriou-Olivgeris M, Kolonitsiou F, Zerva L, Lebessi E, Koutsia C, Drougka E, **Sarrou S**, Giormezis N, Vourli S, Doudoulakakis A, Konsolakis C, Marangos M, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. Activity of vancomycin, linezolid, and daptomycin against staphylococci and enterococci isolated in 5 Greek hospitals during a 5-year period (2008-2012). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;83(4):386-8.
8. Plakokefalos E., Vontas A., Florou Z., Valiakos G., Georgantza K., **Sarrou S**, Labronikou M., Gramoustianou E., Peteinaki E., Markoulatos P., Minas A., Krikelis V., Noulas A., Manouras A. Influenza virus genotypes circulating in central greece during 2012-2014 and vaccine strain match *The Internet Journal of Microbiology*. 2015 Aug.
9. **Sarrou S**, Liakopoulos A, Chasioti M, Foka A, Fthenakis G, Billinis C, Spyrou V, Pantelidi K, Roussaki-Schulze A, Lachanas V, Makaritsis K, Skoulakis C, Daikos GL, Dalekos G, Spiliopoulou I, Petinaki E. Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 *Staphylococcus aureus* strains in a rural Greek area. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0122761.
10. Plakokefalos E, Vontas A, Florou Z, Valiakos G, Georgantza K, **Sarrou S**, Labronikou M, Gramoustianou E, Peteinaki E, Markoulatos P, Minas A, Krikelis V, Noulas A, Manouras A. Influenza virus activity during pandemic and seasonal influenza in Central Greece *Internet Journal of Infectious Diseases*. 2015 Jan.
11. Plakokefalos E, Vontas A, Florou Z, Valiakos G, Georgantza K, **Sarrou S**, Labronikou M, Gramoustianou E, Peteinaki E, Markoulatos P, Minas A, Krikelis V, Noulas A, Manouras A. Molecular Epidemiology of human influenza viruses in Thessaly During 2014-2015. *The Internet Journal of Laboratory Medicine*. 2015 Jan. DOI: 10. 5580/IJID.
12. Mavroidi A, Liakopoulos A, **Sarrou S**, Miriagou V, Petinaki E. Identification and characterization of genetic structures coding for carbapenemases in Enterobacteria from Central Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Jan;81(1):47-9.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Διεθνή Συνέδρια: αρ.8

Πανελλήνια Συνέδρια: αρ.22

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η επιδημιολογία του *Staphylococcus aureus* έχει μελετηθεί τόσο για τα μεθικιλίνη ανθεκτικά όσο και για τα ευαίσθητα στελέχη τα οποία σχετίζονται με την κοινότητα και το νοσοκομειακό περιβάλλον. Η εξάπλωσή τους σε νοσοκομεία και στην κοινότητα καθιστά αναγκαία την συνεχή μελέτη ως προς τα γενετικά χαρακτηριστικά και την λοιμογόνο ικανότητά τους. Τα προηγούμενα χρόνια, δεν έχει αναφερθεί εξάπλωση στελεχών *S. aureus* του κλωνικού συμπλέγματος CC398 τα οποία σχετίζονται με την κτηνοτροφία στη χώρα μας. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό τη διερεύνηση του είδους *S. aureus* και εμβάθυνση των γνώσεών μας συγκεκριμένα για τα στελέχη εκείνα που σχετίζονται με την κτηνοτροφία και απομονώνονται από ανθρώπους και ζώα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στην προσπάθεια αυτή βρήκα συνοδοιπόρους και συμπαραστάτες τους Καθηγητές μου και τους συναδέλφους μου, τους οποίους και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Έφη Πετεινάκη που με τίμησε με την ανάθεση του θέματος αυτού και για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε και την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε. Η επιμονή, η υπομονή, ο επαγγελματισμός και η μεθοδικότητά της με ενέπνευσαν καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής την Καθηγήτρια κα Ίριδα Σπηλιοπούλου-Σδούγκου και τον Καθηγητή κο Χαράλαμπο Μπιλλίνη για την άψογη και αποδοτική συνεργασία μας, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και το χρόνο που διέθεσαν.

Επίσης, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της Επιτροπής Παρακολούθησης, τον Καθηγητή κο Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, τον Καθηγητή κο Αναστάσιο Γερμενή, τον Καθηγητή κο Γεώργιο Σίμο και τον Καθηγητή κο Γεώργιο Φθενάκη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφερθώ στον Καθηγητή κο Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ για την πλήρωση μέρους των πειραμάτων της παρούσας διατριβής στο εργαστήριό του. Στο διάστημα αυτό συνεργάστηκα εποικοδομητικά με τις συνεργάτιδες του Κωνσταντίνα Τσουμάνη και Ευθυμία Σαγρή τις οποίες ευχαριστώ θερμά για τις γνώσεις που μοιράστηκαν και την υπομονή τους.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Β. Μυριαγκού ερευνήτρια στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για τη σημαντική βοήθεια στην οργάνωση και ανάλυση των ευρημάτων.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Απόστολο Λιακόπουλο, Χριστίνα Χατεδάκη, Ζωή Φλώρου, Όλγα Οικονόμου που σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής ήταν αρωγοί με τη συνεργασία και τις γνώσεις που μου προσέφεραν.

Τίποτα, όμως από όλα αυτά δε θα είχε πραγματοποιηθεί αν δεν είχα την αμέριστη υποστήριξη από την οικογένεια μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου και την αδελφή μου για όλα όσα μου πρόσφεραν μέχρι σήμερα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

1.1 Ταξινόμηση των Σταφυλοκόκκων

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στη φυλετική γραμμή των βακίλων/γαλακτοβακίλλων/ στρεπτοκόκκων. Η ταξινόμηση των σταφυλοκόκκων προέκυψε έπειτα από γενετικές μελέτες (π.χ. υβριδοποίηση DNA/rRNA, προσδιορισμού των αλληλουχιών 16srRNA) και χημειοταξικές αναλύσεις (π.χ. σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, μέτρηση κυτταρικών λιπαρών οξέων). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, οι σταφυλόκοκκοι ταξινομούνται στο φύλο Firmicutes, αποτελούν το Γένος I της οικογένειας V («Staphylococcaceae») της Τάξης I (Bacillales) της κλάσης III («Bacilli»), απαριθμώντας διάφορα είδη, πολλά από τα οποία είναι δυνατό να βρεθούν σε κλινικά δείγματα.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι ακίνητοι, μη σπορογόνοι, καταλάση-θετικοί, Gram-θετικοί κόκκοι που διατάσσονται ως μεμονωμένα κύτταρα, κατά ζεύγη, τριάδες και μικρές αλύσους αλλά κυρίως ως βοτρυοειδείς ομάδες. Τα περισσότερα είδη είναι προαιρετικώς αναερόβια με εξαίρεση τους *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* και *Staphylococcus saccharolyticus* (Winn & Koneman, 2006).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus* ο κύριος παθογόνος σταφυλόκοκκος για τον άνθρωπο, βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον και τους μυκτήρες του 20-40% των ενηλίκων. Δύναται να αποικίζει και άλλες θέσεις του σώματος όπως τις παρατριμματικές δερματικές πτυχές, το περίνεο, τις μασχάλες και τον κόλπο. Συχνά το βακτήριο αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου αλλά κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αποτελέσει αίτιο λοιμώξεων (Winn & Koneman, 2006).

Καταστάσεις οι οποίες ευνοούν την πρόκληση λοιμώξεων από *S. aureus* είναι διαταραχές της ανοσίας του ατόμου (συγγενής ή επίκτητη ελάττωση της χημειοταξίας των λευκοκυττάρων, υπογαμμασφαιριναιμίες, ελάττωση συστατικών του

συμπληρώματος), βλάβες του δέρματος (εγκαύματα, χειρουργικές τομές, έκζεμα), παρουσία ξένων σωμάτων (ράβματα, ενδοφλέβιοι καθετήρες, προσθετικές συσκευές), συνλοιμώξεις από άλλα βακτήρια ή ιούς, χρόνια υποκείμενα νοσήματα (κακοήθειες, καρδιοπάθειες) και προφυλακτική ή θεραπευτική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων (Winn & Koneman, 2006).

Οι λοιμώξεις που προξενεί εκτείνονται από τις καλοήθεις δερματικές λοιμώξεις έως επικίνδυνα για τη ζωή συστηματικά νοσήματα. Οι δερματικές λοιμώξεις συνίστανται στην απλή θυλακίτιδα και το μολυσματικό κηρίο καθώς και σε δοθιήνες και ψευδάνθρακες που προσβάλλουν τους υποδόριους ιστούς και προκαλούν συστηματικά νοσήματα. Η συχνή απομόνωσή του από εγχειρητικά τραύματα ευθύνεται για την επέκταση και ανάπτυξη συστηματικών λοιμώξεων. Η εξωνοσοκομειακή πνευμονία παρατηρείται σε ηλικιωμένα άτομα και συνδυάζεται με ιογενή πνευμονία που αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα. Αντίθετα, η ενδονοσοκομειακή πνευμονία παρατηρείται σε έδαφος αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, διασωλήνωσης και εισρόφησης. Η διασπορά του μικροβίου στον οργανισμό μέσω μικροβιαμίας έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενδοκαρδίτιδας, οστεομυελίτιδας, πυώδους αρθρίτιδας και μεταστατικών αποστημάτων του δέρματος των υποδόριων ιστών, των πνευμόνων, του ήπατος, των νεφρών και του εγκεφάλου (Murray *et al*, 2008).

1.3 Λοιμώξεις *S. aureus* σε ανθρώπους και ζώα

Η εκδήλωση της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης είναι συνάρτηση της αντίστασης του ξενιστή και της λοιμογόνου δύναμης του μικροοργανισμού. Η προστασία του οργανισμού εναντίον του σταφυλόκοκκου βασίζεται κυρίως στην ακεραιότητα του δέρματος και των βλεννογόνων, που αποτελούν τους φραγμούς εισόδου του *S. aureus* στον οργανισμό, όπως επίσης και στον αριθμό και τη λειτουργικότητα των πολυμορφοπύρηνων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν το μικρόβιο (Murray *et al*, 2008).

Η σταφυλοκοκκική λοίμωξη, της οποίας συνήθως προηγείται ο αποικισμός, χαρακτηρίζεται από έντονη διαπυητική φλεγμονή των ιστών και συμβαίνει όταν το μικρόβιο εισέρχεται σε φυσιολογικά στείρες περιοχές μέσω σημείων όπου έχει επέλθει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων, όπως συμβαίνει σε τραυματισμούς, εξελκώσεις, χειρουργικές επεμβάσεις, εγκαύματα ή χρόνιες

δερματοπάθειες. Ο πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού τοπικά στο σημείο της βλάβης, υπό την επίδραση των ενζύμων και τοξινών που εκκρίνει, οδηγεί σε περαιτέρω καταστροφή του ιστού, συρροή πολυμορφοπύρηνων, ιστική νέκρωση και σχηματισμό αποστήματος, που χαρακτηρίζει τις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις (Ζιακάς,2004; Lowy, 1998). Με το μηχανισμό αυτό και σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του μικροβίου εκδηλώνονται τοπικές λοιμώξεις στο σημείο εισόδου, όπως οι πυώδεις φλεγμονές του δέρματος και των μαλακών μορίων (μολυσματικό κηρίο, θυλακίτιδα, δοθιήνας, ψευδάνθρακας, κριθή, παρωνυχία, επιμολύνσεις τραυμάτων, εγκαυμάτων, ψωριασικών, εκζεματοειδών ή άλλων βλαβών που σχετίζονται με χρόνιες δερματοπάθειες), αλλά και σοβαρότερες εν τω βάθει λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία, εμπύημα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, βακτηριαμία), που οφείλονται στη διασπορά του *S. aureus* είτε κατά συνέχεια ιστού είτε με την αιματογενή οδό σε άλλες περιοχές του σώματος. Επιπλέον, ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να προκαλεί λοιμώξεις και μέσω τοξινών που παράγει, όπως είναι το σύνδρομο της σταφυλοκοκκικής επιδερμικής νεκρόλυσης, το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας και η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση.

Ο *S. aureus* παράγει μεγάλη ποικιλία τοξινών, που είναι υπεύθυνες για πολλές διαταραχές που προκαλεί στον άνθρωπο. Αυτές είναι οι αιμολυσίνες α, β, γ, δ και οι λευκοκτονίνες, η οικογένεια των υπεραντιγόνων, που περιλαμβάνει την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome-1, TSST-1), τις εντεροτοξίνες (SEA-E και SEG-O) και τις επιδερμολυτικές τοξίνες (ETA, B, C, D) (Winn & Koneman, 2006).

Στα ζώα οι λοιμώξεις που οφείλονται σε *S. aureus* διαφοροποιούνται ανάλογα με το ζώο το οποίο νοσεί. Όσον αφορά τα ζώα εκτροφής, σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες η συνηθέστερη λοίμωξη που εμφανίζεται είναι η μαστίτιδα, στους χοίρους οι οποίοι φαίνεται να έχουν υψηλό ποσοστό αποικισμού από *S. aureus* παρατηρούνται σπάνια, σποραδικά περιστατικά λοιμώξεων όπως δερματίτιδα, λοίμωξη ουροποιητικού και μαστίτιδα (Schwarz *et al*, 2008). Σε άλογα, οι παρατηρήσεις σχετικά με τις λοιμώξεις από *S. aureus* αφορούν ευκαιριακές λοιμώξεις αρθρώσεων, χειρουργικών τομών, δέρματος και μαλακών μορίων.Οι λοιμώξεις μπορεί να είναι ήπιες είτε να εξελίσσονται σε απειλητικές καταστάσεις για τη ζωή του ζώου (Weese *et al*, 2005). Παράγοντες κινδύνου που να σχετίζονται με την εμφάνιση ή και την εξέλιξη της νόσου δεν αναφέρονται σαφώς πέραν του αποικισμού του ζώου από *S. aureus* (Butaye *et al*, 2016).

Στα ζώα συντροφιάς, οι λοιμώξεις που αναφέρονται στην πλειοψηφία τους σχετίζονται με το δέρμα και τα μαλακά μόρια. Μπορεί όμως να είναι λοιμώξεις σε πληγές, σε χειρουργικά τραύματα, πυόδερμα, ωτίτιδα ή λοιμωξη ουροποιητικού (Weese, 2006).

1.4 Φορεία *S. aureus*

Ο άνθρωπος αποτελεί την κύρια φυσική δεξαμενή του *S. aureus* και παρά το γεγονός ότι πολλές περιοχές του ανθρώπινου σώματος μπορούν να αποικιστούν, η πλέον συχνή θέση ανάπτυξης του *S. aureus* είναι οι πρόσθιες ρινικές κοιλότητες (ρώθωνες) (Kluytmans *et al*, 1997). Άλλες σημαντικές θέσεις αποικισμού είναι ο φάρυγγας, το πρίνεο και το δέρμα, ενώ ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο κόλπος και οι μασχάλες αποτελούν λιγότερο συχνές θέσεις (Wertheim *et al*, 2005). Οι καλλιέργειες που λαμβάνονται από το δέρμα των χεριών των φορέων σταφυλόκοκκου είναι συνήθως θετικές για *S. aureus*. Το δέρμα θεωρείται ότι αποικίζεται δευτερογενώς από τους ρώθωνες και πιστεύεται ότι στις θέσεις αυτές τα στελέχη δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα (Solberg, 2000). Η εκρίζωση της ρινικής φορείας με τη χρήση τοπικών αντιβιοτικών οδηγεί κατά κανόνα σε εξάλειψη της φορείας και στις υπόλοιπες θέσεις αποικισμού, αποδεικνύοντας ότι οι πρόσθιες ρινικές κοιλότητες αντιπροσωπεύουν την κύρια οικολογική θέση του *S. aureus* (Reagan *et al*, 1991). Επιπλέον, δυνητικά ευνοϊκές θέσεις αποικισμού με *S. aureus* του ανθρώπινου σώματος αποτελούν και οι διάφορες δερματικές βλάβες, τα χρόνια έλκη, τα χειρουργικά τραύματα, καθώς και τα σημεία εισόδου ενδαγγειακών καθετήρων ή άλλων επεμβατικών συσκευών.

Παράλληλα, ο *S. aureus* αποικίζει και πολλά είδη ζώων συμπεριλαμβανομένων των κατοικίδιων και των κτηνοτροφικών ζώων, τα οποία πιθανόν να παίζουν ρόλο στον αποικισμό των ανθρώπων από στελέχη *S. aureus* και αντίστροφα. Τα στελέχη που απομονώνονται από ζώα ανήκουν συνήθως σε διαφορετικούς κλώνους σε σχέση με αυτά που ανευρίσκονται στους ανθρώπους (Pantosti, 2012). Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι παθογόνο που προκαλεί επιδημία σε μια χώρα, μπορεί εύκολα να μεταδοθεί σε μια άλλη μέσω αποικισμένων ζώων, τροφίμων, ανθρώπων (Drougka *et al.*, 2016). Η σταφυλοκοκκική φορεία των ζώων είναι αλληλένδετη με εκείνη των

ανθρώπων ειδικά όσων είναι ιδιοκτήτες ζώων, ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό κλινικών, προσωπικό χειρισμού προιόντων ζωικής προέλευσης.

Σύμφωνα με μελέτες, όπου τα άτομα μελετούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα με επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες, μόλις το 20% του πληθυσμού παρουσιάζει εμμένουσα φορεία *S. aureus* (persistent carriers), ένα ποσοστό 60% εμφανίζει διαλείπουσα φορεία (intermittent carriers), ενώ μόνο ένα 20% του πληθυσμού δεν αποικίζεται ποτέ από στελέχη *S. aureus* (persistent non-carriers) (Nouwen *et al*, 2004). Συνεπώς, τα άτομα που κατατάσσονται ως φορείς *S. aureus* εμφανίζουν εμμένουσα ή διαλείπουσα φορεία. Η διάκριση των δύο αυτών καταστάσεων είναι σημαντική γιατί τα άτομα με εμμένουσα φορεία έχουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο με αποτέλεσμα την αυξημένη διασπορά του *S. aureus* στο περιβάλλον, ενώ εμφανίζουν και υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης ενδογενών λοιμώξεων (Nouwen *et al*, 2004). Επομένως, τα άτομα με εμμένουσα φορεία αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης του *S. aureus* με συνέπεια τον παροδικό αποικισμό άλλων ατόμων. Παράλληλα, τα άτομα με εμμένουσα φορεία είναι συνήθως αποικισμένα με το ίδιο στέλεχος *S. aureus* για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ τα άτομα που χαρακτηρίζονται από διαλείπουσα φορεία φέρουν ανά διαστήματα διαφορετικά στελέχη.

Ο *S. aureus* μεταδίδεται συνήθως μέσω της στενής σωματικής επαφής και πιο σπάνια μέσω περιβαλλοντικών πηγών, όπως είναι τα άψυχα αντικείμενα και ο αέρας, τόσο στην κοινότητα όσο και στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας. Η αερογενής διασπορά του *S. aureus* φαίνεται ότι είναι λιγότερο σημαντική από τη μετάδοση με άμεση επαφή. Τα στελέχη του *S. aureus* εισάγονται στα νοσηλευτικά ιδρύματα μέσω αποικισμένων ή νοσούντων ασθενών, οι οποίοι αποτελούν την κύρια δεξαμενή διασποράς του μικροβίου και σπάνια από τους επαγγελματίες υγείας, τα ποσοστά φορείας των οποίων είναι παρόμοια με εκείνα που ανευρίσκονται μεταξύ των ενηλίκων στο γενικό πληθυσμό. Τα αντικείμενα που συχνά επιμολύνονται περιλαμβάνουν κλινοσκεπάσματα, ρούχα, συσκευές, καθώς και τον ιατρικό εξοπλισμό. Στην κοινότητα συνήθεις παράγοντες που ευνοούν τη μετάδοση του *S. aureus* είναι ο συνωστισμός, η συχνή σωματική επαφή, η συμμετοχή σε δραστηριότητες που έχουν ως αποτέλεσμα εκδορές ή παραβίαση του φραγμού του δέρματος, η κοινή χρήση δυνητικά μολυσμένων προσωπικών αντικειμένων και οι κακές συνθήκες ατομικής υγιεινής (David και Daum, 2010).

Η συσχέτιση μεταξύ της ρινικής φορέας και της ανάπτυξης λοίμωξης από *S. aureus* αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1931 από τον Danbolt, ο οποίος μελέτησε τη δοθιήνωση. Έκτοτε αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώθηκε από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι απέδειξαν ότι το στέλεχος *S. aureus* που ανευρίσκεται στους ρώθωνες και το στέλεχος που προκαλεί τη λοίμωξη εμφανίζουν τα ίδια γονοτυπικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι λοιμώξεις αναφέρονται ως «ενδογενείς», αφού οφείλονται σε στελέχη *S. aureus* που προέρχονται από τη βακτηριακή χλωρίδα του ίδιου του ασθενούς, σε αντίθεση με τις «εξωγενείς λοιμώξεις», οι οποίες οφείλονται στη μεταφορά των παθογόνων στελεχών από άλλα άτομα, το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό ή το άψυχο περιβάλλον (von Eiff *et al*, 2001)

1.5 Αντοχή σε αντιμικροβιακά φάρμακα

Η αντιμικροβιακή αντοχή των παθογόνων βακτηρίων ορίζεται ως η ικανότητά τους να παραμένουν ζωντανά ή να συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής που αναγνωρίζονται, κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες: i) ενζυμική αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού παράγοντα, ii) τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού ή απόκτηση εναλλακτικής οδού δράσης, iii) ύπαρξη ενεργού αντλίας εκροής του αντιβιοτικού και iv) μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης του μικροοργανισμού (Boerlin and White, 2006).

Για κάθε μικροοργανισμό, η αντοχή του σε αντιμικροβιακούς παράγοντες μπορεί να είναι φυσική (εγγενής) ή επίκτητη. Η φυσική αντοχή είναι χαρακτηριστική ανά γένος ή και είδος και τις περισσότερες φορές οφείλεται σε μη ύπαρξη ή αδυναμία πρόσβασης του στόχου δράσης από το αντιβιοτικό (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). Η επίκτητη αντοχή είναι ταυτόσημη με τον όρο «αντιμικροβιακή αντοχή» αφού έτσι περιγράφουμε την αντοχή που αναπτύχθηκε σε ένα μικροοργανισμό μετά από μία γενετική αλλαγή που πραγματοποιήθηκε στο βακτηριακό κύτταρο (Cloete, 2003). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι μεταλλάξεις σε γονίδιο του βακτηρίου στις οποίες να οφείλεται αλλαγή του στόχου δράσης του αντιβιοτικού στο βακτήριο (Martinez and Baquero, 2000). Πιο συχνά, η γενετική αλλαγή περιλαμβάνει μεταφορά και ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού στο οποίο εμπεριέχονται ένα ή περισσότερα γονίδια που προσδίδουν αντοχή στο

βακτήριο που τα δέχτηκε (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). Η προέλευση τέτοιων γονιδίων έχει συσχετιστεί με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος όπως βακτήρια που ανευρίσκονται στο έδαφος (Alonso, Sanchez and Martinez, 2001).

Οι πρώτοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν θεραπευτικά ήταν παράγωγα «ενδομικροβιακού ανταγωνισμού», όπως η πενικιλίνη, αν και σύντομα μετά τη χρήση και υπό την πίεση που προκάλεσε η δράση της οι μικροοργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμό αυτοπροστασίας (Spring, 1975). Αντίθετα με τα παραπάνω, τα περισσότερα γονίδια αντοχής φαίνεται να προϋπήρχαν στον αρχικό μικροοργανισμό, στον οποίο προτείνεται ότι ο λόγος ύπαρξής τους δεν ήταν η αντιμικροβιακή αντοχή (Alonso, Sanchez and Martinez, 2001). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από ευρήματα σχετικά με γονίδια αντοχής που φαίνεται να έχουν ρόλο στο μεταβολισμό του μικροβίου που τα φέρει εγγενώς στο γονιδιώμα του (Macinga and Rather, 1999; Shaw *et al.*, 1992) ή να συμμετέχουν σε φυσιολογικές του λειτουργίες (Adachi *et al.*, 1992). Η μεταφορά των γονιδίων αντοχής μεταξύ των διαφορετικών ειδών ή γενών έχει αποτελέσει σημαντικό κομμάτι στην εμφάνιση της αντοχής των παθογόνων βακτηρίων.

Η αντοχή των στελεχών *S. aureus* αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών ειδικά λόγω της συνεπακόλουθης επιρροής στην έκβαση των λοιμώξεων που προκαλούν τα στελέχη αυτά μέσω των θεραπευτικών επιλογών που μένουν διαθέσιμες. Η σημασία αυτή γίνεται περισσότερο κατανοητή βάσει του διαχωρισμού των στελεχών *S. aureus* σε μεθικιλίνη-ευαίσθητα (methicillin-sensitive, MSSA) και μεθικιλίνη-ανθεκτικά (methicillin-resistant, MRSA) υποδεικνύοντας την αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά τα οποία αποτελούν θεραπεία εκλογής των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Hashisaki and Jacobson, 1982). Ακολουθώντας τη χρονολογική σειρά, η αντοχή στην πενικιλίνη και η αντοχή στη μεθικιλίνη οδήγησαν στην χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων άλλων ομάδων όπως μακρολίδες, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες και γλυκοπεπτίδια (Lina *et al.*, 1999; Trzcinski *et al.*, 2000; Lowy, 2003). Η χρήση όμως και αυτών των παραγόντων ακολουθήθηκε από εμφάνιση αντοχής μετά από σύντομο χρονικό διάστημα. Τα γονίδια επίκτητης αντοχής που έχουν περιγραφεί για τον *S. aureus*, έχουν συσχετιστεί με πλασμίδια, τρανσποζόνια και χρωμοσωμικές κασσέττες (Malachowa and DeLeo, 2010).

1.5.1 β- λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι ευρέος φάσματος αντιμικροβιακοί παράγοντες και δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus* που αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη (μουκοπεπτιδίο). Η δομή των β-λακταμικών αντιβιοτικών μοιάζει με το τελικό άκρο D-Ala-D-Ala του μουκοπεπτιδίου, που συμμετέχει στη χιαστί σύνδεση (cross-linking) γειτονικών αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης καταλύεται από τις πενικιλιοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs) που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών προϋποθέτει τη δέσμευση των PBPs, διεργασία που οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και την ενεργοποίηση των αυτολυτικών ενζύμων του *S. aureus*, με αποτέλεσμα τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και το θάνατο του μικροβιακού κυττάρου. Ειδικότερα, οι PBPs καταλύουν το σχηματισμό γέφυρας πενταγλυκίνης μεταξύ των πεπτιδικών μερών δύο γειτονικών πεπτιδογλυκανικών αλυσίδων. Οι β-λακταμικοί παράγοντες δεσμεύονται σε αυτά τα μόρια εμποδίζοντάς τα να δράσουν, με συνέπεια την αναστολή του πολυμερισμού της πεπτιδογλυκάνης και τη διαταραχή της ομαλής λειτουργίας του κυττάρου (Pinho, 2008).

Η αντοχή του *S. aureus* στην πενικιλίνη οφείλεται στην παραγωγή β-λακταμάσης (πενικιλινάσης) από το κύτταρο. Η β-λακταμάση είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο που συντίθεται όταν ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και δρα υδρολύοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του β-λακταμικού αντιβιοτικού. Τα στελέχη *S. aureus* που είναι ικανά να παράγουν β-λακταμάση είναι και ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση είναι το *blaZ* και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών γονιδίων *blaR1* και *blaI*, που μαζί αποτελούν το οπερόνιο *bla*. Το γονίδιο *blaR1* συνθέτει τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη BlaR1, της οποίας το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται εκτεθειμένο στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρωτεΐνη BlaR1 δρα ως αισθητήρας των β-λακταμικών αντιβιοτικών και απαιτείται για την επαγωγή του οπερονίου *bla*. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνδέονται στο καρβοξυτελικό άκρο της BlaR1, με αποτέλεσμα την αποκοπή τμήματος από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο έχει δράση

πρωτεάσης διασπώντας την κατασταλτική πρωτεΐνη BlaI και επιτρέποντας στο γονίδιο *blaZ* να συνθέσει β-λακταμάση (Lowy, 2003). Το γονίδιο της λακταμάσης ενώ αρχικά θεωρήθηκε ότι βρίσκεται σε πλασμίδιο, αργότερα βρέθηκε ότι η θέση του είναι σε τρανσποζόνιο, το οποίο έχει την ικανότητα να μετακινείται και να ενσωματώνεται σε θέσεις είτε του χρωμοσώματος είτε πλασμιδίου (Gillespie *et al*, 1988).

Η ανάδυση του παραπάνω μηχανισμού αντοχής επέβαλε την εύρεση νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που θα ήταν σε θέση να αντιμετωπίσουν τα ανθεκτικά στελέχη. Η πρώτη ημισυνθετική πενικιλίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μεθικιλίνη η οποία είχε αντοχή στη δράση της β-λακταμάσης. Σε ένα μόλις χρόνο μετά την έναρξη της χρήσης της, απομονώθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (MRSA) (Jevons *et al*, 1963).

Η αντοχή στη μεθικιλίνη κυρίως οφείλεται στο μηχανισμό τροποποίησης στόχου, αφού η πλειοψηφία των στελεχών φέρουν την PBP2a. Αναλυτικά, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά επιτρέποντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος παρουσία του αντιβιοτικού που δεσμεύει τις άλλες PBPs (Bryskier and Bergogne-Berezin, 2005). Σε αντίθεση με την αντοχή που οφείλεται στις β-λακταμάσες (πενικιλινάσες), οι οποίες έχουν στενό φάσμα δράσης, η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη είναι ευρεία, προσδίδοντας αντοχή σε ολόκληρη την ομάδα των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Η PBP2a κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (Ubukata *et al.*, 1989). Το οπερόνιο *mec* συμπεριλαμβάνει και τα γονίδια *mecR1* και *mecI* τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *mecA*. Το γονίδιο *mecA* και κατ' επέκταση το οπερόνιο *mec* εδράζονται σε μία ευρύτερη περιοχή του χρωμοσωμικού DNA (21-67 kb) του *S. aureus* που ονομάζεται σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (StaphylococcalCassetteChromosomemec, SCC*mec*) και κωδικοποιεί γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά και λοιμογόνους παράγοντες. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί έντεκα τύποι SCC*mec* σε στελέχη *S. aureus* (I-XI), εκ των οποίων οι τύποι I-V ανευρίσκονται πιο συχνά. Τα MRSA στελέχη της κοινότητας (CA-MRSA) συνήθως φέρουν τους SCC*mec* τύπους IV, V ή VII, ενώ τα στελέχη που σχετίζονται με το νοσοκομειακό περιβάλλον (HA-MRSA) συνήθως φέρουν τις μεγαλύτερες σε μέγεθος χρωμοσωμικές κασέτες *mec* I, II, III, VI ή VIII. Οι SCC*mec* τύποι I (34 kb), IV (21-24 kb) και V (28 kb) είναι μικροί σε μέγεθος και δεν φέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, πλην του γονιδίου *mecA*, που προσδίδει την αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ο τύπος I φαίνεται να είναι το τμήμα εκείνο που

ενσωματώθηκε για πρώτη φορά στον *S. aureus*, με αποτέλεσμα να προκύψει ο αρχέγονος κλώνος των MRSA. Οι τύποι II (53 kb) και III (67 kb) έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, αφού φέρουν πρόσθετα γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα. Η ανάπτυξη πολυαντοχής παρέχει στα HA-MRSA στελέχη τη δυνατότητα επιβίωσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπου η υπερκατανάλωση αντιβιοτικών και η χρήση αντισηπτικών ασκούν «πίεση επιλογής» στα μικρόβια. Αντίθετα, τα CA-MRSA στελέχη που φέρουν τον τύπο SCC*mecIV* αντισταθμίζουν την έλλειψη πολυαντοχής με έναν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωσή τους, αφού επιτυγχάνουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο που τα καθιστά ανταγωνιστικά έναντι των άλλων βακτηρίων (Deurenberg *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2005). Το 2011 περιγράφηκε ένα ομόλογο γονίδιο του *mecA*, ονομάστηκε *mecC*, εμφανίζει 70% ομολογία με το γονίδιο *mecA* και εδράζεται στην κασέτα SCC*mecXI*. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε από δείγμα (LGA251) δεξαμενής γαλακτος στη νοτιοδυτική Αγγλία αποτελώντας και το πρώτο MRSA στέλεχος από κτηνοτροφικό πληθυσμό στο Ηνωμένο Βασίλειο. Παρά την αντοχή που εμφάνιζε το στέλεχος σε οξακυλλίνη και κεφοξιτίνη οι μοριακές μέθοδοι δεν επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του γονιδίου *mecA*, αλλά αντί αυτού την ύπαρξη ενός νέου γονιδίου που είχε ομολογία 70% με αυτό. Οι κλώνοι από τους οποίους προέρχεται δεν περιορίζεται στον κατεχοχόν σχετιζόμενο με τη κτηνοτροφία κλώνο CC398 αλλά έχει βρεθεί και στους CC130, CC599, CC59, CC1943 and CC425 που έχουν απομονωθεί από ζώα. Επίσης, το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί και σε άλλα είδη σταφυλοκόκκων όπως τα *S. sciuri*, *S. stepanovicii* και *S. xylosus* (*mecC1* αλλότυπος) (Becker *et al.*, 2014). Το γονίδιο αρχικά ονομάστηκε *mecA*_{LGA251} παίρνοντας το όνομα *mecC* το 2012 (Ito *et al.*, 2012), μιας και το όνομα *mecB* είχε δοθεί σε ομόλογο του γονιδίου *mecA* που απομονώθηκε από στέλεχος *Micrococcus caseolyticus*.

1.5.2 Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι ευρέως φάσματος βακτηριοστατικοί παράγοντες οι οποίοι δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω αντιστρεπτής δέσμησης στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Η συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών απαρτίζεται από φυσικά μόρια που συντίθενται από το είδος *Streptomyces*, όπως η χλωροτετρακυκλίνη

και η τετρακυκλίνη, αλλά και τα ημι-συνθετικά παράγωγα δοξικυκλίνη και μινοκυκλίνη αλλά και τις γλυκοκυκλίνη και τιγκεκυκλίνη που πρόσφατα προστέθηκαν στην κλινική πράξη.

Αντοχή σε τετρακυκλίνες μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς που ποικίλουν από αντλίες, τροποποίηση φαρμάκου, τροποποίηση στόχου δράσης και αποδυνάμωση των ειδικών ριβοσωμικών προστατευτικών πρωτεϊνών του στόχου (Nguyen *et al*, 2014). Στον *S. aureus* η αντοχή στα εν λόγω αντιβιοτικά έχει συσχετιστεί με το μηχανισμό αντλίας και τις αλλαγές στις ριβοσωμικές προστασίας (Ribosome protection proteins, RPPs). Ο μηχανισμός ενεργού αντλίας προκύπτει συνήθως μέσω ύπαρξης του γονιδίου *tetK*, το οποίο έχει βρεθεί σε μικρά πολλαπλών-αντιγράφων πλασμίδια (Guay and Rothstein, 1993). Ο ίδιος μηχανισμός μπορεί επίσης να οφείλεται στην ύπαρξη του γονιδίου *tetL*, αν και δε συναντάται συχνά στον *S. aureus* (Schmitz *et al.*, 2001; de Vries *et al.*, 2009). Οι RPPs προσδίδουν αντοχή στις τετρακυκλίνες μέσω σύνδεσής τους στο ριβόσωμα τροποποιώντας τη θέση σύνδεσης του αντιβιοτικού, ο μηχανισμός αυτός οφείλεται συνήθως στο γονίδιο *tetM* το οποίο έχει βρεθεί να εδράζεται σε τρανσποζόνια στο χρωμόσωμα του *S. aureus* (DeVries *et al*, 2009). Η πρωτεΐνη TetM σε αντίθεση με την TetK προσδίδει αντοχή σε τετρακυκλίνη και μινοκυκλίνη (Connell *et al.*, 2003).

1.5.3 Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη B (MLS_B)

Η εμφάνιση των πενικιλίνη-ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* επέβαλε την εύρεση νέων αντισταφυλοκοκκικών αντιμικροβιακών παραγόντων που θα αντικαθιστούσαν την πενικιλίνη. Η ερυθρομυκίνη, παράγωγο του *Saccharopolyspora erythraea*, αποτέλεσε τον πρώτο εκπρόσωπο της ομάδας των μακρολιδών που εισήχθη στην θεραπευτική των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Πρόκειται για βακτηριοστατικό αντιμικροβιακό παράγοντα που αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω δέσμευσής της με το 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος διακόπτοντας τη μετάφραση του mRNA (Bryskier and Bergogne-Berezin, 2005). Ο παραπάνω μηχανισμός αντοχής είναι κοινός για τις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τις στρεπτογραμμίνες, για το λόγο αυτό αναφέρονται ως Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη B, MLS_B ομάδα αντιβιοτικών. Οι μακρολίδες αποτελούνται από 14- έως 16-μελή λακτονικό δακτύλιο

βάσει του οποίου διακρίνονται οι αντιμικροβιακοί παράγοντες. Η ερυθρομυκίνη όπως και οι κλαριθρομυκίνη, ροξιθρομυκίνη και διρυθρομυκίνη έχουν 14-μελή δακτύλιο, η αζιθρομυκίνη έχει 15-μελή (αζαλίδες) και η σπιραμυκίνη 16-μελή (Bryskier and Bergogne-Berezin, 2005). Οι λινκοσαμίδες εκπροσωπούνται από τη λινκομυκίνη και την κλινταμυκίνη. Η λινκομυκίνη ήταν η πρώτη που απομονώθηκε από το *Streptomyces lincolnensis* (MacLeod *et al*, 1964), αλλά στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από την κλινταμυκίνη λόγω της καλύτερης δράσης της (Magerlein, 1971). Οι στρεπτογραμμίνες παράγονται από το *Streptomyces virginiae* και διακρίνονται σε δύο ομάδες: την ομάδα Α που περιέχει ένα 23-μελή ακόρεστο δακτύλιο με λακτόνη και πεπτιδικούς δεσμούς και την ομάδα Β που αποτελείται απόλακτόνη και κυκλικά πεπτίδια (Vannuffel and Cocito, 1996). Τα αντιβιοτικά αυτά είναι βακτηριοστατικά, όταν όμως συγχωρηθούν η δράση τους γίνεται βακτηριοκτόνος.

Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη εμφανίζεται συνήθως με διασταυρούμενη αντοχή σε λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνη Β, φαινότυπος ο οποίος ονομάζεται MLS_B (Vester and Douthwaite, 2001). Οι μηχανισμοί αντοχής που αφορούν τις μακρολίδες περιλαμβάνουν i) την τροποποίηση του στόχου δράσης, ii) ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού και iii) ύπαρξη ενεργού αντλίας εκροής. Τα γονίδια τα οποία έχουν χαρακτηριστεί για έκαστο μηχανισμό αντοχής αντίστοιχα είναι i) *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(G), *erm*(Q), *erm*(T), *erm*(Y), *erm*(33), ii) *ere*(A), *ere*(B), *mph*(C), iii) *msr*(A), *msr*(D) (Kadlec *et al*, 2012). Σε ότι αφορά τις λινκοσαμίδες, ο μηχανισμός αντοχής που ανευρίσκεται είναι μέσω ενζυμικής αδρανοποίησης του αντιβιοτικού μέσω νουκλεοτιδυλ-τρανφεράσης και τα υπεύθυνα γονίδια μπορεί να είναι τα *lnu*(A), *lnu*(B) (Kadlec *et al*, 2012). Για τις στρεπτογραμμίνες η αντοχή προκαλείται από ενζυμική αδρανοποίηση μέσω υδρόλυσης ή ακετυλίωσης με τα αντίστοιχα γονίδια, *vgb*(A), *vgb*(B), *vat*(A), *vat*(B), *vat*(C) (Kadlec *et al*, 2012). Από τους παραπάνω μηχανισμούς αντοχής αυτός που συχνότερα συναντάται είναι εκείνος της τροποποίησης του στόχου δράσης μέσω της μεθυλίωσης του rRNA που μεσολαβείται από τα γονίδια *erm*. Η έκφραση του φαινοτύπου αντοχής MLS_B στην περίπτωση αυτή μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή ή επαγόμενη. Στην επαγόμενη μορφή ένα μακρολίδιο είναι επαγωγέας η παρουσία του οποίου μετατρέπει τα ανενεργά μόρια mRNA που έχουν παραχθεί σε ενεργά μόρια μεθυλάσης. Από την άλλη πλευρά, στην ιδιοσυστασιακή μορφή αντοχής δεν εξαρτάται η έκφραση της μεθυλάσης από μόριο έπαγωγέα (Leclercq, 2002).

1.5.4 Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες είναι ευρέος φάσματος αντιμικροβιακοί παράγοντες που δρουν έναντι Gram-θετικών και -αρνητικών βακτηρίων. Πρώτος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής ήταν η Στρεπτομυκίνη η οποία απομονώθηκε από τον *Streptomyces griseus*, στη συνέχεια ακολούθησε η εισαγωγή των υπολοίπων δραστικών ουσιών. Η κάθε ουσία αποτελείται από μία αμινοκυκλιτόλη ενωμένη με αμινοσάκχαρα. Οι αμινογλυκοσίδες είναι βακτηριοκτόνοι παράγοντες που δρουν μέσω αναστολής της πρωτεινοσύνθεσης αφού δεσμεύονται στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος.

Η χρήση των εν λόγω αντιβιοτικών ακολουθήθηκε και από ανάπτυξη αντοχής στους συγκεκριμένους παράγοντες. Στην πλειοψηφία των στελεχών που εμφανίζουν αντοχή, αιτιολογικό παράγοντα αποτελούν τροποποιητικά ένζυμα, η παρουσία των οποίων προκαλεί αδρανοποίηση του αντιβιοτικού. Τα ένζυμα ομαδοποιούνται στις ακετυλοτρανσφεράσες (AACs), τις αδεσυλοτρανσφεράσες (ANTs) και τις φωσφοτρανσφεράσες (APHs) (Shaw *et al.*, 1992). Η δράση ακετυλοτρανσφεράσης μαζί με φωσφοτρανσφεράσης στον *S. aureus* οφείλεται στο διπλά λειτουργικό γονίδιο *aacA-aphD* το οποίο προσδίδει αντοχή σε γενταμυκίνη, καναμυκίνη και τομπραμυκίνη (Rouch *et al.*, 1987; Gillespie *et al.*, 1988). Ενώ το γονίδιο *aphA3* με δράση φωσφοτρανσφεράσης προσδίδει αντοχή σε καναμυκίνη και νεομυκίνη. Αντοχή μόνο στη στρεπτομυκίνη οφείλεται στην παρουσία των γονιδίων *aadE* ή *src*, τα οποία δρουν μέσω αδεσυλοτρανσφερασών. Ενώ συνήθως η αδρανοποίηση μέσω αδεσυλοτρανσφερασών είναι συνδεδεμένη με το γονίδιο *aadD* το οποίο προσδίδει αντοχή σε καναμυκίνη, νεομυκίνη, τομπραμυκίνη και αμικασίνη (Lyon and Skurray, 1987).

1.6 Μέθοδοι τυποποίησης στελεχών *S. aureus*

Η αναγκαιότητα τυποποίησης των στελεχών του *S. aureus* προέκυψε από την ικανότητα συγκεκριμένων κλώνων να διασπείρονται παγκόσμια και να προκαλούν νοσοκομειακές επιδημίες. Έτσι, στα πλαίσια της επιδημιολογικής επιτήρησης αναπτύχθηκαν μέθοδοι τυποποίησης οι οποίες βοήθησαν σημαντικά στην κατανόηση του τρόπου διασποράς των στελεχών που σχετίζονται με το νοσοκομειακό περιβάλλον

(Hospital-associated, HA) και την κοινότητα (Community-associated, CA) και τη συσχέτισή τους με διάφορους παράγοντες κινδύνου. Αρχικά, οι κλασικές μέθοδοι τυποποίησης του *S. aureus*, βασίζονταν στη μελέτη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του μικροβίου, ενώ σήμερα, οι σύγχρονες μέθοδοι τυποποίησης στοχεύουν στη διάκριση των στελεχών μέσω αλλαγών του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές μέθοδοι τυποποίησης. Μία τεχνική για να θεωρηθεί κατάλληλη ως τυποποιητική μέθοδος θα πρέπει να είναι σε θέση να χαρακτηρίσει όλα τα υπό εξέταση στελέχη, να έχει υψηλή διακριτική ικανότητα, μεγάλη επαναληψιμότητα και χαμηλό κόστος.

Η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, αλλά και η πρόοδος της πληροφορικής, βοήθησαν στην ανάπτυξη πλειάδας μοριακών τεχνικών τυποποίησης στελεχών του *S. aureus*. Η χρήση των μοριακών μεθόδων, οι οποίες εφαρμόζονται πλέον ευρέως τόσο στα πλαίσια ελέγχου των λοιμώξεων σε τοπικές επιδημίες όσο και σε μελέτες του τρόπου διασποράς των επιδημικών κλώνων σε παγκόσμια κλίμακα, οδήγησε σε μία νέα προσέγγιση στην τυποποίηση και τη μελέτη της επιδημιολογίας των στελεχών του *S. aureus*. Οι σημαντικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη μοριακή τυποποίηση του *S. aureus* είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), η μέθοδος τυποποίησης πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST), η οποία εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, η μέθοδος τυποποίησης μονοτοπικού προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*spa* typing) και η τυποποίηση με βάση τους SCC*mec* τύπους με εφαρμογή στα MRSA στελέχη (Chambers and Deleo, 2009).

1.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της σχέσης (ομαδοποίησης) μεταξύ των στελεχών του *S. aureus* είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE). Η μέθοδος βασίζεται στην πέψη του χρωμοσώματος των υπό μελέτη στελεχών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και στην ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων που προκύπτουν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η χαμηλή περιεκτικότητα του γονιδιώματος του *S. aureus* σε G+C ευνοεί τη χρήση της ενδονουκλεάσης *Sma*I, η οποία αναγνωρίζει

πλούσιες σε G+C αλληλουχίες. Οι διαφορές των ηλεκτροφορημάτων που προκύπτουν και οι οποίες απεικονίζουν τις διαφορετικές θέσεις που δρα η περιοριστική ενδονουκλεάση στο χρωμόσωμα κάθε στελέχους, είναι γνωστές ως Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στη διερεύνηση τόσο των νοσοκομειακών εξάρσεων όσο και στη μελέτη των επιδημικών MRSA κλώνων (EMRSA) σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρόλο που η PFGE εξακολουθεί να θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την τυποποίηση των στελεχών του *S. aureus* και κυρίως των MRSA στελεχών, το χρονοβόρο της διαδικασίας, το υψηλό κόστος, η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και η έλλειψη μίας κοινής ονοματολογίας σε διεθνές επίπεδο έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων μοριακής τυποποίησης (Tenover *et al.*, 1995). Η συγκεκριμένη μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου *SmaI* δεν ήταν δυνατό να τυποποιήσει στελέχη που προήλθαν από φάρμα χοίρων (Bens *et al.*, 2006). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *XmaI*, το οποίο είναι ισοσχιζομερές του *SmaI* και το οποίο δεν επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA (Rasschaert *et al.*, 2009).

1.6.2 Τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST)

Η μέθοδος MLST είναι σήμερα η βασικότερη τεχνική μοριακής τυποποίησης του *S. aureus* που εφαρμόζεται, καθώς βασίζεται σε πολλαπλά γονίδια και εκμεταλλεύεται στο μέγιστο τις δυνατότητες του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων, περίπου 450-500 bp, επτά διατηρημένων γονιδίων (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes), τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα στελέχη του είδους. Οι διαφορές στην αλληλουχία των γονιδίων προκύπτουν ως αποτέλεσμα της φυλογενετικής εξέλιξης των βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου και οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Ένα τμήμα του κάθε γονιδίου πολλαπλασιάζεται με την τεχνική της PCR και στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία του (DNA sequencing). Οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων συγκρίνονται με τις αντίστοιχες άλλων στελεχών, οι οποίες είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων του προγράμματος MLST (<http://saureus.mlst.net>). Οι διαφορετικές αλληλουχίες

προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλληλία για το κάθε γονίδιο μεταβολισμού. Ο συνδυασμός των αλληλίων των επτά γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προφίλ (allelic profile), το οποίο χαρακτηρίζει το κάθε στέλεχος *S. aureus* και αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Καθώς υπάρχουν πολλά αλληλία για κάθε ένα από τα επτά γονίδια μεταβολισμού, είναι απίθανο πανομοιότυπα προφίλ αλληλίων να έχουν προκύψει τυχαία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα στελέχη με το ίδιο προφίλ αλληλίων να κατατάσσονται στον ίδιο κλώνο, ενώ τα στελέχη που έχουν ίδια τουλάχιστον τα πέντε από τα επτά αλληλία γονιδίων να ομαδοποιούνται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (Clonal Complex, CC). Πιο συγκεκριμένα, οι ST τύποι που διαφέρουν σε ένα από τα επτά γονίδια ορίζονται ως Single Locus Variants (SLV), ενώ οι τύποι που διαφέρουν σε δύο γονίδια ορίζονται ως Double Locus Variants (DLV). Συνεπώς, τα κλωνικά συμπλέγματα αποτελούνται συνήθως από έναν αρχικό γονότυπο (founding genotype) και από έναν αριθμό φυλογενετικά συγγενικών κλώνων. Για τον καθορισμό και τη μελέτη των κλωνικών συμπλεγμάτων χρησιμοποιείται το λογισμικό πρόγραμμα eBURST, που ανευρίσκεται στην ιστοσελίδα του MLST (<http://eburst.mlst.net>). Από τη στιγμή που έχει καταχωρηθεί ο τύπος του κάθε στελέχους, είναι εύκολα συγκρίσιμος με όλα τα υπόλοιπα στελέχη που ήδη υπάρχουν καταχωρημένα, αλλά και με κάθε νέο στέλεχος που τυποποιείται και εισάγεται στη συνέχεια στη βάση δεδομένων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πληροφορίες είναι διαθέσιμες σε μία διαδικτυακή βάση δεδομένων, η οποία περιλαμβάνει εκτός των άλλων τις αλληλουχίες των εκκινητών, το πρωτόκολλο της μεθόδου, όπως επίσης διάφορες μηχανές αναζήτησης και προγράμματα λογισμικού συμπεριλαμβανομένου του eBURST. Η MLST θεωρείται η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για τη μελέτη της φυλογενετικής εξέλιξης των στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο. Αντίθετα, είναι ακατάλληλη ως μέθοδος για τη μελέτη επιδημικών εξάρσεων που εκδηλώνονται στη διάρκεια μικρών χρονικών περιόδων, αφού τα γονίδια που αποτελούν τους στόχους της MLST μεταλλάσσονται βραδέως (Enright *et al*, 2000 και 2002).

1.6.3. Τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*sra*-typing)

Η μέθοδος *sra* είναι μία μοριακή τεχνική τυποποίησης, η οποία βασίζεται σε ένα μόνο γονίδιο και συγκεκριμένα στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μίας μεταβλητής περιοχής του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*sra*). Το γονίδιο αυτό απαρτίζεται από μία περιοχή που σχετίζεται με το τμήμα της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών και από την περιοχή X. Η περιοχή X περιέχει ποικίλο αριθμό (3-17) επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repeats) μήκους 24 ζευγών βάσεων και αποτελείται από δύο περιοχές, την Xr (Short Sequence Repeat, SSR) και την Xc (μεμβρανικό τμήμα). Η διαφοροποίηση μεταξύ των τύπων *sra* και άρα μεταξύ των διαφόρων στελεχών προκύπτει τόσο από απαλείψεις και εισδοχές ολόκληρων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών όσο και από σημειακές μεταλλάξεις. Η ύπαρξη συντηρημένων περιοχών, που οριοθετούν την περιοχή X, επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό τους με PCR και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε συνδυασμό και με τη χρήση ειδικών για τον *S. aureus* λογισμικών προγραμμάτων. Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι βασίζεται σε ένα δομικό γονίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να εμφανίζει σημαντικές αλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα. Οι σημειακές μεταλλάξεις συσσωρεύονται αργά, ενώ αντίθετα η απώλεια και ο διπλασιασμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών πραγματοποιούνται με γρήγορο ρυθμό. Ως αποτέλεσμα, η συγκεκριμένη μοριακή μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση τόσο των επιδημικών εξάρσεων σε περιορισμένο χώρο και χρόνο όσο και για τη μελέτη της παγκόσμιας επιδημιολογίας και διασποράς των στελεχών του *S. aureus*, καθώς και των MRSA. Η μέθοδος σχετίζεται στενά με την MLST, αφού σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα της τεχνικής *sra* μπορούν να προβλέψουν τους κυρίαρχους MLST κλώνους (Shopsin *et al*,1999).

1.6.4. Τυποποίηση ρυθμιστικού συστήματος (accessory gene regulator, *agr*)

Ο έλεγχος της παραγωγής των περισσότερων λοιμογόνων παραγόντων του *S. aureus* επιτυγχάνεται μέσω ενός μεγάλου αριθμού ρυθμιστικών συστημάτων, μεταξύ των

οποίων το καλύτερα χαρακτηρισμένο είναι το σύστημα *agr*. Το ρυθμιστικό σύστημα *agr* (accessory gene regulator) αποτελείται από δύο διαφορετικά οπερόνια που εκφράζονται από τους υποκινητές P2 και P3. Αυτοί οι δύο υποκινητές κατευθύνουν τη σύνθεση των RNAII και RNAIII, αντίστοιχα. Το RNAII κωδικοποιεί τέσσερις πρωτεΐνες, τις AgrA, AgrB, AgrC και AgrD. Το γονίδιο *agrD* παράγει το αυτοεπαγόμενο πεπτίδιο AIP (autoinducing peptide, AIP), το οποίο τροποποιείται από την πρωτεΐνη AgrB και στη συνέχεια εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Όταν η συγκέντρωσή του ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο, τότε το πεπτίδιο AIP δεσμεύεται στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη AgrC, η οποία ενεργοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη AgrA, η οποία με τη σειρά της επάγει τη μεταγραφή των υποκινητών P2 και P3, με αποτέλεσμα την αυτορρύθμιση της σύνθεσης των RNAII και RNAIII. Το RNAIII είναι ο κύριος παράγοντας της ρύθμισης, καθώς ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τους λοιμογόνους παράγοντες. Όταν η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή, το σύστημα *agr* είναι ανενεργό με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών προσκόλλησης. Αντίθετα, όταν η πυκνότητα του βακτηρίου αυξηθεί, το πεπτίδιο AIP συγκεντρώνεται σε μεγάλες ποσότητες στον εξωκυττάριο χώρο των μικροβίων ενεργοποιώντας το σύστημα *agr*, αναστέλλοντας έτσι την έκφραση των παραγόντων προσκόλλησης και προάγοντας την έκφραση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών (Dufour *et al*,2002).

Το σύστημα *agr* έχει μία υπερμεταβλητή περιοχή που περιλαμβάνει το γονίδιο *agrD* και τμήματα των γονιδίων *agrB* και *agrC*. Σύμφωνα με τους πολυμορφισμούς αυτής της περιοχής, τα στελέχη *S. aureus* διαιρούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες (*agr*1-4), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να προκαλούν συγκεκριμένες λοιμώξεις. Ειδικότερα τα στελέχη που προκαλούν ενδοκαρδίτιδα ανήκουν στις ομάδες 1 και 2, ενώ τα στελέχη που παράγουν την τοξίνη TSST-1 και τα στελέχη που παράγουν τις επιδερμολυτικές τοξίνες ανήκουν στις ομάδες *agr*3 και *agr*4, αντίστοιχα (Jarraud *et al*,2002).

1.6.5. Τυποποίηση βάσει σταφυλοκοκκικής χρωμοσωμικής κασέτας *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, *Sccmec*)

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των MRSA στελεχών, όπως έχει προαναφερθεί, είναι η ύπαρξη των σταφυλοκοκκικών χρωμοσωμικών κασετών *mec*

(SCC*mec*), οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή και το γονιδιώμά τους και ως εκ τούτου ταξινομούνται σε διαφορετικούς τύπους. Οι SCC*mec* τύποι καθορίζονται από το συνδυασμό της δομικής τάξης του γονιδίου *mec* και του τύπου *ccr*, ενώ οι υπότυποι καθορίζονται με βάση τους πολυμορφισμούς των περιοχών J. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της πολλαπλής PCR (Milheirico *et al*, 2007). Η τυποποίηση με βάση τους SCC*mec* τύπους έχει καθιερωθεί ως μία σημαντική μέθοδος για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των MRSA στελεχών. Η σπουδαιότητά της αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η πρόταση του Enright και των συνεργατών του, οι οποίοι πρότειναν ότι ο χαρακτηρισμός των MRSA κλώνων πρέπει να γίνεται με βάση το συνδυασμό του ST και του SCC*mec* τύπου (π.χ. ST5-MRSA-II), είναι σήμερα ομόφωνα αποδεκτή (Enright *et al*, 2002). Ωστόσο, λόγω των ασαφειών και αντιφάσεων στο χαρακτηρισμό των SCC*mec* τύπων που παρατηρήθηκαν τα προηγούμενα χρόνια στη βιβλιογραφία, η διεθνής ομάδα για την ταξινόμηση των κασετών SCC*mec* (The International Working Group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome elements, IWG-SCC) εξέδωσε πρόσφατα κατευθυντήριες οδηγίες για τον προσδιορισμό και την κατάταξη των διαφόρων SCC*mec* τύπων (www.sccmec.org).

1.7. Διάκριση στελεχών *S. aureus*: Hospital-associated, HA; Community-associated, CA; Livestock-associated, LA

Ο πληθυσμός των στελεχών του *S. aureus* μελετάται συνεχώς αφού συνεχώς αναδύονται στελέχη με νέα χαρακτηριστικά. Πολλές μελέτες έχουν γίνει με στόχο να χαρακτηριστεί ο βακτηριακός πληθυσμός σε σχέση με την κλωνικότητα που παρουσιάζει και τις προγονικές σειρές από τις οποίες έχει προκύψει η καταγωγή του (Lindsay, 2010). Από τα χαρακτηριστικά τα οποία μελετήθηκαν εξήχθη το συμπέρασμα ότι η εξέλιξη του *S. aureus* προκύπτει λόγω σημειακών μεταλλάξεων στις πλείστες των περιπτώσεων λόγω ανασυνδυασμού γονιδίων (Feil *et al.*, 2003).

Ένας λόγος για τον οποίο παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ενδιαφέρον στο πεδίο των σταφυλοκόκκων αποτέλεσε η εμφάνιση και η αυξανόμενη εξάπλωση του μεθικιλίνη-ανθεκτικού *S. aureus* ως νοσοκομειακό παθογόνο (Musser and Kapur, 1992). Βασικός στόχος των μελετών γύρω από τον MRSA ήταν η κατανόηση της ποικιλότητας, της

κατανομής και της σχέσης μεταξύ των γονοτύπων των στελεχών όπως επίσης και η συσχέτιση αυτών με το γονίδιο *mecA* (Musser and Karur, 1992). Ωστόσο, στη συνέχεια το ενδιαφέρον μετακινήθηκε και σε μεθικιλίνη-ευαίσθητα στελέχη, για τα οποία το ερώτημα αφορούσε την γεωγραφική κατανομή τους αλλά και τα χαρακτηριστικά των κλώνων εκείνων που συνδέονται με την εμφάνιση των κλινικά σοβαρών λοιμώξεων (Enright *et al.*, 2000).

Τα στελέχη του *S. aureus* έχει επικρατήσει να περιγράφονται βάσει του κλωνικού τους συμπλέγματος (Clonal Complex, CC) ή του τύπου αλληλούχισής τους (Sequence Type, ST), σύμφωνα με τη μοριακή μέθοδο πολυτοπικής αλληλούχισης (Multi Locus Sequence Typing, MLST) (Enright *et al.*, 2000). Οι επιδημιολογικές αναλύσεις του *S. aureus* παγκοσμίως έχουν να κάνουν με στελέχη φορείας αλλά και στελέχη λοιμώξεων σχετιζόμενων με το νοσοκομειακό περιβάλλον και την κοινότητα. Έτσι οι κλώνοι που κυκλοφόρησαν από την εμφάνιση των MRSA στελεχών ομαδοποιούνται στα κλωνικά συμπλέγματα CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 και CC45 (Chambers and DeLeo, 2009), με τους CC5, CC8, CC20, CC30 και CC45 να συναντώνται στα νοσοκομειακά στελέχη και τους CC1, CC8 και CC30 στα στελέχη της κοινότητας (Deurenberg and Stobberingh, 2008). Από τα παραπάνω, παρατηρούνται κοινά κλωνικά συμπλέγματα τα οποία εκπροσωπούν MSSA και MRSA στελέχη, γεγονός που υποδεικνύει την προέλευση των MRSA στελεχών από στελέχη MSSA τα οποία απέκτησαν τη σταφυλοκοκκική κασέτα *SCCmec* (Enright *et al.*, 2000). Τόσο MRSA όσο και MSSA στελέχη φαίνεται να έχουν συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή και ομολογία στο γονιδίωμά τους, δεδομένου της κλωνικής ομοιότητάς τους αλλά ανεξάρτητα της αντοχής στη μεθικιλίνη (Lindsay, 2010). Επίσης, γονοτυπική ανάλυση και σύγκριση στελεχών που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις είτε απομονώνονται από δείγματα φορείας δεν φαίνονται να έχουν ποικιλομορφία, συνεπώς δεν ισχυροποιείται η πρόταση ύπαρξης ενός υπερπαθογόνου κλώνου *S. aureus* (Feil *et al.*, 2003). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μελέτης της επιδημιολογίας του *S. aureus* έχουν εμφανιστεί επιτυχημένοι κλώνοι ως προς τη μετάδοση ή την παθογονικότητά τους (Enright *et al.*, 2000). Τέτοιοι κλώνοι γίνονται επιδημικοί και επικρατούν για κάποιο χρονικό διάστημα αλλά στη συνέχεια υπαναχωρούν (Smith, Feil and Smith, 2000). Το γεγονός αυτό παρατηρείται είτε με κλώνους MRSA οι οποίοι επικρατούν και στη συνέχεια αντικαθίστανται από κάποιο επόμενο κλώνο, είτε από κλώνους στελεχών που παράγουν κάποια τοξίνη, όπως την Pantone-Valentine λευκοκτονίνη (Panton-Valentine Leucocidine, PVL) ή τοξίνη του

συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome-1, TSST-1) (Deurenberg and Stobberingh, 2008). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο *S. aureus* ST80-IV που παράγει την τοξίνη PVL και έχει επικρατήσει αντικαθιστώντας άλλους κλώνους (Drougka *et al*, 2014).

1.7.1 Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, HA-MRSA

Ο MRSA, διαθέτοντας ένα ευέλικτο γονιδίωμα, προσαρμόζεται εύκολα και επιβιώνει σε περιβάλλοντα με υψηλή πίεση φυσικής επιλογής, όπως είναι τα νοσοκομεία, αλλά διασπείρεται και πολύ εύκολα τόσο στα νοσοκομεία όσο και στην κοινότητα προκαλώντας ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων.

Ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο τη δεκαετία του 1960 και έκτοτε ενδημεί στα νοσοκομεία όλου του κόσμου (Hospital-associated MRSA, HA-MRSA), όπου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων. Πρόκειται για στελέχη *S. aureus* πολυανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών (Chambers, 2001). Σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό του κέντρου ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC), ως νοσοκομειακά MRSA (HA-MRSA) ορίζονται τα στελέχη που απομονώνονται: i) σε περισσότερο από 48 ώρες μετά την εισαγωγή του ασθενή στο νοσοκομείο από καλλιέργειες που λαμβάνονται, ii) από άτομα με προηγούμενο ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης από MRSA, iii) από ασθενείς με ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας, διαμονής σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας, αιμοκάθαρσης ή χειρουργικής επέμβασης κατά τη διάρκεια του προηγούμενου έτους ή iv) από ασθενείς που φέρουν διαδερμικούς καθετήρες ή άλλες ιατρικές συσκευές, όπως τραχειοστομία, γαστροστομία, ουροκαθετήρα. Τα στελέχη τα οποία δεν πληρούν τον παραπάνω ορισμό χαρακτηρίζονται ως MRSA της κοινότητας (Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA) (David και Daum, 2010).

Σύμφωνα με τις διάφορες μεθόδους μοριακής τυποποίησης που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια, η συντριπτική πλειοψηφία των HA-MRSA στελεχών ανήκουν σε έναν περιορισμένο αριθμό επιδημικών κλώνων (EMRSA), οι οποίοι προέκυψαν μετά από την επαναλαμβανόμενη εισαγωγή των διαφόρων SCC*mec* τύπων σε επιτυχημένους MSSA κλώνους, που ανήκουν σε πέντε κλωνικά συμπλέγματα (CC): CC5, CC8, CC22, CC30 και

CC45. Η επικράτηση ενός μικρού αριθμού κλώνων δείχνει ότι ορισμένα HA-MRSA στελέχη έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διασπείρονται εντός του νοσοκομείου και ότι από τη στιγμή που εγκαθίστανται στο νοσοκομειακό περιβάλλον είναι δύσκολο να εξαλειφθούν. Οι επιδημικοί MRSA κλώνοι μοιράζονται ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο με τους επιτυχημένους MSSA κλώνους, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γενετικό υπόβαθρο πιθανόν να παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε αυτά τα στελέχη ανεξάρτητα από το προφίλ αντοχής στα αντιβιοτικά. Ωστόσο, παρά την επικράτηση λίγων μόνο κλώνων MRSA παγκοσμίως, μελέτες έδειξαν ότι τόσο η τοπική ποικιλομορφία των στελεχών όσο και οι κύριοι MRSA κλώνοι αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου, με νέους κλώνους να εμφανίζονται ή να αντικαθιστούν τους παλαιότερους (de Lencastre *et al*, 2007; Chambers and Deleo, 2009).

Ο συνδυασμός της μεθόδου MLST και του SCC_{mec} τύπου αποκάλυψε ότι οι πέντε πανδημικοί HA-MRSA κλώνοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν πάνω από το 70% των HA-MRSA στελεχών είναι: ο Iberian (ST247-MRSA-IA), ο Brazilian (ST239-MRSA-IIIa), ο Hungarian (ST239-MRSA-III), ο NewYork / Japan (ST5-MRSA-II) και ο Pediatric (ST5-MRSA-IV). Εκτός, όμως, από αυτούς τους κλώνους (major clones), υπάρχουν και άλλοι οι οποίοι φαίνεται ότι περιορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (minor clones) ή απομονώνονται από ένα μικρό αριθμό ασθενών (sporadic clones), αν και λίγα γνωρίζουμε για αυτούς και τη δυναμική της εξάπλωσής τους (de Lencastre *et al*, 2007; Chambers και Deleo, 2009). Ο κλώνος Iberian απομονώνεται στα νοσοκομεία πολλών Ευρωπαϊκών χωρών, ενώ οι κλώνοι Brazilian, Hungarian και Pediatric ανιχνεύονται σε μικρότερο βαθμό (Stefani and Varaldo, 2003). Στην Αγγλία οι κλώνοι που ευθύνονται για την πλειονότητα των λοιμώξεων είναι ο ST22-IV (EMRSA-15) και ο ST36-II (EMRSA-16) (Enright *et al*, 2002), ενώ στη χώρα μας ο επικρατέστερος HA-MRSA κλώνος είναι ο ST239-MRSA-III/IIIa (Hungarian/Brazilian clone). Μία μελέτη που διεξήχθη στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Πάτρας κατά την περίοδο 1993-2000 έδειξε την προοδευτική μείωση ανίχνευσης του κλώνου ST30-MRSA-IV και την αύξηση του ST239-MRSA-III/IIIa, όπως επίσης και την εξάπλωση του ST80-MRSA-IV στο νοσοκομειακό περιβάλλον το 2000. Ο ST80-MRSA-IV είναι ένας από τους επικρατέστερους MRSA κλώνους της κοινότητας και η εμφάνισή του στο νοσοκομειακό περιβάλλον καταδεικνύει με τον καλύτερο τρόπο την ικανότητα των CA-MRSA να διασπείρονται και να προκαλούν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Από την άλλη, οι HA-

MRSA κλώνοι φαίνεται ότι προκαλούν λοιμώξεις στην κοινότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ορισμένοι κλώνοι έχουν την ικανότητα να διαχέονται από το νοσοκομείο στην κοινότητα. Έτσι, σε χώρες με υψηλό επιπολασμό MRSA στα νοσοκομεία, η ποικιλομορφία των στελεχών που ανευρίσκονται στην κοινότητα αντικατοπτρίζει την εικόνα των MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον (Zetola *et al*,2005; Chambers and Deleo, 2009; David and Daum, 2010).

Παράλληλα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των MRSA κλώνων που ανευρίσκονται στην Ευρώπη, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών που ανευρέθηκαν στις διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, με τα επικρατέστερα να σχηματίζουν ευδιάκριτες γεωγραφικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι MRSA κλώνοι που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις στην Ευρώπη έχουν κατά κύριο λόγο συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή. Η γεωγραφική κατανομή των HA-MRSA δείχνει ότι οι κλώνοι αυτοί διασπείρονται μέσω του εθνικού συστήματος υγείας της κάθε χώρας, για παράδειγμα μέσω της ενδονοσοκομειακής ή της διανοσοκομειακής μεταφοράς αποικισμένων ασθενών, αντί να εξαπλώνονται ελεύθερα στην κοινότητα (Grundmann *et al*,2010).

Δεδομένα από το πρόγραμμα αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY έδειξαν ότι ο επιπολασμός του MRSA στα νοσοκομεία μεταξύ του 1997 και του 1999 ήταν 26.3% στην Ευρώπη, 22.4% στην Αυστραλία, 66.8% στην Ιαπωνία, 34.9% στη Λατινική Αμερική και 34.2% στις Η.Π.Α. Ο επιπολασμός του HA-MRSA στην Ευρώπη ποικίλλει, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στις χώρες της νότιας και δυτικής Ευρώπης (>40%) και τα χαμηλότερα στις χώρες της βόρειας Ευρώπης (<2%). Στην Ελλάδα ο επιπολασμός του HA-MRSA είναι από τους υψηλότερους στην Ευρώπη, με τον MRSA να ευθύνεται για το 40% όλων των διεισδυτικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Surveillance report, Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2010). Επιπλέον, σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό των MRSA στελεχών παρατηρούνται και μεταξύ νοσηλευτικών ιδρυμάτων, τμημάτων νοσοκομείων και πληθυσμιακών ομάδων ασθενών πολλές φορές στην ίδια γεωγραφική περιοχή. Η μεγάλη διακύμανση του επιπολασμού του MRSA μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές πολιτικές που εφαρμόζονται στις χώρες της Ευρώπης και αφορούν στον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων και στην ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών (Grundmann *et al*,2010).

1.7.2. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA

Το 1982 στο Michigan απομονώθηκε το πρώτο MRSA στέλεχος από ασθενείς που έκαναν χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών, χωρίς προηγούμενη επαφή με το νοσοκομειακό περιβάλλον. Έκτοτε και κυρίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 παρατηρήθηκε μία μεγάλη αύξηση του αριθμού των λοιμώξεων, ιδιαίτερα των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων, από στελέχη MRSA σε άτομα στην κοινότητα, χωρίς προηγούμενη επαφή με το σύστημα υγείας. Η αύξηση αυτή σχετίστηκε με την εμφάνιση νέων MRSA στελεχών, των αποκαλούμενων MRSA της κοινότητας (Community Associated ή Acquired MRSA, CA-MRSA), τα οποία εξαπλώθηκαν γρήγορα μεταξύ του γενικού πληθυσμού στα περισσότερα μέρη του κόσμου προσβάλλοντας άτομα με ή χωρίς προηγούμενη έκθεση στο σύστημα παροχής υγειονομικής περίθαλψης (Chambers and Deleo, 2009; David and Daum, 2010).

Από τότε που ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο ικανό να προκαλεί λοιμώξεις στην κοινότητα, επιδημίες από CA-MRSA έχουν περιγραφεί σε διάφορες ομάδες πληθυσμών, που περιλαμβάνουν τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, τους αυτόχθονες κατοίκους διαφόρων περιοχών, τους κρατούμενους σε σωφρονιστικά ιδρύματα, τους ομοφυλόφιλους, τους συμμετέχοντες σε ομαδικά αθλήματα, τους εργαζόμενους σε βρεφονηπιακούς σταθμούς, τους επιζώντες φυσικών καταστροφών, τα παιδιά, το στρατιωτικό προσωπικό και τα άτομα χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου. Παρόλο που αυτές οι ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους, μοιράζονται κοινούς παράγοντες κινδύνου που μπορεί να αποτελούν τη βάση της μετάδοσης του MRSA στην κοινότητα. Οι παράγοντες αυτοί, που έχουν χαρακτηριστεί ως τα «5 Cs», είναι ο συνωστισμός (crowding), η στενή σωματική επαφή (contact), η λύση της συνέχειας του δέρματος (compromised skin), η χρήση μολυσμένων αντικειμένων (contaminated objects) και η έλλειψη καθαριότητας (cleanliness) (www.cdc.gov/niosh/topics/mrsa/). Η χρήση αντιβιοτικών αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου για αποικισμό από CA-MRSA στελέχη και έχει προταθεί ως το έκτο «C» (capsules). Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η ύπαρξη παιδιών στο σπίτι, η στενή επαφή με ασθενείς με λοιμώξεις δέρματος ή μαλακών μορίων από CA-MRSA, η κατάχρηση αλκοόλ, η HIV λοίμωξη και πρόσφατα ταξίδια σε ενδημικές περιοχές. Τα CA-MRSA προκαλούν διακριτά κλινικά σύνδρομα μεταξύ των οποίων οι λοιμώξεις του

δέρματος και των μαλακών μορίων αποτελούν τις πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις. Άλλες λοιμώξεις που σχετίζονται με τα CA-MRSA στελέχη είναι η νεκρωτική πνευμονία, η σηπτική θρομβοφλεβίτιδα και η σοβαρή σήψη (David and Daum, 2010).

Λόγω της εμφάνισης των MRSA της κοινότητας και της ανάγκης διάκρισής τους από τα νοσοκομειακά στελέχη, το 2000 το κέντρο ελέγχου πρόληψης νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC) όρισε ως CA-MRSA τα στελέχη τα οποία απομονώνονται από ασθενείς στην κοινότητα ή εντός 48 ωρών από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο και οι οποίοι στερούνται παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Έτσι, αυτοί οι ασθενείς δεν πρέπει να έχουν ιστορικό λοίμωξης ή φορείας από MRSA ή ιστορικό νοσηλείας κατά τη διάρκεια του προηγούμενου ενός έτους, ούτε αιμοκάθαρσης, χειρουργικής επέμβασης, μόνιμου καθετήρα ή ιατρικών προσθετικών υλικών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η διάκριση μεταξύ των CA-MRSA και των HA-MRSA στελεχών γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη, καθώς τα CA-MRSA στελέχη έχουν πλέον εισέλθει και στο νοσοκομειακό περιβάλλον προκαλώντας λοιμώξεις σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα (Porovich *et al*, 2009; David and Daum, 2010).

Τα CA-MRSA συνήθως φέρουν τους μικρότερους σε μέγεθος *SCCmec* τύπους IV, V ή VII, είναι ανθεκτικά σε λιγότερες ομάδες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών σε σχέση με τα HA-MRSA και συνήθως φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL). Ωστόσο, άμεση σχέση των γονιδίων που κωδικοποιούν την PVL και της περιοχής *SCCmec* δεν έχει αποδειχθεί, αν και μεγάλο ποσοστό (40-90%) των MRSA στελεχών με *SCCmec* τύπου IV παράγουν και την PVL. Οι μικρότεροι σε μέγεθος *SCCmec* τύποι φαίνεται ότι παρέχουν στα στελέχη αυτά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης. Μέχρι σήμερα δεν έχει καθοριστεί ο λόγος για τον οποίο ο *SCCmec* τύπος IV σχετίζεται με τα επικρατέστερα CA-MRSA στελέχη και γιατί τα στελέχη που φέρουν τον τύπο V δεν είναι τόσο διαδεδομένα (Chambers and Deleo, 2009; David and Daum, 2010). Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι παρόλο που ο *SCCmec* τύπος IV χαρακτηρίζει τα CA-MRSA στελέχη, κάποιοι από τους σημαντικότερους επιδημικούς νοσοκομειακούς κλώνους, όπως είναι ο ST22 και ο Παιδιατρικός κλώνος, φέρουν επίσης αυτόν τον *SCCmec* τύπο (Enright *et al*, 2002). Ο *SCCmec* τύπος V ανευρίσκεται σε CA-MRSA στελέχη που επικρατούν κατά κύριο λόγο στην Αυστραλία και την Ταϊβάν, ενώ το 2004 ανιχνεύτηκαν τα πρώτα ST377, με *SCCmec* τύπο V, PVL-θετικά στελέχη στη χώρα μας (Drougka *et al*, 2014), καθώς και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (Chini *et al*, 2008).

Σε αντίθεση με τα HA-MRSA στελέχη, τα CA-MRSA είναι ευαίσθητα στα περισσότερα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά και αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του *SCCmec* τύπου IV, ο οποίος στερείται γονιδίων που προσδίδουν αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά. Επιπλέον, η ευαισθησία σε περισσότερες από δύο κατηγορίες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών έχει χρησιμοποιηθεί από κάποιους ως κριτήριο για την αναγνώριση των CA-MRSA στελεχών. Τα CA-MRSA στελέχη εμφανίστηκαν στην κοινότητα λόγω της οριζόντιας μεταφοράς των *SCCmec* τύπων IV και V, των γονιδίων της PVL, καθώς και άλλων λοιμογόνων παραγόντων και γονιδίων αντοχής στο γονιδίωμα ήδη ευρέως διαδεδομένων MSSA κλώνων. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι τα στελέχη CA-MRSA που επικρατούν σήμερα έχουν αναπτυχθεί μετά από πολλές δεκαετίες πολύπλοκης εξέλιξης.

Οι επικρατέστεροι CA-MRSA κλώνοι παγκοσμίως είναι ο ST1 (USA400), ο ST8 (USA300), ο ST80 (European clone), ο ST30, ο ST59 και ο ST93. Ο ST1 (USA400) είναι ο κλώνος που κυριαρχούσε στις Η.Π.Α. όταν αναγνωρίστηκαν τα πρώτα CA-MRSA στελέχη στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Ο κλώνος αυτός, παρά την ικανότητά του να προκαλεί σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις, σύντομα αντικαταστάθηκε από τον ST8 (USA300), τον επικρατέστερο σήμερα CA-MRSA κλώνο στις Η.Π.Α. και στον Καναδά, ο οποίος φέρει την *SCCmec* τύπου IV, παράγει την PVL, είναι συνήθως ευαίσθητος σε πολλά μη β-λακταμικά αντιβιοτικά και ενοχοποιείται για λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, αλλά και για βακτηριαμίες (Moran *et al*, 2006; Chambers and Deleo, 2009).

Αντίθετα με την επικράτηση του ST8 (USA300) στις Η.Π.Α., στην Ευρώπη κυκλοφορούν πολλοί διαφορετικοί CA-MRSA κλώνοι. Ο ST80 είναι ο συνηθέστερος και για το λόγο αυτό αποκαλείται και Ευρωπαϊκός κλώνος. Φέρει την *SCCmec* τύπου IV, καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν την PVL, ενώ συνήθως παρουσιάζει ένα προφίλ αντοχής στα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά, που χαρακτηρίζεται από αντοχή στο φουσιδικό οξύ, την τετρακυκλίνη και την καναμυκίνη. Ανιχνεύεται σε όλες σχεδόν τις Ευρωπαϊκές χώρες, καθώς και στην Ελλάδα, ως μία ολοένα αυξανόμενη αιτία λοιμώξεων στην κοινότητα. Λιγότερο συχνά ανευρίσκεται και σε άλλα μέρη του κόσμου. Ο κλώνος αυτός πιθανόν να εμφανίστηκε αρχικά στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή ή τη βόρεια Αφρική, αφού τα πρώτα κρούσματα που καταγράφηκαν στην Ευρώπη αφορούσαν ασθενείς με ιστορικό πρόσφατου ταξιδιού σε αυτές τις περιοχές (Tristan *et al*, 2007; Otter and French, 2010).

Ο κλώνος ST30, που φέρει επίσης την *SCCmec* τύπου IV και παράγει PVL, είναι άμεσος απόγονος του MSSA κλώνου λυσίτυπου 80/81, ο οποίος ήταν νοσοκομειακό παθογόνο στις Η.Π.Α. κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960. Είναι γνωστός ως κλώνος Southwest Pacific (SWP), αφού ευθύνεται κυρίως για λοιμώξεις στην Αυστραλία, αλλά από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 ανιχνεύεται επίσης και σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου, συμπεριλαμβανομένων των Η.Π.Α., της Λατινικής Αμερικής, της Μέσης Ανατολής και της Ευρώπης. Ο κλώνος ST59 επικρατεί στην Ταϊβάν, με τα PVL θετικά στελέχη να φέρουν διαφορετικούς *SCCmec* τύπους, ενώ στελέχη ST59 έχουν απομονωθεί και από ασθενείς στις Η.Π.Α., στην Αυστραλία, στην Ολλανδία, στη Δανία και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Ο ST93 CA-MRSA κλώνος ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 2000 στο Queensland και στο NewSouthWales της Αυστραλίας, όπου και επικρατεί, αλλά σπάνια ανιχνεύεται στις άλλες ηπείρους (Tristan *et al*,2007).

Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί δραματική αύξηση των CA-MRSA στελεχών και μάλιστα εκείνων που παράγουν την PVL. Ο επικρατέστερος CA-MRSA κλώνος είναι ο Ευρωπαϊκός κλώνος ST80-IV, ο οποίος παράγει PVL και σχετίζεται κατεξοχήν με λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, ενώ ενοχοποιείται και για άλλες σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις (Drougka *et al*, 2014).

Παρά την παγκόσμια αύξηση των λοιμώξεων από στελέχη CA-MRSA, τα ποσοστά φορέας MRSA στον υγιή πληθυσμό παραμένουν χαμηλά. Ακόμα και στις Η.Π.Α., όπου ο CA-MRSA είναι ευρέως διαδεδομένος, ο επιπολασμός της ρινικής φορέας MRSA σε ένα μεγάλο δείγμα υγιών ατόμων ήταν μόλις 1.5% το 2003-2004 (Gorwitz *et al*,2008). Ομοίως, φαίνεται ότι ο επιπολασμός της φορέας CA-MRSA είναι χαμηλός στις περισσότερες περιοχές της Ευρώπης, με τα ποσοστά όμως να καταγράφουν ανοδική τάση (Grundmann *et al*,2002). Ωστόσο, η δραματική αύξηση του ποσοστού των MRSA στελεχών στην κοινότητα σε συνδυασμό και με την ικανότητα ανάπτυξης πολυανθεκτικότητας, διατηρούν αυτά τα στελέχη στην πρώτη γραμμή του ιατρικού ενδιαφέροντος τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Ακόμα και στις Σκανδιναβικές χώρες και την Ολλανδία, όπου ο επιπολασμός του HA-MRSA είναι πολύ χαμηλός, οι λοιμώξεις από CA-MRSA στελέχη έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, παρά την αυστηρή εφαρμογή πολιτικών ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών και στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων (Skon, 2005).

1.7.3. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, LA-MRSA

Οι πρώτες αναφορές στελεχών MRSA ως αιτιολογικού παράγοντα λοιμώξεων σε ζώα έγιναν τη δεκαετία του '70. Αυτά τα στελέχη τότε χαρακτηρίστηκαν ως σχετιζόμενοι με την κτηνοτροφία μεθικιλίνη ανθεκτικοί χρυσίζοντες σταφυλόκοκκοι, Livestock-associated MRSA (LA-MRSA) (Leonard and Markey, 2008). Υπήρξε τότε η υπόθεση ότι η εμφάνιση των εν λόγω στελεχών αποτέλεσε συνέπεια της χορήγησης αντιβιοτικών στα ζώα και έτσι δεν μελετήθηκαν οι επιπτώσεις τους στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια όμως, τα κρούσματα που έχουν καταγραφεί από τέτοια στελέχη έχουν αυξηθεί τόσο όσον αφορά τα ζώα συντροφιάς και εκτροφής όσο και τον άνθρωπο (Catry *et al*, 2010). Η επιδημιολογία των στελεχών αυτών προκάλεσε το ερώτημα αν τα στελέχη μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο ή αντίστροφα (Morgan, 2008). Στελέχη LA-MRSA τα οποία αρχικά απομονώθηκαν στο Βέλγιο, ακολούθως αναφέρθηκαν και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης όπως Γερμανία, Ολλανδία, Γαλλία. Η εξάπλωσή τους όμως ξεπέρασε τα όρια της Ευρώπης όπου πρωτοαναφέρθηκαν οπότε και υπήρξαν περιστατικά σε Καναδά, Η.Π.Α, Κίνα, Μαλαισία και Κορέα (Petinaki and Spiliopoulou, 2012).

Η ομάδα αυτή *S. aureus* έχει διακριτά χαρακτηριστικά (Smith and Pearson, 2011): (α) δεν τυποποιούνται με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI* με PFGE, (β) τα περισσότερα στελέχη που έχουν τυποποιηθεί βάσει της MLST μεθόδου ανήκουν στο κλωνικό σύμπλεγμα CC398, (γ) η σταφυλοκοκκική κασέτα *SCCmec* που ανευρίσκεται στα στελέχη αυτά είναι διαφορετική από εκείνες που βρίσκονται στα CA-MRSA και HA-MRSA στελέχη, (δ) συνήθως έχουν αντοχή σε μη β-λακταμικά αντιβιοτικά κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται κατεξοχήν στην κτηνοτροφία και (ε) σπάνια ανευρίσκονται στα στελέχη γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τοξίνες όπως η PVL ή εντεροτοξίνες (Petinaki and Spiliopoulou, 2012). Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στο διαχωρισμό της ομάδας αυτής των σταφυλοκόκκων επιτρέποντας την ευκολότερη αναγνώρισή τους.

Η εμφάνιση των στελεχών αυτών, αρχικά, συσχετίστηκε με την χορήγηση αντιβιοτικών σε ζώα, παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο, αφού η προηγηθείσα χορήγηση μαζί με τη διάρκεια χορήγησης αντιμικροβιακών φαρμάκων συμβάλλουν ως προγνωστικοί παράγοντες στην απομόνωση LA-MRSA στελέχους (Graveland *et al*, 2010). Επίσης, η επαφή με ζώα αποτελεί παράγοντα κινδύνου αποικισμού ή λοίμωξης

από *S. aureus* για τον άνθρωπο, τόσο για το προσωπικό που εργάζεται σε φάρμες, το κτηνιατρικό προσωπικό αλλά και τους συγγενείς τους με τους οποίους έρχονται σε επαφή (Lewis *et al*, 2008). Η επίπτωση των LA-MRSA στον άνθρωπο ποικίλλει σε διάφορες μελέτες, γεγονός που θέτει υπό διερεύνηση τον παράγοντα κινδύνου της επαφής με ζώα (vanden Broek *et al*, 2009).

Οι πρώτες αναφορές στελεχών LA-MRSA αφορούσαν χοίρους στην Ολλανδία, στους οποίους όμως η ύπαρξη του μικροοργανισμού δεν συνοδευόταν από εμφάνιση συμπτωμάτων ή νόσου, ο αποικισμός τους όμως λειτούργησε επιτυχώς ως δεξαμενή για τη μετάδοση του βακτηρίου (Tenhagen *et al.*, 2009). Η πιθανολογούμενη οδός εξάπλωσης είναι μέσω των εξαγωγών σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες μεγάλων ποσοτήτων χοιρινού κρέατος και προϊόντων κρέατος καθώς και η εξαγωγή ζωντανών μικρών χοίρων για εκτροφή προς άλλες χώρες όπως οι Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία, Βέλγιο, Ρουμανία, Ουγγαρία, Κροατία και Πολωνία (Petinaki and Spiliouroulou, 2012). Έτσι ακολούθως, η παρουσία των LA-MRSA σε χοίρους επισημάνθηκε στη Γερμανία, το Βέλγιο, τη Γαλλία αλλά και τον Καναδά και τις Η.Π.Α.. Στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική τα εν λόγω στελέχη ανήκουν κατά πλειοψηφία στο CC398, ενώ στη Ασία παρουσιάστηκε ο τύπος ST9 . Επίσης, εκτός του συμπλέγματος CC398 ανευρίσκονται και οι CC9/ST9, CC97/ST97 και CC30/ST39 (Köck *et al*, 2014). Όσον αφορά την κατηγορία των βοοειδών, η εμφάνιση LA-MRSA έγινε στο Βέλγιο όταν απομονώθηκαν από γαλακτοπαραγωγά ζώα με μαστίτιδα (Devriese *et al*, 1972). Τα τελευταία χρόνια, τέτοια στελέχη έχουν απομονωθεί και σε άλλες χώρες όπως οι Κορέα, Ουγγαρία, Μεξικό, Ολλανδία, Βραζιλία, Ιταλία, Πακιστάν, Τουρκία και βρέθηκαν να ανήκουν και σε άλλους κλώνους πέραν του CC398. Πιο συγκεκριμένα, στους CC130, ST425 και CC1943, οι οποίοι αρχικά θεωρήθηκαν ότι ανευρίσκονται μόνο σε βοοειδή (Petinaki and Spiliouroulou, 2012). Τα αιγοπρόβατα αν και αποτελούν μεγάλο κομμάτι της κτηνοτροφικής παραγωγής, δεν έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό επιπολασμού MRSA σε αυτά ίσως λόγω της μειωμένης χρήσης αντιμικροβιακών παραγόντων σε σχέση με τους χοίρους, τα βοοειδή και τα πουλερικά (Gharsa *et al.*, 2012). Τέλος, από τα πουλερικά έχουν απομονωθεί στελέχη LA-MRSA, τόσο από ζωντανά όσο και από προϊόντα προς κατανάλωση με βάση το κρέας τους. Η τυποποίηση των στελεχών που έχουν συσχετιστεί με τα παραπάνω εκτός του CC398 περιλαμβάνουν και CC9 και CC5 (Fessler *et al*, 2011).

Τα LA-MRSA στελέχη συναντώνται επίσης και στα ζώα συντροφιάς. Τα πρώτα κρούσματα αφορούσαν λοιμώξεις αιτία των οποίων ήταν MRSA στελέχη που προέρχονταν από γάτες και σκύλους (Catry *et al*, 2010). Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα στελέχη ήταν κλώνοι οι οποίοι είχανε ανθρώπινη προέλευση. Βρέθηκαν επίσης, στελέχη τύπου HA-MRSA ST239-III, ενός νοσοκομειακού κλώνου, επίσης HA-MRSA ST22-IV, αλλά και του συμπλέγματος CC398.(Haenni *et al*, 2012). Σε πρόσφατη μελέτη χαρακτηρισμού στελεχών *S. aureus* σε ζώα συντροφιάς στην Ελλάδα, κυρίαρχος αναδείχθηκε ο κλώνος ST80 ο οποίος ανευρίσκεται ως παθογόνο νοσοκομειακό και της κοινότητας. Ο δεύτερος επικρατέστερος τύπος ήταν ο ST15, ο οποίος έχει περιγραφεί ξανά σε ζώα συντροφιάς (Jamroz *et al.*, 2012). Στη συγκεκριμένη μελέτη, υπήρξαν στελέχη CC398 τα οποία απομονώθηκαν από ζώα συντροφιάς που δεν είχαν επαφή με παραγωγικά ζώα, γεγονός που θα ενίσχυε την πιθανότητα εύρεσης αυτού του τύπου *S. aureus*. (Drougka *et al.*, 2016).

Η οδός μετάδοσης του *S. aureus* CC398 μεταξύ των ζώων εκτροφής και του ανθρώπου μπορεί να γίνει με άμεση επαφή με το ζώο, μέσω περιβαλλοντικής επιμόλυνσης και καταναλώνοντας ή με το χειρισμό μολυσμένων τροφίμων. Όπως ισχύει και για τη μετάδοση μεταξύ των ανθρώπων, η άμεση επαφή παίζει σπουδαίο ρόλο. Οι άνθρωποι που εργάζονται σε φάρμες, οι κτηνίατροι καθώς και το προσωπικό κτηνιατρικών κλινικών αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου. Εκτός αυτών όμως έχει δειχθεί ότι και άνθρωποι που έχουν έμμεση επαφή είναι σε μεγάλο ποσοστό αποικισμένοι, όπως οι κάτοικοι των περιοχών όπου βρίσκονται φάρμες εκτροφής, συγγενείς ανθρώπων που εργάζονται σε αυτές ή επισκέπτες (Quddoumi *et al*, 2006). Για το λόγο αυτό, όσοι έρχονται σε επαφή με ζώα που νοσούν ή είναι αποικισμένα από *S. aureus* βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο να μολυνθούν και να εμφανίσουν σταφυλοκοκκική λοίμωξη (Petinaki and Spilioroulou, 2012). Μαθηματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι MRSA CC398 στελέχη είναι 72% λιγότερο μεταδοτέα σε σχέση με ευρέως κυκλοφορούντες HA-MRSA κλώνους, χωρίς όμως να μπορεί να διευκρινιστεί ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται αυτό (Wassenberg *et al*, 2010). Επίσης, δεν έχει αποκλειστεί η μετάδοση των CC398 από άνθρωπο σε άνθρωπο στην κοινότητα είτε σε υγειονομικές μονάδες εφ' όσον υπάρχουν περιστατικά αποικισμένου πληθυσμού που δεν έχουν κανένα από τους προαναφερθέντες παράγοντες κινδύνου (Wulf *et al*, 2012).

Η μετάδοση μεταξύ των ανθρώπων και των ζώων συντροφιάς είναι διαφορετική σε σχέση με τα προαναφερθέντα για τα ζώα εκτροφής. Η διαφορετική επιδημιολογία των

S. aureus που αναφέρθηκε παραπάνω δίνει την απάντηση, αφού στα ζώα συντροφιάς ανευρίσκονται κυρίως οι κλώνοι που κυκλοφορούν μεταξύ των ανθρώπων, συνεπώς η μετάδοση γίνεται αμφίδρομα με άμεση επαφή (Petinaki and Spiliopoulou, 2012). Έχει ενδιαφέρον, η μελέτη επιπολασμού MRSA σε γάτες δύο ομάδων, όπου εκείνες που ήταν οικόσιτες είχαν υψηλότερο ποσοστό αποικισμού (10,21%) σε σχέση με εκείνες που ήταν ελεύθερες στο δρόμο (1,4%), αποδεικνύοντας τη συσχέτιση του αυξημένου ποσοστού αποικισμού με την ανθρώπινη επαφή του ζώου (Bierowiec *et al*, 2016).

1.7.3.1. Πρώτο περιστατικό CC398

Η πρώτη φορά που απομονώθηκε στέλεχος MRSA από ζώα ήταν το 1972 οπότε και βρέθηκε σε γάλα από αγελάδες με μαστίτιδα (Devriese *et al*, 1972). Τις δεκαετίες που ακολούθησαν, οι λοιμώξεις σε ζώα από MRSA στελέχη παρέμειναν σε χαμηλά ποσοστά όμως την τελευταία δεκαετία, το δεδομένο αυτό άλλαξε με τα αυξημένα ποσοστά επιπολασμού MRSA που καταγράφηκαν σε ζώα (Leonard and Markey, 2008). Η παρατήρηση αυτή αφορούσε τόσο λοιμώξεις όσο και φορεία ζώων συντροφιάς, τα οποία μπορούν να θεωρηθούν δεξαμενή των στελεχών αυτών για τη μετάδοσή τους στον άνθρωπο. Οι κλώνοι που αρχικά βρέθηκαν όμως μεταξύ των ζώων αντιπροσώπευαν τους κυρίαρχους HA-MRSA κλώνους προτείνοντας ως κύρια οδό μετάδοσης αυτή από τον άνθρωπο στα ζώα (Loeffler *et al.*, 2005; Strommenger *et al.*, 2006). Σχετικά με τα ζώα εκτροφής, κλώνοι που απομονώθηκαν ήταν οι ST8 και ST254 από άλογα (Cuny *et al.*, 2006), ST22 από μικρά ζώα (Cuny *et al.*, 2010) και στελέχη από σποραδικά κρούσματα κυρίως από περιστατικά ζώων με μαστίτιδα (Lee, 2003). Όλα τα παραπάνω άλλαξαν όταν το 2005 οπότε αναγνωρίστηκε ένα στέλεχος *S. aureus* το οποίο απομονώθηκε από μη σχετιζόμενα μεταξύ τους περιστατικά αλλά με κοινό χαρακτηριστικό την γειτνίαση σε φάρμες χοίρων (Voss *et al*, 2005). Το συγκεκριμένο στέλεχος δεν ήταν δυνατό να τυποποιηθεί με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI*, αναγνωρίστηκε ως νέος τύπος MRSA ST398 και χαρακτηρίστηκε αντιπροσωπευτικός της ομάδας των LA-MRSA στελεχών.

1.7.3.2. Περιστατικά CC398 στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, πριν την παρούσα μελέτη που είχε σκοπό την ανίχνευση των στελεχών *S. aureus* που σχετίζονται με την κτηνοτροφία είχαν περιγραφεί δύο περιστατικά ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε *S. aureus* τύπου ST398. Το πρώτο στέλεχος ήταν MRSACC398 και απομονώθηκε από αιματοκαλλιέργεια ασθενούς στην Αθήνα το 2009, ενώ ένα δεύτερο στέλεχος ήταν MSSA CC398 και απομονώθηκε επίσης από καλλιέργεια αίματος στην Πάτρα το 2011 (Drougka *et al*, 2012). Το δεύτερο περιστατικό αφορούσε ασθενή ανοσοκατεσταλμένο έπειτα από χημειοθεραπευτική αγωγή.

1.7.3.3. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ST398

Παράλληλα με τα MRSA ST398 στελέχη αναγνωρίστηκαν ως παθογόνα και τα MSSA στελέχη του ίδιου τύπου. Τα στελέχη αυτά φέρονται να σχετίζονται με λοιμώξεις ανθρώπων και χαρακτηρίστηκαν ως ανεξάρτητα της κτηνοτροφίας, αφού αναδύθηκαν αποκλειστικά από ανθρώπινης προέλευσης δείγματα χωρίς προηγηθείσα επαφή ή σχέση με ζώα (Uhlemann *et al*, 2012). Τα στελέχη αυτά έχουν απομονωθεί από περιστατικά βακτηριαμίας στην Ολλανδία αλλά και περιστατικό θανατηφόρου πνευμονίας στη Γαλλία (van Belkum *et al*, 2008; Rasigade *et al*, 2010). Επίσης, η ανεύρεση αυτού του τύπου *S. aureus* ως αιτιολογικού παράγοντα σε περιπτώσεις λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας στη Γαλλία έθεσε την υπόθεση της διασποράς ενός νέου παθογόνου κλώνου (Valentin-Domelier *et al*, 2011). Εκτός των ανωτέρω περιπτώσεων ο MSSA ST398 καταχωρήθηκε μεταξύ των κυρίαρχων κλώνων που προκαλούν λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων στην Κίνα (Zhao *et al*, 2012), ενώ στις Η.Π.Α. έχουν αναφερθεί περιστατικά λοιμώξεων αλλά και φορείας από MSSA ST398 στελέχη (Mediavilla *et al*, 2012).

Η συνολική ανάλυση των στελεχών του CC398 ανέδειξε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία διαφοροποίησαν τα MSSA από τα MRSA στελέχη. Η υπόθεση που διατυπώθηκε μετά από ολική αλληλούχιση του γονιδιώματος είναι ότι το CC398 το οποίο αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των LA-MRSA φαίνεται να προέρχεται από ένα προγονικό κλώνο MSSA ο οποίος έχει ανθρώπινη καταγωγή. Η μεταπίδηση του *S. aureus* από τους ανθρώπους στα ζώα συνοδεύτηκε από την απώλεια γονιδίων που

προσέδιδαν μολυσματική ικανότητα στα στελέχη και απόκτηση γονιδίων αντοχής εναντι της μεθικιλίνης και της τετρακυκλίνης (Price *et al.*, 2012).

Πιο συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν την ύπαρξη στα στελέχη ανθρώπινης προέλευσης του προφάγου *φSa3*, ο οποίος συνδέεται με το το ανθρωποειδικό ανοσολογικό συμπλεγμα διαφυγής (IEC) και με τα γονίδια *chr*, *sea*, *ser* και *scn*. Επίσης, η παρουσία συγκεκριμένων μονήρων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και η απουσία του γονιδίου της β-αιμολυσίνης (*hlyB*) αποτελούν τα στοιχεία βάσει των οποίων γίνεται δυνατή η διάκριση των στελεχών του CC398 στους κλάδους προέλευσης τους, ανθρώπινης ή ζωικής (Stegger *et al.*, 2013; Lekkerkerk *et al.*, 2015)

ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια δεν υπήρχαν πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα για τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο στην περιοχή της Θεσσαλίας, η οποία αποτελεί κατά βάση την κύρια κτηνοτροφική περιοχή στη χώρα μας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από ανθρώπους (λοιμώξη, φορεία) και ζώα (φορεία) στην περιοχή της Θεσσαλίας την τριετία 2012-2014.

- Αρχικά προσδιορίστηκαν τα ποσοστά αντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν από ανθρώπους και ζώα στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα (β-λακταμικά, MLS_B, τετρακυκλίνη) και ανιχνεύθηκαν τα υπεύθυνα γονίδια αντοχής.

- Στη συνέχεια ανιχνεύθηκαν στελέχη *S. aureus* ST398, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την κτηνοτροφία και μελετήθηκε η προέλευσή τους βάσει γενετικών χαρακτηριστικών.

- Τέλος σε ένα στέλεχος ST398 το οποίο είχε αντοχή στις λινκοσαμίδες και έφερε το *lnu*(B) γονίδιο χαρακτηρίστηκε το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

2.1 Στελέχη βακτηρίων

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) και καλύπτει τη χρονική περίοδο 2012-2014. Μελετήθηκαν συνολικά:

1. 1234 στελέχη *S. aureus* τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών από κλινικές και Εξωτερικά ιατρεία του ΠΓΝΛ.
2. 13 στελέχη *S. aureus* που προήλθαν από καλλιέργειες ρινικού ή ορθοπρωκτικού επιχρίσματος 512 ζώων παραγωγής και συντροφιάς (πρόβατα, αίγες, χοίροι, βοοειδή, άλογα, σκύλοι και γάτες) από την περιοχή της Θεσσαλίας την ίδια χρονική περίοδο.

2.2 Απομόνωση στελεχών

2.1.1 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων ασθενών

Τα κλινικά δείγματα που παραλήφθηκαν στο εργαστήριο καλλιεργήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υλικά, αναλυτικότερα επιστρώθηκαν σε MacConkey agar, αιματούχο άγαρ με περιεκτικότητα 5% αίμα προβάτου, σοκολατόχρωμο άγαρ, sabouraud άγαρ. Τα δείγματα επώαστηκαν για 18-22 ώρες σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C. Την επόμενη ημέρα αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των αποικιών και σε όσες χαρακτηρίστηκαν Gram-θετικοί κόκκοι ανακαλλιεργήθηκαν σε Mannitol Salt άγαρ για να ακολουθήσει η ταυτοποίηση και ο έλεγχος στους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.1.2 Καλλιέργεια ρινικού και ορθοπρωκτικού επιχρίσματος ζώων

Ο στυλεός έκαστου επιχρίσματος αρχικά εμβολιάσθηκε σε φρέσκο θρεπτικό ζωμό (Tryptic Soy Broth) στους 37°C για 24 ώρες με σκοπό τον εμπλουτισμό του δείγματος. Ακολούθησε ανακαλλιέργεια του ζωμού σε αιματούχο άγαρ με περιεκτικότητα 5% αίμα

προβάτου. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 ώρες, ενώ έγινε ανακαλλιέργεια των αποικιών που παρουσίαζαν διαφορές στη μορφολογία τους σε Mannitol Salt άγαρ. Ακολούθησε ταυτοποίηση και έλεγχος στους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.3 Ταυτοποίηση στελεχών ως *S. aureus*

Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως *S. aureus* σύμφωνα με τη μορφολογία των αποικιών των καλλιιεργημάτων στο στερεό θρεπτικό υλικό αιματούχο άγαρ και Mannitol Salt άγαρ, όπου μετά από επώαση σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂ στους 37°C για 24 ώρες, εμφανίζονταν οι χαρακτηριστικές για τον *S. aureus* λευκές έως χρυσοκίτρινες αποικίες που περιβάλλονταν από ζώνη αιμολύσεως και χρυσοκίτρινες αποικίες, αντίστοιχα. Ακολούθησε χρώση Gram, καθώς και οι δοκιμασίες ελέγχου παραγωγής καταλάσης και πηκτάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπως περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω. Παράλληλα, η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 (bioMérieux).

2.3.1 Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moyes *et al*, 2009). Ο μηχανισμός της χρώσης Gram συνδέεται με τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων και βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετνιακής και διάλυμα Lugol (ιώδιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, γεγονός που αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωμο από τη σαφρανίνη. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως είναι ο *S. aureus*, η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο του κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου της χρωστικής εντός του

κυττάρου. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με τη μεθοδολογία που ακολουθεί:

ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H₂O)
- Διάλυμα crystal violet (Iiofilchem)
- Διάλυμα Lugol PVP (Iiofilchem)
- Διάλυμα αποχρωματισμού (αιθανόλη και ακετόνη)
- Διάλυμα safranin (Iiofilchem)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)
- Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα crystal violet για 1 λεπτό και έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα Lugol PVP για 1 λεπτό κι έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Κάθε παρασκεύασμα αποχρωματίστηκε ξεπλένοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα decolorizing (αιθανόλη και ακετόνη) και ακολούθως μεταχρωματίστηκε καλύπτοντάς το με διάλυμα σαφρανίνης για 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, ξεπλύθηκε με νερό βρύσης, ξηράνθηκε μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και μικροσκοπήθηκε. Με τη διαδικασία που περιγράφηκε τα Gram αρνητικά βακτήρια χρωματίζονται αχνά κόκκινα, ενώ τα Gram θετικά και συνεπώς τα στελέχη *S. aureus*, χρωματίζονται σκούρα ιώδη.

2.3.2 Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης αποτελεί την πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή μεταξύ των Gram θετικών κόκκων. Είναι θετική για τους σταφυλόκοκκους, χαρακτηριστικό που τους διακρίνει από τους στρεπτόκοκκους και τους εντερόκοκκους, οι οποίοι είναι καταλάση αρνητικοί. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε H₂O και O₂ παράγοντας μικρές φυσαλίδες (Αρσένη, 2007). Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης των υπό μελέτη

απομονωθέντων στελεχών της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase (BioMérieux) με την εξής μέθοδο:

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ID Color Catalase-ASE (BioMérieux)
- Κρικοφόροι στυλεοί
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediaware)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά τοποθετήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μία σταγόνα ID έγχρωμη καταλάση. Στη συνέχεια λήφθηκε με κρικοφόρο στυλεό και τοποθετήθηκε εντός της σταγόνας μία αποικία ή μέρος αυτής του υπό μελέτη στελέχους. Τέλος, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ή μη φυσαλίδων εντός της σταγόνας. Αν το μικρόβιο παράγει καταλάση και συνεπώς είναι σταφυλόκοκκος, σχηματίζονται γρήγορα άφθονες μικρές φυσαλίδες εντός της σταγόνας.

2.3.3 Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης

Η παραγωγή πηκτάσης (κοαγκουλάσης) είναι η βασική διαχωριστική ιδιότητα με την οποία διακρίνονται τα στελέχη *S. aureus* (κοαγκουλάση-θετικά) από την ομάδα των υπόλοιπων κοαγκουλάση-αρνητικών (CoNS) σταφυλοκόκκων. Για το λόγο αυτό, η ανίχνευση του ενζύμου πηκτάση αποτελεί την κύρια δοκιμασία ταυτοποίησης του *S. aureus*.

Σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί παραπάνω, ο *S. aureus* φέρει δύο είδη πηκτάσης, τη συνδεδεμένη και την ελεύθερη. Η συνδεδεμένη πηκτάση βρίσκεται καθηλωμένη στο κυτταρικό τοίχωμα και μετατρέπει άμεσα το ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες, χωρίς τη συμμετοχή του παράγοντα του πλάσματος που μοιάζει με την προθρομβίνη (coagulase reating factor), προκαλώντας τη συγκόλληση και τη συσώρευση των σταφυλοκοκκικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, όπως επίσης προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη A βρίσκεται στην επιφάνεια στελεχών *S. aureus* και έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών σχεδόν όλων των θηλαστικών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιζημάτων ή διαλυτών συμπλεγμάτων (Murray *et al*, 2008).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Slidex Staph Plus Kit της BioMérieux για την ανίχνευση της παραγωγής συνδεδεμένης πηκτάσης, παρουσίας πρωτεΐνης A και άλλων επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, με σκοπό το χαρακτηρισμό των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών ως *S. aureus*. Πρόκειται για μία συγκολλητινοαντίδραση που γίνεται 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*, κατά την οποία πραγματοποιούνται: α) η μετατροπή του ινωδογόνου, παρουσία της συνδεδεμένης πηκτάσης, σε ινώδες, β) η αντίδραση του Fc τμήματος της IgG κουνελιού με την πρωτεΐνη A και γ) η δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ ειδικής IgG και επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, το αποτέλεσμα ερμηνεύεται από μία ορατή με γυμνό οφθαλμό αντίδραση συγκόλλησης. Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης πραγματοποιήθηκε με την εξής μεθοδολογία:

ΥΛΙΚΑ

- Εμπορικό αντιδραστήριο (Slidex Staph Plus Kit, bioMérieux)
- Καλλιεργήματα σταφυλοκόκκων σε αιματούχο άγαρ
- Αναλώσιμες κάρτες πεδίων αντίδρασης
- Κρικοφόροι στυλεοί

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στον ένα κύκλο μίας αναλώσιμης κάρτας πεδίων αντίδρασης τοποθετήθηκε μία σταγόνα αντιδραστήριου, σε θερμοκρασία δωματίου (18°-25°C), η οποία με τη βοήθεια ενός κρικοφόρου στυλεού αναμείχθηκε με 3-6 μικρές αποικίες του προς μελέτη μικροοργανισμού. Έπειτα από 20 δευτερόλεπτα κυκλικής ανάδευσης, παρατηρήθηκε η αντίδραση κάτω από κανονικές συνθήκες φωτισμού και χωρίς τη χρήση μεγεθυντικού φακού. Αν ο σταφυλόκοκκος παράγει συνδεδεμένη κοαγκουλάση και συνεπώς πρόκειται για *S. aureus*, η δοκιμασία είναι θετική, καθώς παρατηρείται μία ορατή αντίδραση συγκόλλησης. Στην πράξη στο εναιώρημα θα σχηματιστούν αμέσως κατά την ανάδευση πήγματα μικρά και μεγάλα.

2.3.4 Ταυτοποίηση με το Αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 (bioMérieux)

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης βάσει των παραπάνω διαδικασιών επιβεβαιώθηκαν με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 (bioMérieux). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η κάρτα ταυτοποίησης Gram-θετικών μικροοργανισμών GP, που περιλαμβάνει 43 βιοχημικές δοκιμασίες, συμπεριλαμβανομένων 17 ενζυμικών δοκιμασιών, οι οποίες ερμηνεύονται με κινητικό τρόπο δίνοντας αποτέλεσμα εντός 8 ωρών (Funke and Funke-Kissling, 2005.). Η ταχεία ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους 120 διαφορετικών ειδών καθιστά βασική τη συγκεκριμένο μέθοδο για τη λειτουργία του μικροβιολογικού εργαστηρίου.

2.4 Έλεγχος αντοχής σε αντιβιοτικά

2.4.1 Έλεγχος ευαισθησία με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* με χρήση του αυτόματου συστήματος Vitek-2 (bioMerieux). Πρόκειται για ένα καινοτόμο σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στα νοσοκομεία τόσο για τη γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, όσο και για τον έλεγχο της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Το σύστημα περιλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, με διαθέσιμη την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα αποτελέσματα, καθώς και βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Ο ταχύς χρόνος απόκρισης συνεπάγεται την πιο γρήγορη και άμεση διεξαγωγή των αποτελεσμάτων σε σχέση με οποιαδήποτε χειροκίνητη τεχνική ταυτοποίησης και ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, κατά τον έλεγχο αντοχής ή ευαισθησίας των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus* στους διάφορους αντισταφυλοκοκκικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα αντιβιοτικά οξακυλλίνη (oxacillin), κεφοξιτίνη (cefoxitin), κλινταμυκίνη (clindamycin) και ερυθρομυκίνη (erythromycin). Τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν ως MRSA ή MSSA ανάλογα με την αντοχή ή ευαισθησία τους, αντίστοιχα, στα δύο

αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά οξακιλλίνη (oxacillin) και κεφοξιτίνη (cefoxitin) ταυτόχρονα, βάσει του αντιβιογράμματος.

2.4.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται στα διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, κατάλληλο μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υλικού. Στην συνέχεια τοποθετείται δίσκος από διηθητικό χαρτί, εμποτισμένος με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού. Όταν ο χάρτινος δίσκος έρθει σε επαφή με την υγρή επιφάνεια του υλικού, προσροφά νερό και το αντιβιοτικό διαχέεται στο υλικό που τον περιβάλλει.

Η μέθοδος για να έχει ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα πρέπει να ακολουθεί ορισμένους κανόνες σχετικά με τα θρεπτικά υλικά, το εναιώρημα που ενοφθαλμίζεται, τους δίσκους αντιβιοτικών, την επώαση και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Ως θρεπτικό υλικό συνιστάται να χρησιμοποιείται το Mueller Hinton Agar (MHA), που αποτελεί καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των περισσοτέρων παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, έχει μικρή περιεκτικότητα σε ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των σουλφοναμιδών, τετρακυκλινών και αμινογλυκοσιδών. Επιπλέον, το υλικό είναι ισότονο με το αίμα και το pH του δε μεταβάλλεται σημαντικά κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Στην περίπτωση ελέγχου της ευαισθησίας στην oxacillin συνιστάται η προσθήκη 2% NaCl στο θρεπτικό μέσο, ώστε να ανιχνεύονται και τα οριακής αντοχής στελέχη, με μεγάλη ετερογένεια πληθυσμού (Lennette *et al*, 1985).

Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται σε τρεις διευθύνσεις, εκτός αν το πάχος του υλικού είναι πολύ μικρό, οπότε πολύ γρήγορα (όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στον πυθμένα είναι ίδια με αυτήν στην επιφάνεια) γίνεται σε δυο διευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται ζώνη αναστολής με μεγαλύτερη διάμετρο. Αντίθετα, αν το πάχος του θρεπτικού υλικού είναι μεγαλύτερο από 4 mm, γίνεται μεγαλύτερη διάχυση του αντιβιοτικού προς το βάθος, με αποτέλεσμα μικρότερες ζώνες αναστολής. Ταυτόχρονα με τη διάχυση του αντιβιοτικού, τα βακτήρια που έχουν επιστρωθεί στο θρεπτικό υλικό αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν

η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την MIC, επιδρά σε ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή της ανάπτυξής του. Αυτό εξηγεί και την εξάρτηση της ζώνης αναστολής από το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού και την ταχύτητα διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ.

Η πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Αν οι δίσκοι και το θρεπτικό υλικό είναι σταθερά, ο κυριότερος παράγοντας για την επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι η πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος. Μεγάλη πυκνότητα εναιωρήματος έχει σαν αποτέλεσμα να διαμορφώνονται ζώνες αναστολής μικρότερης διαμέτρου. Οι δίσκοι των αντιβιοτικών αποτελούνται από διηθητικό χαρτί και έχουν διάμετρο 6 mm. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο δίσκο είναι προκαθορισμένη από τον κατασκευαστή. Τοποθετούνται με αποστειρωμένη λαβίδα, 5-15 λεπτά μετά τον ενοφθαλμισμό του βακτηρίου, ώστε να απορροφηθεί η υγρασία και σε απόσταση όχι μικρότερη των 24 mm από κέντρο σε κέντρο των δίσκων, ώστε να μην αλληλεπικαλύπτονται οι ζώνες αναστολής (Δημητρακόπουλος, 1987). Η επώαση των τρυβλίων γίνεται στους 37°C για 18-24 ώρες. Πρέπει να αρχίζει το αργότερο 15 λεπτά μετά την τοποθέτηση των δίσκων για να αποφεύγεται η υπερδιάχυση του αντιβιοτικού και να πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες (χωρίς CO₂). Για την ανίχνευση της αντοχής του *S. aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε ο δίσκος της cefoxitine. Έχει αποδειχθεί ως ο καλύτερος επαγωγέας της έκφρασης της PBP2a στις συνήθεις συνθήκες του αντιβιογράμματος και επομένως εφαρμόζεται ως δείκτης ανίχνευσης των MRSA στελεχών (CLSI).

ΥΛΙΚΑ

- Mannitol Salt Agar(bioMérieux)
- Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco)
- MuellerHintonAgar(bioMérieux)
- Δίσκοι εμποτισμένοι με αντιβιοτικό (MastGroup)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Από 18ωρη στερεή καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε Mannitol Salt Agar, παρασκευάστηκε βακτηριακό εναιώρημα σε 1 mL Tryptic Soy Broth (TSB) θολερότητας ίσης με το 0.5 του προτύπου θολοσιμετρικού διαλύματος της κλίμακας McFarland, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε απ' ευθείας. Το βακτηριακό εναιώρημα επιστρώθηκε σε

τρουβλίο εσωτερικής διαμέτρου 9 cm με Mueller Hinton άγαρ, με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Μετά την παρέλευση 10-15 λεπτών τοποθετήθηκαν οι εμποτισμένοι με αντιβιοτικό δίσκοι και τα τρυβλία επώασθησαν στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε η ανάγνωση των αποτελεσμάτων με μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής. Ως όριο της ζώνης αναστολής θεωρείται το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι. Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων συντάσσεται η έκθεση ευαισθησίας του μικροβίου, το αντιβιογράμμα.

2.4.3 Ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test)

Η αρχή του E-test στηρίζεται στο συνδυασμό των μεθόδων της διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και του προσδιορισμού της MIC με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ. Το E-test είναι μια ταινία διαστάσεων 0.5 mm X 6 mm και περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού. Επειδή ακριβώς, οι τιμές της MIC στο E-test ορίζονται από μια προκαθορισμένη και συνεχή σταθερά συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν έγινε προσδιορισμός της MIC στην oxacillin. Ιστορικά, η αντοχή στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες έχει αναφερθεί ως «αντοχή στη methicillin». Τα ανθεκτικά στη methicillin στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίζονται ως MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*), αν και η methicillin δεν είναι πλέον το αντιβιοτικό επιλογής για έρευνα ή για θεραπεία. Η oxacillin προτιμάται, γιατί είναι πιο ανθεκτική στις συνθήκες φύλαξης και συμβάλλει στην ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών στελεχών με ετερογένεια αντοχής.

Ο *S. aureus* παρουσιάζει δυο μορφές αντοχής στη methicillin, την ετερογενή και την ομοιογενή. Στην ετερογενή αντοχή δεν έχει την ίδια MIC όλος ο μικροβιακός πληθυσμός. Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού έχει χαμηλή MIC κι ένας μικρός μόνο υποπληθυσμός έχει υψηλή MIC. Αντίθετα, στην ομοιογενή αντοχή, όλος ο μικροβιακός πληθυσμός εμφανίζει την ίδια υψηλή MIC (Lennette *et al.*, 1985).

ΥΛΙΚΑ

- Mannitol Salt Agar(bioMérieux)
- Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco)
- Mueller Hinton agar, 2% NaCl(bioMérieux)
- Ταινίες E-test εμποτισμένες με oxacillin (bioMérieux)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Από 18ωρη στερεή καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε Mannitol Salt Agar, παρασκευάστηκε βακτηριακό εναιώρημα σε 1 mL Tryptic Soy Broth (TSB) θολερότητας ίσης με το 0.5 του προτύπου θολοσιμετρικού διαλύματος της κλίμακας McFarland, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε απ' ευθείας. Το βακτηριακό εναιώρημα επιστρώθηκε σε τρυβλίο εσωτερικής διαμέτρου 9 cm με Mueller Hinton Agar εμπλουτισμένου με 2% NaCl, με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε μια ταινία E-test και τα τρυβλία επώσθησαν στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης έγινε η ανάγνωση των αποτελεσμάτων και η MIC προσδιορίστηκε ως η τιμή που αναγράφεται στην ταινία στο σημείο που σταματάει η ανάπτυξη του βακτηρίου, συμπεριλαμβάνοντας ακόμα και τις μεμονωμένες αποικίες. Κάθε E-test ελέγχει τιμές 0.16-256 µg/mL. Οι μεμονωμένες αποικίες που μπορεί να αναπτυχθούν μέσα στη ζώνη αναστολής, λόγω χαμηλού επιπέδου μετάλλαξης, σύμφωνα με τα πρότυπα της CLSI, ορίζουν την τιμή της MIC. Η λεπτή γραμμή ανάπτυξης μικροβιακού πληθυσμού γύρω από την ταινία του E-test αγνοήθηκε (Baker *et al.*, 1991).

II. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατα τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, έγινε αρχικά απομόνωση DNA από τα στελέχη της μελέτης και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μοριακές τεχνικές. Πρωταρχική θέση στις τεχνικές έχει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με την οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία των γονιδίων αντοχής. Επίσης, η παραπάνω τεχνική χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA στην τυποποίηση των στελεχών βάσει της μεθόδου MLST και *spr*. Τέλος, εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές μοριακής βιολογίας για το χαρακτηρισμό του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου αντοχής *lnu(B)*.

Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

2.4.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα

Το DNA αποτελεί απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής ιατρικής και κατ' επέκταση της μοριακής μικροβιολογίας. Η απελευθέρωσή του γενωμικού υλικού σε διαλυτή μορφή, μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων αποτελεί την προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία συμπεριλαμβανομένης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Συνεπώς, μετά την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus* βάσει των φαινοτυπικών διαδικασιών που περιγράφηκαν παραπάνω, ακολούθησε η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA τους.

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού επιτυγχάνεται συνήθως με μεθόδους που στηρίζονται στη λύση των κυττάρων με το ένζυμο της πρωτεϊνάσης K υπό την παρουσία αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και ενός ανιονικού απορρυπαντικού διαλύτη (όπως Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (Lazarevic *et al.*,2013). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης του χρωμοσωμικού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

- Αιματούχο άγαρ(bioMérieux)
- Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer) (V_τ=50 mL):
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5(ThermoFisher SCIENTIFIC)
 - 1% Triton X-100(RESEARCH ORGANICS)
 - 1 mM EDTA, pH 8.0 (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- ΠρωτεϊνάσηK (20 mg/mL) (ThermoFisher SCIENTIFIC)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Εναιώρημα βακτηρίων θολερότητας 2 της κλίμακας McFarland σε 1 mL dH₂O από 24ωρη καλλιέργεια, στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αιματούχο άγαρ, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 13000 rpm. Έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μL λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος και

2 μL πρωτεΐνάσης K και επώασθη για μία ώρα στους 56°C. Μετά το πέρας της επώασης, το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με θέρμανση για 10 λεπτά στους 95°C. Ακολούθησε φύλαξη των δειγμάτων του ληφθέντος DNA στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση και ενίσχυση – πολλαπλασιασμό με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

2.4.5 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA υψηλής ποιότητας.

Η εκχύλιση του DNA απαιτεί την λύση των κυττάρων, την απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών και τον διαχωρισμό του από τα κυτταρικά υπολείμματα. Η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, πρέπει να είναι αφενός ισχυρή ώστε να τμηματοποιήσει το βακτηριακό κύτταρο και αφετέρου ήπια ώστε να διατηρηθεί ακέραιο το DNA. Η απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών πραγματοποιείται με τη χρήση ισχυρών χαοτροπικών αλάτων, ενώ η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα ή κατακρήμνιση.

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA με την παρακάτω μέθοδο επιτυγχάνει την εκχύλιση ποιοτικού (μη κατακερματισμένου) γενωμικού υλικού ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών.

ΥΛΙΚΑ

- T.E buffer: Tris-HCl 1M (pH 8.0), EDTA 0.5M, ddH₂O
- RNάση (20mg/ml) (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- λυσοζύμη (200mg/ml) (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- EDTA 0.25M (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- CTAB 10%(Hexadecyltrimethylammonium bromide, SIGMA_ALDRICH)
- SDS 20% (Sodium dodecyl sulfate, SIGMA_ALDRICH)
- πρωτεΐνάσηK (20mg/ml)(ThermoFisher SCIENTIFIC)
- NaCl 5M (Scharlau)
- φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκόολη 25:24:1 (Scharlau)
- ισοπροπανόλη (Scharlau)
- αιθανόλη 70% (Scharlau)
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό Luria-BertaniBroth τελικού όγκου 20ml από μία αποικία του στελέχους από στερεό θρεπτικό υλικό επώαστηκε για 16-18 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 14.000 rpm. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 500μl TE και προστέθηκαν 8μl λυσοζύμης και 2μl RNAάσης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Προστέθηκαν 96μl EDTA, 64μl SDS και 4μl πρωτεϊνάσης K και συνεχίστηκε η επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 72μl NaCl και 60μl CTAB, το μείγμα επώαστηκε για 20 λεπτά στους 65°C. Έπειτα, προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκόολης και ακολούθησε ανάδευση με vortex μέχρι το μείγμα να λάβει τη μορφή ομοιόμορφου γαλακτώματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέο erpendorf και επαναπροστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκόολης και ακολούθησε ανάδευση με vortex μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιόμορφο γαλάκτωμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14.000 rpm σε 4° C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε πολύ προσεκτικά σε νέο erpendorf και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Ακολούθησε αργή και ήπια ανάδευση μέχρι να σχηματιστούνε διαφανείς/λευκές ινες (DNA). Ακολούθησε επώαση του μείγματος για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και για 15 λεπτά στους -80°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 14.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά και προστέθηκαν 700μl 70% αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 14.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Η αιθανόλη απορρίφθηκε προσεκτικά και το ίζημα στεγνώθηκε σε κλίβανο στους 37°C. Έπειτα το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 40μl ddH₂O για 16-18 ώρες στους 4°C.

2.4.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Για την απομόνωση πλασμιδίων μιας βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (Birnboim και Doly, 1979, Ish-Horowicz and Burke, 1981), που αποδίδει πλασμίδια υψηλού βαθμού καθαρότητας και συγκέντρωσης (5 μg πλασμιδιακού DNA/ 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας). Αρχικά η κατεργασία των κυττάρων γίνεται με διάλυμα που περιέχει γλυκόζη, EDTA και Tris, ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της ισοτονικότητάς τους (και επομένως να αποφεύγεται η

ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ωσμωτικής πίεσης), η παρεμπόδιση δράσης νουκλεασών και η διατήρηση του pH αντίστοιχα. Η αλκαλική μέθοδος συνίσταται στην αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών των βακτηρίων. Το απορρυπαντικό SDS αποδιάττει τις πρωτεΐνες και διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα με την απομάκρυνση λιπιδίων ώστε να εξέλθουν τελικά τα μόρια του πλασμιδιακού και όχι του χρωμοσωμικού DNA. Το NaOH λειτουργεί ως αποδιατακτικό του DNA καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου και επιτρέποντας την ελεγχόμενη ρήξη των μεμβρανών. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οξικού καλίου εξουδετερώνονται οι αλκαλικές συνθήκες λύσης, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζονται ως αδιάλυτα σύμπλοκα τα κυτταρικά υπολείμματα και οι πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με το SDS. Ταυτόχρονα κατακρημνίζεται και ένα μεγάλο ποσοστό του χρωμοσωμικού DNA που έχει προσδεθεί στις μεμβράνες. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή και παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση από το υπερκείμενο. Η απομόνωσή του ολοκληρώνεται μετά από εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης (ελεύθερο DNAασών), ώστε να αποικοδομηθούν τα μόρια βακτηριακού RNA.

ΥΛΙΚΑ

- GET: 50mM Glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA (pH 8.0) (ThermoFisher SCIENTIFIC, Scharlau)
- Alkali: 0,2N NaOH, 1% SDS (SIGMA_ALDRICH)
- CH₃COOK: 5M potassium acetate, glacial acetic acid, H₂O (pH 4.8) (Scharlau)
- TERNAase (RNase A, σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml) (ThermoFisher SCIENTIFIC)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο. Σε σωληνάριο τύπου erpendorf μεταφέρθηκε ποσότητα της βακτηριακής καλλιέργειας (1.5 ml) και φυγοκεντρήθηκε σε 3.000 g για 3 λεπτά για τη συλλογή των κυττάρων. Τα κύτταρα σχημάτισαν ίζημα και το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl παγωμένου διαλύματος GET και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 200 µl πρόσφατα παρασκευασμένου

διαλύματος Alkali, στη συνέχεια έγινε ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 3-5 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 150 μl παγωμένου διαλύματος CH₃COOK και το μείγμα επωάστηκε στον πάγο για 6-8 λεπτά μετά από ήπια ανάδευση. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 12.000 g για 10 λεπτά, και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κατακρήμνυση με ισοπροπανόλη-αλκοόλη 70% και αναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE-RNάσης A. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύθηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση του.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία βιοχημική *in vitro* αντίδραση, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. Αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 και είναι μία θεμελιώδης και συγχρόνως απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊνικών θραυσμάτων σε ένα δείγμα. Το 1989 κρίθηκε ως «η μέγιστη επιστημονική ανακάλυψη της χρονιάς», ενώ μέσα σε λίγα χρόνια και μετά από σημαντικές βελτιώσεις, κυρίως από τον Saiki RK, κατέστη η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση-πολλαπλασιασμό των νουκλεϊνικών οξέων, κυρίως του DNA.

Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR ένα μητρικό τμήμα DNA ενισχύεται ώστε να δημιουργηθούν πολλαπλά αντίγραφα αυτού. Το θερμοανθεκτικό ένζυμο DNA πολυμεράση καταλύει τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Η πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτιδιο στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται επιμήκυνση με κατεύθυνση 5' - 3'. Για την εκκίνηση της δράσης της πολυμεράσης είναι απαραίτητες οι 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. (Saiki *et al.*, 1988)

Η διαδικασία της αντίδρασης διακρίνεται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται 30-40 φορές (κύκλοι της αντίδρασης). Τα στάδια είναι i) η αποδιάταξη του DNA (denaturation), το οποίο πραγματοποιείται με θέρμανση του μείγματος μέχρι περίπου στους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου, όσο και των εκκινητών, που πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή, ii) η αναδιάταξη ή ανασύνδεση ή υβριδισμός (annealing) των εκκινητών, κατά το οποίο πραγματοποιείται αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης το μείγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40°C έως 70°C. Στο στάδιο αυτό ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου, iii) η επιμήκυνση (extension), κατά το οποίο πραγματοποιείται συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από την DNA πολυμεράση με συνήθη θερμοκρασία του σταδίου περίπου 72°C. Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Με τη συμπλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ακολούθως ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά.

ΥΛΙΚΑ

- DNA βακτηρίου
- WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Taq DNA πολυμεράση 5u/μL (Fermentas)
- 10x Taq Buffer με KCl (Fermentas) (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
- MgCl₂: 25 mM (Fermentas)
- Primer 1: 100 pmol/μL
- Primer 2: 100 pmol/μL
- Μείγμα dNTPs: 100mM (Fermentas)
- DNA Engine Peltier Thermal Cyclers (BIO-RAD, USA)

- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- Αυτόματος αναδευτήρας Vortex (BICASA)
- Σωληνάρια erpendorf για PCR
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
- Αποστειρωμένα ρύγχη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εκτέλεση της PCR παρασκευάστηκε το μείγμα έκαστης αντίδρασης αναμειγνύοντας σε erpendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες των εξής αντιδραστηρίων: DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση, 10x Taq Buffer με KCl, MgCl₂, primer 1, primer 2, μείγμα dNTPs και WFI. Η ακριβής σύνθεση του μείγματος της αντίδρασης της PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 50μL αναφέρεται στον πίνακα 2.1 που ακολουθεί:

Πίνακας 2. 1: Σύνθεση μείγματος αντίδρασης PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	5
MgCl ₂ (25mM)	3
Μείγμα dNTPs (20mM)	1
Primer 1 (25 pmol/μL)	0.5
Primer 2 (25 pmol/μL)	0.5
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.4
dH ₂ O	34.6
DNA βακτηρίου	5
Τελικός όγκος	50

Στις περιπτώσεις που ο τελικός όγκος της αντίδρασης της PCR είναι 50 μL, το μείγμα της αντίδρασης αναμειγνύεται ήπια με Vortex και μοιράζονται σε ένα erpendorf 45 μL αυτού. Τέλος, προστίθενται σε κάθε erpendorf 5 μL από κάθε δείγμα βακτηριακού DNA και όλα τα erpendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής του χειριστή, αναλόγως της αντίδρασης.

2.6 Ανίχνευση γονιδίων αντοχής

2.6.1 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στη μεθικιλίνη.

Όλα τα στελέχη, ανεξάρτητα από τη φαινοτυπική τους ευαισθησία ή αντοχή στη μεθικιλίνη, εξετάστηκαν με PCR για την παρουσία των γονιδίων *mecA* και *mecC*, δεδομένου ότι βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί στελέχη που ενώ φέρουν τα εν λόγω γονίδια και τα οποία είναι φαινοτυπικά ευαίσθητα. Για το γονίδιο *mecA* χρησιμοποιήθηκαν δύο ευθείς εκκινητές, ο P1 (Petinaki *et al.*, 2001) και ο P2 (Murakami *et al.*, 1991) και ένας αντίστροφος, ο P3 (Murakami *et al.*, 1991). Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις με τα ζεύγη εκκινητών P1-P3 και P2-P3, που έδωσαν προϊόντα 1046 και 530 bp, αντίστοιχα. Οι εκκινητές και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης φαίνονται στους πίνακες 2.2 και 2.3. Για την ανίχνευση του γονιδίου *mecC* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που φαίνονται στον πίνακα 2.4 σε αντίστοιχες συνθήκες κυκλοποίησης, πίνακας 2.5 (García-Álvarez *et al.*, 2011).

Πίνακας 2. 2: Εκκινητές γονιδίου *mecA*.

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
P1	5'-GGT CCC ATT AAC TCT GAA G-3'	Petinaki <i>et al.</i> , 2001
P2	5'-ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'	Murakami <i>et al.</i> , 1991
P3	5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	Murakami <i>et al.</i> , 1991

Πίνακας 2. 3: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίου *mecA*

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>mecA</i>	95°C ► 4min	95°C ► 1min	58°C ► 1min	72°C ► 2min	35	72°C ► 10min

Πίνακας 2. 4: Εκκινητές γονιδίου *mecC*

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>mecC</i> -F	GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC	García-Álvarez <i>et al.</i> , 2011
<i>mecC</i> -R	GAA GAT CTT TTC CGT TTT CAG C	

Πίνακας 2. 5: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίου *mecC*

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>mecC</i>	94°C ► 5min	94°C ► 1min	56°C ► 50 sec	72°C ► 50 sec	35	72°C ► 3min

2.6.2 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή σε Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη Β (MLS_B)

Η αντοχή των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών στην ομάδα των MLS_B αντιβιοτικών (Μακρολίδες- Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη β), επιβεβαιώθηκε με PCR ξεχωριστά για την ανίχνευση του κάθε υπεύθυνου γονιδίου αντοχής. Ελέγχθηκαν οι παρακάτω μηχανισμοί αντοχής για τη συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών

i) τροποποίηση στόχου δράσης: αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό αντοχής. Η τροποποίηση γίνεται μέσω τουλάχιστον 36 διαφορετικών rRNA μεθυσών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *erm*. Στη μελέτη ελέγχθηκαν τα γονίδια *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)* (πίνακας 2.6)

ii) αντλίες εκροής: Οι αντλίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mef*, *msr*, *vga* και *lsa*. Τα γονίδια *mef* και *msr* προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες και στρεπτογραμμίνη Β, ενώ τα γονίδια *vga* και *lsa(C)* προσδίδουν αντοχή στις λινκοσαμίδες και την στρεπτογραμμίνη Α. Στη μελέτη ελέγχθηκαν τα γονίδια *msrA*, *vgaA*, *vgaB* (πίνακας 2.6)

iii) υδρολυτικά ένζυμα: Πρόκειται για έναν μηχανισμό κατά τον οποίο η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού καταλύεται από φωσφορυλάσες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mph* και προσδίδουν αντοχή μόνο στις μακρολίδες, τα γονίδια *lnu* τα οποία προσδίδουν αντοχή στη λινκομυκίνη ή τρανσφεράσες οι οποίες συμβάλλουν στην αντοχή στην στρεπτογραμμίνη Α. Στη μελέτη ελέγχθηκαν τα γονίδια *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)* (πίνακας 2.6.) (Leclercq, 2002; Pyörialä *et al*, 2014)

Στον πίνακα 2.7 παρατίθενται οι συνθήκες ανίχνευσης των διαφόρων γονιδίων.

Πίνακας 2. 6: Εκκινητές γονιδίων αντοχής για τα MLS_B αντιβιοτικά

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>ermA-F</i>	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermA-R</i>	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	

<i>ermB</i> -F	GAA AAG GAT CTC AAC CAA ATA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermB</i> -R	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	
<i>ermC</i> -F	TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermC</i> -R	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT	
<i>ermT</i> -F	GGT GTA ATT ATG TAA CCG CCA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermT</i> -R	ACT TCC TGT AGC TGT GCT TTC	
<i>msrA</i> -F	GCA AAT GGT GTA GGT AAG ACA ACT	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>msrA</i> -R	ATC ATG TGA TGT AAA CAA AAT	
<i>vga(A)</i> -F	CTT GTC TCC TCC GCG AAT AC	Soltani <i>et al.</i> , 2000
<i>vga(A)</i> -R	AGT GGT GGT GAA GTA ACA CG	
<i>vga(B)</i> -F	GCG ACC ATG AAA TTG CTC TC	Soltani <i>et al.</i> , 2000
<i>vga(B)</i> -R	TGA CAA TAT GAG TGG TGG TG	
<i>lnu(A)</i> -F	GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA TTA ACT GG	Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>lnu(A)</i> -R	GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT TTT CGA	
<i>lnu(B)</i> -F	CCT ACC TAT TGT TTG TGG AA	Bozdogan <i>et al.</i> , 1999
<i>lnu(B)</i> -R	ATA ACG TTA CTC TCC TAT TC	
<i>lnu(C)</i> -F	GTAGATGCTCTTCTTGGAT	Gravey <i>et al.</i> , 2013
<i>lnu(C)</i> -R	TTCTACCGGAAAACAATCC	
<i>lnu(D)</i> -F	ATG GTA AAT AAT AAA GCA GAT	Gravey <i>et al.</i> , 2013
<i>lnu(D)</i> -R	TTA CTT GTA TTC ACT AGG	

Πίνακας 2. 7: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίων αντοχής σε MLS_B αντιβιοτικά

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>vga(B)</i>	94°C ► 3min	94°C ► 1min	55°C ► 1min	72°C ► 1min	35	72°C ► 10min
<i>erm(C)</i>	94°C ► 5min	95°C ► 1min	52°C ► 1min	72°C ► 1min	35	72°C ► 6min
<i>erm(T)</i>	95°C ► 5min	94°C ► 30 sec	52°C ► 1min	72°C ► 2min	35	72°C ► 6min
<i>msrA</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>lnu(C)</i> , <i>lnu(D)</i>	95°C ► 5min	94°C ► 30 sec	55°C ► 30sec	72°C ► 1min	30	72°C ► 10min
<i>lnu(B)</i>	95°C ► 5min	94°C ► 30 sec	50°C ► 45sec	72°C ► 1min	35	72°C ► 10min

2.6.3 Ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στην τετρακυκλίνη

Στελέχη τα οποία εμφάνισαν φαινοτυπική αντοχή στην τετρακυκλίνη μελετήθηκαν για παρουσία των *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* γονιδίων. Στον πίνακα 2.8 και 2.9 περιγράφονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 2. 8: Εκκινητές γονιδίων αντοχής στην τετρακυκλίνη

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>tetK</i> -F	TAT TTT GGC TTT GTA TTC TTT CAT	Trzcinski <i>et al</i> , 2000
<i>tetK</i> -R	GCT ATA CCT GTT CCC TCT GAT AA	
<i>tetL</i> -F	ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT	
<i>tetL</i> -R	AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT	
<i>tetO</i> -F	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	
<i>tetO</i> -R	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	
<i>tetM</i> -F	GAA CTC GAA CAA GAG GAA AGC	Olsvik <i>et al</i> , 1995
<i>tetM</i> -R	ATG GAA GCC CAG AAA GGA T	

Πίνακας 2. 9: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίων αντοχής στην τετρακυκλίνη

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetO</i>	95°C ► 5min	95°C ► 1min	59°C ► 1min	72°C ► 90 sec	30	72°C ► 7min
<i>tetM</i>	94°C ► 4min	94°C ► 30 sec	54°C ► 30 sec	72°C ► 90 sec	45	72°C ► 5min

2.7 Μοριακή τυποποίηση στελεχών

2.7.1 Τυποποίηση βάσει Multi Locus Sequence Typing, (MLST)

Ο Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας DNA (Multi Locus Sequence Typing, MLST) είναι η μέθοδος που επιλέχθηκε για την μοριακή τυποποίηση των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus*. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτές αρχές (Enright *et al.*, 2000). Κεντρικό σημείο στην εφαρμογή της μοριακής

μεθόδου MLST αποτελεί η παροχή ενημερωμένων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, στις οποίες η πρόσβαση είναι ελεύθερη. Αυτές οι βάσεις δεδομένων αποτελούν τη βάση μιας κοινής γλώσσας για τη μοριακή τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών σε διεθνές επίπεδο.

Από τα στελέχη *S. aureus* που τυποποιούνται αρχικό βήμα είναι η εκχύλιση του γενετικού υλικού και στη συνέχεια οι αντιδράσεις PCR για κάθε ένα από τα επτά γονίδια που συνθέτουν το αλληλικό προφίλ του στελέχους. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων, μήκους περίπου 450 bp, ακολουθεί η αλληλούχισή τους (sequencing). 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, καθώς 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 (Aanensen and Spratt, 2005). Στους πίνακες 2.10 και 2.11 φαίνονται οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων και οι συνθήκες PCR.

Πίνακας 2. 10: Εκκινητές γονιδίων μεθόδου MLST

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>arcC</i> -Up	TTGATTCCACCAGCGCGTATTGTC	Enright <i>et al</i> , 2000
<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTCCACATTC	Enright <i>et al</i> , 2000
<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTGATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	Enright <i>et al</i> , 2000
<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	

<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	Enright <i>et al.</i> , 2000
<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i> -Up	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG	Enright <i>et al.</i> , 2000
<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i> -Up	TCG TTCATTCTGAACGTCGTGAA	Enright <i>et al.</i> , 2000
<i>tpi</i> -Dn	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	Enright <i>et al.</i> , 2000
<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Πίνακας 2. 11: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίων MLST μεθόδου

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
MLSTSTAPH	94°C ► 5min	94°C ► 1min	55°C ► 1min	72°C ► 2min	30	72°C ► 10min

2.7.2 Τυποποίηση βάσει του γονιδίου της *Staphylococcus protein A (spa typing)*

Η τυποποίηση του *S. aureus* βάσει του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*spa*) αποτελεί μέθοδο μονοτοπικής αλληλούχισης. Έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο σε επιδημιολογικές μελέτες αφού επιτρέπει την ταχεία τυποποίηση των στελεχών. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες της πρωτεΐνης υπόκεινται σε μεταλλάξεις, απώλεια βάσεων ή και απόκτηση νέων. Οι επαναλήψεις αυτές συνθέτουν ένα κωδικό ο οποίος αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο τύπο κατά *spa* (Harmsen *et al.*, 2003). Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της πρωτεΐνης A παρατίθεται στον πίνακα 2.12 και οι συνθήκες PCR στον πίνακα 2.13.

Πίνακας 2. 12: Εκκινητές γονιδίου *spa*

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>spa</i> -1113F	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C	Werbick <i>et al.</i> , 2007
<i>spa</i> -1514R	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	

Πίνακας 2. 13: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίου *sra*

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>sra</i>	95°C ► 5min	95°C ► 30 sec	60°C ► 30 sec	72°C ► 45 sec	30	72°C ► 5min

2.7.3 Τυποποίηση κατά *agr*

Η τυποποίηση κατά *agr* γίνεται με μέθοδο πολλαπλής PCR (multiplexPCR), αφού χρησιμοποιούνται πέντε εκκινητές με σκοπό την ενίσχυση διαφορετικού μεγέθους τμημάτων, ανάλογα με την ποικιλομορφία του εκάστοτε γονιδίου. Το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύθηκε αντιστοιχεί σε διαφορετικό τύπο *agr*. Στον πίνακα 2.14 και 2.15 παρατίθενται οι εκκινητές και οι συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 2. 14: Σχημα εκκινητών τυποποίησης *agr*

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp) - <i>agr</i> τύπος	Βιβλ/κη αναφορά
<i>agr1</i>	GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT	439 - I	Lina <i>et al.</i> , 2003
<i>agr2</i>	TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC	572 - II	
<i>agr3</i>	GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA	321 - III	
<i>agr4</i>	CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG	657 - IV	
Pan	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C		

Πίνακας 2. 15: Συνθήκες κυκλοποίησης τυποποίησης *agr*

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>agr</i>	94°C ► 5min	94°C ► 30 sec	55°C ► 30 sec	72°C ► 60 sec	30	72°C ► 10min

2.7.4 Διάκριση προέλευσης στελεχών CC398

Η διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών που απαρτίζουν το κλωνικό σύμπλεγμα που σχετίζεται με την κτηνοτροφία, γίνεται βάσει της προέλευσης αυτών. Τα στελέχη δύνανται να προέρχονται είτε από τον ζωικής προέλευσης κλάδο που είχε

χαρακτηριστεί αρχικά και περιλαμβάνει κυρίως τα στελέχη MRSA, είτε από τον ανθρώπινο κλάδο που ανήκει στο CC398, αναγνωρίστηκε αργότερα αλλά δεν σχετίζεται με την κτηνοτροφία.

Η διάκριση των στελεχών βασίστηκε:

α) στον προσδιορισμό των σημειακών μεταλλάξεων *canSNP_748*, *canSNP_1002* και *canSNP_3737* (Stegger *et al.*, 2013),

β) στην παρουσία του φάγου *φSa3* μέσω της παρουσίας του γονιδίου της ιντεγκράσης 3 (*φ3int*) σε συνδυασμό με την απουσία του γονιδίου της β-αιμολυσίνης (*hly*) (Goerke *et al.*, 2009) και

γ) στην παρουσία των γονιδίων *scn*, *chp* και *sak* (VanWamel *et al.*, 2006).

Ο έλεγχος των σημειακών μεταλλάξεων έγινε με ενίσχυση τμήματος 100bp περίπου γύρω από το σημείο ελέγχου και αλληλούχιση του τμήματος αυτού ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη ή όχι μετάλλαξης. Στον πίνακα 2.16 παρατίθενται τα ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση και ακολούθως οι συνθήκες κυκλοποίησης, πίνακας 2.17. Η παρουσία του γονιδίου της β-αιμολυσίνης ή της ιντεγκράσης του φάγου 3 πραγματοποιήθηκε με PCR με τους εκκινητές του πίνακα 2.18 και στις συνθήκες όπως φαίνονται στον πίνακα 2.19. Τα γονίδια του συμπλέγματος ανοσιακής διαφυγής (IEC) και του σταφυλοκοκκικού αναστολέα του συμπληρώματος (SCIN) ανιχνεύθηκαν με τη χρήση των εκκινητών του πίνακα 2.18 σε συνθήκες κυκλοποίησης όπως αναφέρονται στον πίνακα 2.19.

Πίνακας 2. 16: Εκκινητές για τον έλεγχο των μεταλλάξεων

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>canSNP_748_F</i>	GGTACTAAGGTATATCCGTGGATTGC	Stegger <i>et al.</i> , 2013
<i>canSNP_748_R</i>	ATCAGTTGCGCTAAATCTTCTATTGA	
<i>canSNP_1002_F</i>	GAAACCAAAGGTAAAACCTAGCAAA	
<i>canSNP_1002_R</i>	AATTAAAGCAATCGGGGTGCT	
<i>canSNP_3737_F</i>	TTAYATATTTTTGGTTAACATCTTGCC	
<i>canSNP_3737_R</i>	AAAATAGCTAGTGAAATAATAACTGCGAGT	

Πίνακας 2. 17: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίων ελέγχου μεταλλάξεων

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>canSNPs</i>	95°C ► 5min	95°C ► 1min	56°C ► 1min	72°C ► 30 sec	35	72°C ► 4min

Πίνακας 2. 18: Εκκινητές γονιδίων ελέγχου διάκρισης στελεχών CC398

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά	
Sa3-F	GAAAAACAAACGGTGCTAT	Goerke <i>et al</i> , 2009.	
Sa3-R	TTATTGACTCTACAGGCTGA		
<i>hlb-1</i>	GTTGGTGCTCTTACTGACAA		
<i>hlb-2</i>	TGTGTACCGATAACGTGAAC		
<i>chp-1</i>	TTTACTTTTTGAACCGTTTCCTAC		
<i>chp-2</i>	CGTCCTGAATTCTTAGTATGCATATTCATTAG		
<i>sak-1</i>	AAGGCGATGACGCGAGTTAT		
<i>sak-2</i>	GCGCTTGGATCTAATTC AAC		
<i>sea-1</i>	AGATCATTCGTGGTATAACG		Van Wamel <i>et al</i> , 2006.
<i>sea-2</i>	TTAACCGAAGGTTCTGTAGA		
<i>sep-1</i>	AATCATAACCAACCGAATCA		
<i>sep-2</i>	TCATAATGGAAGTGCTATAA		
<i>scn-1</i>	AGCACAAGCTTGCCAACATCG		
<i>scn-2</i>	TTAATATTTACTTTTTTAGTGC		

Πίνακας 2. 19: Συνθήκες κυκλοποίησης γονιδίων ελέγχου διάκρισης στελεχών CC398

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική Επιμήκυνση
<i>hlb, Sa3int</i>	94°C ► 15min	94°C ► 30 sec	50°C ► 1min	72°C ► 45 sec	35	72°C ► 10min
<i>sak, chp</i>	95°C ► 5min	95°C ► 1min	56°C ► 1min	72°C ► 1:15min	35	72°C ► 6min
<i>sea, sep, scn</i>	95°C ► 5min	95°C ► 1min	50°C ► 45 sec	72°C ► 1:15min	35	72°C ► 6min

2.8 Χαρακτηρισμός γενετικού περιβάλλοντος γονιδίου αντοχής

2.8.1 Χαρακτηριστικά του στελέχους LAR2682

Μεταξύ των στελεχών της μελέτης το στέλεχος LAR2682 ήταν το πρώτο που ανευρέθηκε μεταξύ των στελεχών του κλωνικού συμπλέγματος 398.

Το LAR2682 απομονώθηκε από άνδρα ασθενή 43 ετών από την περιοχή της Θεσσαλίας που νοσηλεύθηκε στην Αγγειοχειρουργική κλινική λόγω ακρωτηριασμού του τρίτου δακτύλου του αριστερού ποδιού. Το δείγμα το οποίο καλλιεργήθηκε και από το οποίο απομονώθηκε ο συγκεκριμένος *S. aureus* προήλθε από έλκος της πελματικής επιφάνεια του δευτέρου δακτύλου του αριστερού ποδιού του ασθενούς που συνοδευόταν από οίδημα, ερυθρότητα και άλγος τοπικά.

Το στέλεχος εμφάνισε αντοχή στην κλινταμυκίνη (MIC: 8 µg/ml) αλλά ευαίσθησία στην ερυθρομυκίνη (MIC: 0.25 µg/ml), και έφερε το *Inu(B)* γονίδιο. Επειδή ήταν το πρώτο στέλεχος που απομονώθηκε στο εργαστήριο με L-φαινότυπο διερευνήθηκε περαιτέρω και χαρακτηρίστηκε το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου.

Το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου αυτού είχε περιγραφεί σε στελέχη *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* και *Streptococcus agalactiae* (Lozano *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Montilla *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Wendlandt *et al.*, 2014). Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι επρόκειτο για μία νέα δομή και για το λόγο αυτό εστιαστήκαμε στον προσδιορισμό του γενετικού τύπου με διάφορες τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης.

2.8.2 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Λόγω του επαναλήψιμου τρόπου πέψης, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν α) την σηματοδότηση οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA (χαρτογράφηση), β) την πέψη (τεμαχισμό) της αρχικής αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά και γ) την επανασύνδεση των

τμημάτων αυτών και την επανασυγκρότηση της αρχικής αλληλουχίας. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς την θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας (Sambrook *et al*, 1989).

Στο πείραμα της μελέτης του γενετικού τύπου του γονιδίου αντοχής ακολούθως της απομόνωσης του γενετικού υλικού έγινε επιλογή των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού. Τα ενζυμα αποτελούν το εργαλείο με το οποίο γίνεται δυνατή η δημιουργία τμημάτων DNA, τα οποία ευρισκόμενα γύρω από την περιοχή του γονιδίου και περιλαμβάνοντας περιοχές εκτός της γνωστής αλληλουχίας, καθιστούν δυνατή την ανάγνωση των δομών γύρω από το γονίδιο που ελέγχουμε.

Βάσει των δομών που είχαν περιγραφεί για το γονίδιο *Inu(B)* έγινε υποθετικός σχεδιασμός της περιοχής γύρω από το γονίδιο. Ο λόγος του σχεδιασμού αυτού ήταν η επιλογή συγκεκριμένου αριθμού περιοριστικών ενζύμων. Δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στις θέσεις κοπής των ενζύμων, ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου *Inu(B)* ώστε ταυτόχρονα να συμπεριλαμβάνουν τμήμα της γνωστής αλληλουχίας που θα χρησιμοποιούνταν ως ανιχνευτής κατά τον υβριδισμό, επιτρέποντας παράλληλα τη δημιουργία μεγάλων τμημάτων αλληλουχίας DNA με σκοπό την αλληλούχιση τους για ανάλυση της πλέον άγνωστης νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

2.8.2.1 Πέψη γονιδιωματικού DNA

ΥΛΙΚΑ

- Γονιδιωματικό DNA του στελέχους LAR2682
- *EcoRV* (New England BioLabs)
- *HincII* (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε eppendorf ετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις των πέψεων του γονιδιωματικού DNA με τα ένζυμα *EcoRV* και *HincII* αντίστοιχα. Σε έκαστο σωληνάριο προστέθηκαν 25μl DNA

(0.5μg/μl), ένζυμο (60U), 1x buffer του ενζύμου και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 200μl. Ακολούθησε ήπια ανάδευση του μείγματος και επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε κατακρήμνιση των πέψων ώστε να μειωθεί ο όγκος τους και να ηλεκτροφορηθούνε για περαιτέρω επεξεργασία.

2.8.2.2 Κατκρήμνιση των πέψων

ΥΛΙΚΑ

- CH₃COONa 3M (Scharlau)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Προϊόντα αντίδρασης πέψης
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 70% (Scharlau)
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σωληνάριο erpendorf που περιείχε τα 200μl των προϊόντων της πέψης προστέθηκαν 20μl CH₃COONa, 220μl ισοπροπανόλης και 0.5μl γλυκογόνο. Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά σε 13.400rpm. Το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση απορρίφθηκε και προστέθηκαν 500μl αιθανόλης. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά σε 13.400rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε με προσοχή και το ίζημα ξηράνθηκε σε κλίβανο στους 37°C. Το ίζημα ανδιαλύθηκε σε 20μl ddH₂O για 16-18 ώρες στους 4°C.

2.8.2.3 Ηλεκτροφόρηση πέψων

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA. Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, που είναι αρνητικά

φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κινείται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr). Το EtBr δημιουργεί σύμπλοκα παρεμβολής με τα μόρια νουκλεϊνικών οξέων και εκπέμπει φθορισμό όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία. Τελικά ο προσδιορισμός του προς ανάλυση δείγματος επιτυγχάνεται μετά από σύγκριση με κατάλληλο μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών DNA, ο οποίος ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα (Sambrook *et al.* 1989).

ΥΛΙΚΑ

- 0.5X TBE (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- Δείγματα DNA (προϊόντα πέψης έπειτα από κατακρήμνυση)
- Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (1kb, Blue DNA ladder, GeneOn)
- Διάλυμα χρωστικής-Gel loading Buffer (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- Αγαρόζη (ThermoFisher SCIENTIFIC)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την παρασκευή της γέλης αγαρόζης 1%, σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0,5X TBE) διαλύθηκε με θέρμανση στους 100°C η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης (1gr για gel ηλεκτροφόρησης με συγκέντρωση 1%). Στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος κατέβηκε στους 50°C, το διάλυμα τοποθετήθηκε στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης. Πριν το διάλυμα πήξει, τοποθετήθηκαν σε αυτό τα εκμαγεία των δειγμάτων ηλεκτροφόρησης, τα οποία επιτρέπουν το σχηματισμό των βοθρίων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα. Το πήκτωμα αφέθηκε να πήξει καλά για τουλάχιστον 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα δείγματα DNA προστέθηκε διάλυμα χρωστικής (loading dye, Invitrogen), το οποίο περιείχε γλυκερόλη. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στις υποδοχές και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Σε ένα από τα βοθρία τοποθετήθηκε ένας μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (Ladder). Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίστηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5X TBE.

2.8.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμααγαρόζης (Purelink Quick gel extraction kit, ThermoFisher SCIENTIFIC)

ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης στην μεμβράνη Buffer L3
- Wash Buffer W1
- ddH₂O
- αιθανόλη 100%
- σωληνάκια τύπου erpendorf
- σωλήνες συλλογής
- στήλες δέσμευσης DNA

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκε η ζώνη του πηκτώματος που αντιστοιχούσε στο επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Προσδιορίστηκε το βάρος και έπειτα προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης στην μεμβράνη (Buffer) L3 σε αναλογία 3:1 για πηκτώματα με συγκέντρωση αγαρόζης μικρότερη από 2%. Το μείγμα επώαστηκε στους 50°C για 10 λεπτά με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα. Ακολούθησε δεύτερη επώαση για 5 λεπτά. Ακολούθως το μείγμα μεταφέρθηκε σε στήλη η οποία τοποθετήθηκε σε έναν σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό σε 12.000g. Το έκλουσμα απορρίφθηκε και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μl Wash Buffer W1 και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 12.000g. Το έκλουσμα απορρίφθηκε και η στήλη τοποθετήθηκε πάλι στον σωληνάριο συλλογής. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση προς απομάκρυνση της αιθανόλης και ο σωλήνας συλλογής απορρίφθηκε μαζί με το έκλουσμα. Η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf προστέθηκαν στο κέντρο της στήλης 50μl ddH₂O, ώστε η στήλη να διαβραχεί και να αποδεσμευτεί ολόκληρη η ποσότητα του DNA. Η στήλη επώαστηκε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά σε ταχύτητα μεγαλύτερη από 12.000g. Το απομονωθέν DNA αποθηκεύθηκε στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.8.3 Ανάλυση κατά Southern

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊνικού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, μεταξύ αυτών και της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA (Southern, 1975). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν:

- i) τη σήμανση του ανιχνευτή,
- ii) τη μεταφορά του DNA σε νάιλον μεμβράνη,
- iii) την υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή και
- iv) την ανίχνευση του σήματος.

Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA που περιείχαν την αλληλουχία γύρω από το γονίδιο *lnu(B)* και τα οποία στη συνέχεια απομονώθηκαν από το σύνολο του γονιδιωματικού DNA του βακτηρίου. Τα τμήματα αυτά του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ώστε να γίνει δυνατή η ανάγνωση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *lnu(B)*.

2.8.3.1 Σήμανση ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλιωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει τον εντοπισμό τους ακόμη και αν στο κύτταρο ή στο διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA. Η σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Η σήμανση των νουκλεοτιδίων μπορεί να γίνει με ραδιενέργεια (^{32}P , ^{35}S , ^3H) ή με μη ραδιενεργούς σημαντές [βιοτίνη (Bio), διγοξιγενίνη (DIG)]. Οι μη ραδιενεργοί σημαντές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο επικίνδυνοι για την υγεία και επιπλέον, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -20°C και να είναι διαθέσιμοι προς χρήση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η μέθοδος των τυχαίων εκκινητών που ακολουθήθηκε για τη σήμανση δίκλωνων μορίων DNA, έγινε με χρήση του HexaLabel™ DNA Labelling kit (ThermoScientific). Βασίζεται στην ικανότητα τυχαίων ολιγομερών να προσδένονται σε αποδιαταγμένα μόρια DNA και να λειτουργούν ως εκκινητές για τον 5'→3' πολυμερισμό τους από το ενζυμικό κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I (Feinberg και Vogelstein 1984). Η επιλογή της μεγάλης υπομονάδας του ενζύμου (Klenow fragment) στηρίζεται στην απουσία της 5'→3' εξωνουκλεοτιδικής δράσης της, ενώ η αντίστοιχη 3'→5' περιορίζεται λόγω συνθηκών της αντίδρασης. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η σήμανση επιτυγχάνεται με ενσωμάτωση βιοτυνιλιωμένων δεοξυνουκλεοτιδίων (Biotin-11-dUTP) κατά τον πολυμερισμό των αποδιαταγμένων αλυσίδων του DNA από την Klenow με χρήση τυχαίων δεκανουκλεοτιδίων ως εκκινητές.

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στον υβριδισμό που ακολούθησε τις πέψεις του βακτηριακού DNA, δημιουργήθηκαν με σκοπό την εύρεση των τμημάτων του DNA που μετά την κατάτμηση θα περιλαμβάνουν αλληλουχία πέραν την περιγραφείσας έως αυτό το σημείο.

Οι ανιχνευτές ονομάστηκαν probeA και probeB αντιστοιχώντας σε αλληλουχίες 573bp και 849bp, αντίστοιχα. Ο probeA αντιστοιχεί σε τμήμα των βάσεων 11981-12715 του *E. Faecium* CP006623 που κωδικοποιεί τμήμα μεθυλτρανσφεράσης και νουκλεοτιδυλτρανσφεράσης. Ο probeB αντιστοιχεί σε τμήμα των βάσεων 16311-17795 του ίδιου *E. faecium* και αντιστοιχεί σε τμήμα του μεταφορέα-ABC και υποθετικής πρωτεΐνης.

ΥΛΙΚΑ

- Προϊόν PCR
- 5X Reaction Buffer (HexaLabel™ DNA Labeling Kit, ThermoFisher Scientific)
- 0,1 mM μη-σημασμένα νουκλεοτιδιadNTPs (dGTP, dATP, dTTP)(ThermoFisher Scientific)
- 0,035 mM βιοτυνιλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP)(ThermoFisher Scientific)
- 5 U DNA Klenow πολυμεράση I (ThermoFisher Scientific)
- ddH₂O
- 3M CH₃COONa (Scharlau)

- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Αιθανόλη 70% (Scharlau)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε erpendorf τοποθετήθηκε το DNA, προϊόν το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως αλληλουχία-ανιχνευτής. Στο DNA προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινήτες σε τελική συγκέντρωση 1X και ddH₂O. Το μείγμα αποδιατάχτηκε με επώαση για 10 λεπτά στους 100°C και έπειτα ψύχθηκε σε πάγο για 1 λεπτό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14.000rpm. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,035 mM Biotin-11-dUTP, μείγμα μή σημασμένων νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP) και 5 Units Klenow DNA πολυμεράση. Το μείγμα αναδεύτηκε ήπια με πιπέτα και επώαστηκε για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία 37° C. Τέλος, ακολούθησε κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη/ CH₃COONa/ αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O.

2.8.3.2 Μεταφορά σε Νάilon Μεμβράνη

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξή τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως “στόχοι” σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών. Η μεταφορά σε μεμβράνη από πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικές διαδικασίες: i) τριχοειδής μεταφορά (Lichtenstein *et al.*, 1990, Chomczynski, 1992), ii) ηλεκτροφορητική μεταφορά (Stellwag και Dahlberg, 1980, Church και Gilbert, 1984) και iii) μεταφορά με χρήση κενού (Olszewska και Jones, 1988, Trnovsky, 1992) ενώ υπάρχουν και τρία είδη μεμβρανών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν: i) μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ii) νάilon ουδέτερη μεμβράνη και iii) νάilon θετικά φορτισμένη μεμβράνη.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η τριχοειδής μεταφορά όπου βασίζεται στη μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μία περιοχή υψηλού υδατικού δυναμικού σε περιοχή χαμηλού δυναμικού. Το διάλυμα μεταφοράς παρασύρεται μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη λόγω των τριχοειδών φαινομένων με αποτέλεσμα να

συμπαράσφρει μαζί και το μονόκλωνο DNA. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε θετικά φορτισμένη νάλιον μεμβράνη, η οποία διευκολύνει την δέσμευση του DNA λόγω των ιονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης. Ο ρυθμός μεταφοράς του DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA, το πάχος του πηκτώματος και τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η μονιμοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία συγκεκριμένης έντασης είτε με ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία.

ΥΛΙΚΑ

- HCl 0.2 M (Scharlau)
- Διάλυμα αποδιάταξης: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M (Scharlau)
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: NaCl 1.5 M, Tris/HCl 0.5 M (Scharlau)
- 10x SSC(Scharlau)
- 20x SSC: 175,3gr NaCl, 88,2gr Na-citrate
- χαρτί Whatman 3 MM

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφήθηκε, αφού είχε τοποθετηθεί κατά μήκος χάρακας, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ειδικό δοχείο και επώαστηκε σε διάλυμα HCl 0,2 M υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Ακολούθησαν δυο αλληπάλληλες επώσεις σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, το πήκτωμα επώαστηκε δις με διάλυμα εξουδετέρωσης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 20 λεπτά. Το πήκτωμα επώαστηκε σε διάλυμα SSC 6X σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά και τοποθετήθηκε σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman, του οποίου οι άκρες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα SSC 6X. Η νάλιον μεμβράνη (Nytran SPC, Whatman) ίσων διαστάσεων με το πήκτωμα διαβράχθηκε με ddH₂O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετήθηκε πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης. Έπειτα, δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman, 5 mm

μικρότερα σε κάθε διάσταση από τη μεμβράνη, διαβράχθηκαν με ddH₂O και τοποθετήθηκαν πάνω στη μεμβράνη, ακολούθησαν επιπλέον δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 10 mm σε κάθε διάσταση. Στη κορυφή τοποθετήθηκε βάρος περίπου 500 gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώθηκε μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρέθηκαν τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman και σημαδεύτηκε η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των βοθρίων. Η μεμβράνη ξηράνθηκε σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.8.3.3 Υβριδοποίηση του Σημασμένου Ανιχνευτή

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊνικών οξέων συνίσταται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του “θορύβου” με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι τα: Denhardt's (Denhardt's reagent), το SDS (Sigma-Aldrich) και το DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, salmon sperm DNA, Sigma-Aldrich).

Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το ποσοστό σχηματισμού των υβριδίων καθορίζεται από τις συνθήκες υβριδοποίησης. Η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού στη περίπτωση DNA:DNA υβριδοποίησης είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία T_m (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Το σημείο τήξης T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την T_m είναι η αναλογία των βάσεων (GC), η συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή, και συνδέονται μεταξύ τους με τη εξίσωση: $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log M + 0,41(\%G+C) - 500/n$ όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων του άλατος [Na⁺] και n ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο. Η συγκέντρωση των ιόντων Na πρέπει να είναι υψηλή ώστε να επιτευχθεί υβριδοποίηση.

Τα μονοσθενή κατιόντα αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊνικών οξέων μειώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κλώνων και σταθεροποιώντας έτσι το υβρίδιο. Αντίθετα, με τη συγκέντρωση του άλατος, η υβριδοποίηση κατά Southern φτάνει τα όρια της ευαισθησίας της όταν χρησιμοποιούνται μικρού μήκους ανιχνευτές. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται περίπου σε 100 fg όταν χρησιμοποιείται βιοτυνλιωμένος ανιχνευτής.

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα προϋβριδοποίησης: 0.5% SDS, 6xSSC, 5xDenharts
- Διάλυμα Denharts 50x: 1% PVP, 1% BSA, 1% φικόλλη (Sigma-Aldrich)
- ssDNA (salmon sperm DNA): 10mg/ml (Sigma-Aldrich)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιείχε ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδόν x 0,2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης). Επιπλέον, προστέθηκε DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 100 µg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως είχε θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί. Ο σωλήνας τοποθετήθηκε σε θάλαμο υβριδοποίησης και επώαστηκε περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης απορρίφθηκε και προστέθηκε νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10 ml/100 cm²) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος είχε θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί. Τέλος, ο σωλήνας μεταφέρθηκε σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε για 16-18 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση.

2.8.3.4 Ανίχνευση σήματος

Η διαδικασία συνίσταται στην απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή, στη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης [σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (AP)] στη βιοτίνη και στην ανίχνευση του σήματος. Η απομάκρυνση της περίσσειας του

ανιχνευτή, ο οποίος δεν έχει προσδεθεί καθόλου ή έχει ασθενώς υβριδοποιηθεί μη ειδικά, με αλληλουχίες με τις οποίες μπορεί να έχει μια μικρού βαθμού ομολογία επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα SDS. Η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη της σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα, ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, και την ιδιότητά αυτής να καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση με το X-phosphate και το NBT (Nitro blue tetrazolium chloride). Το X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt, BCIP) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και το 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl που σχηματίζεται αντιδρά αυθόρμητα με το O₂ για να δώσει μία αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί του O₂. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους.

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα πλύσης I: 2xSSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα πλύσης II: 0.2xSSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα A: 0.1M Tris/HCl pH 7.5, NaCl 0.15M
- Διάλυμα Blocking: 10gr αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε 100ml διαλύματος A
- Διάλυμα B 1x: Διάλυμα A, 1% διάλυμα Blocking
- Διάλυμα C: 0.1M Tris/HCl pH 9.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 0.05M
- Διάλυμα εμφάνισης: 50μl NBT(Sigma-Aldrich) και 37.5μl BCIP (Sigma-Aldrich) σε 10ml διαλύματος C

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το διάλυμα υβριδοποίησης όπου περιείχε τον ανιχνευτή συλλέχθηκε σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιείχε διάλυμα πλύσης I και επωάστηκε δύο φορές σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολούθησαν δυο επωάσεις σε διάλυμα πλύσης II υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη

εξισορροπήθηκε σε διάλυμα Α για 1 λεπτό και στη συνέχεια επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου και διάλυμα Β υπό ανάδευση για τουλάχιστον 30 λεπτά. Το διάλυμα Β απορρίφθηκε και προστέθηκε διάλυμα Β, το οποίο περιέχει 5 μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml, και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Η μεμβράνη ξεπλήθηκε δις σε διάλυμα Α για 15 λεπτά και ακολούθως εξισορροπήθηκε σε διάλυμα C για 2 λεπτά. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιήθηκε με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C, το οποίο περιείχε 50 μl NBT και 37,5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος. Τέλος, η εμφάνιση διακόπηκε με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με ddH₂O.

2.8.4 Κλωνοποίηση

Η βασική διαδικασία κλωνοποίησης περιλαμβάνει πέντε στάδια, που στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων συνοψίζονται ως εξής:

- i) την επιλογή τού προς κλωνοποίηση τμήματος DNA (DNA ή cDNA) και τη δημιουργία κατάλληλων άκρων για ένθεση στο φορέα που φέρει τα αντίστοιχα άκρα,
- ii) τη σύνδεση του DNA στο φορέα,
- iii) το μετασχηματισμό βακτηρίων με εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα,
- iv) τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων και
- v) την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων.

2.8.4.1 Επιλογή πλασμιδιακού φορέα

Τα πλασμίδια έχουν επιλεγεί στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA ως ιδανικοί φορείς κλωνοποίησης βάσει ορισμένων τυπικών χαρακτηριστικών τους. Είναι μικρά, κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA με πολλές, μοναδικές θέσει περιορισμού κατά μήκος του πολυσυνδέτη (polylinker) τους, καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για την ανεξάρτητη αντιγραφή τους από το γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή τους. Επιπλέον φέρουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, επιτρέποντας την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν τα πλασμίδια (Bolivar *et al.* 1977). Κατά την

κλωνοποίηση, τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται στη γραμμική τους μορφή. Αυτή προκύπτει μετά από κατάτμηση με τη δράση ενός ή το συνδυασμό δύο ενζύμων περιορισμού σε θέσεις αναγνώρισης του πολυσυνδέτη, για τη δημιουργία συμβατών άκρων με το προς ένθεση τμήμα DNA.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ο φορέας pJET1.2/blunt Cloning Vector (ThermoFisher Scientific CloneJET PCR Cloning Kit). Τα τμήματα του γονιδιωματικού DNA, που προέκυψαν έπειτα από την επιλογή τους με αποτύπωση κατά Southern και στη συνέχεια την επανάληψη των διαδικασιών των πέψεων με τα ένζυμα *EcoRV* και *HincII*, κλωνοποιήθηκαν στον παραπάνω φορέα με τυφλά άκρα σύνδεσης.

2.8.4.2 Σύνδεση DNA στο φορέα, αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA επιτυγχάνεται *in vitro* με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (ligase). Η λιγάση καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών των 5' φωσφορικών ομάδων (5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) τμημάτων DNA με προεξέχοντα ή τυφλά άκρα (Sgaramella ανδ Ehrlich, 1978). Στην κλωνοποίηση, η αντίδραση σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιείται για την ένθεση τμημάτων DNA (προϊόντων ενζυμικής πέψης ή PCR) σε πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Κατά τη διάρκειά της τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Για το λόγο αυτό ο μοριακός τους λόγος που εκφράζεται ως η αναλογία των μορίων μεταξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και του πλασμιδιακού φορέα πρέπει κυμαίνεται από 1:1 έως 3:1. Η αποτελεσματικότητα ωστόσο μιας αντίδρασης σύνδεσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, η φύση των άκρων του DNA (προεξέχοντα ή τυφλά) και κυρίως η συγκέντρωση και το μέγεθος των προς σύνδεση μορίων. Βάσει αυτών των παραμέτρων ο υπολογισμός της ποσότητας του ενθέματος γίνεται σύμφωνα με το τύπο: $ng\ DNA = ng\ πλασμιδίου \times μέγεθος\ DNA \times μοριακός\ λόγος\ μέγεθος\ πλασμιδίου$.

ΥΛΙΚΑ

- 2X Reaction Buffer
- DNA
- pJET1.2/blunt Cloning Vector(ThermoFisher SCIENTIFIC)
- ddH₂O
- T4 DNA Ligase (ThermoFisher SCIENTIFIC)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σωληνάριο τύπου erppendorf προστέθηκαν διαδοχικά η απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος, 50 ng φορέα, ρυθμιστικό διάλυμα, 1 unit λιγάσης και ο όγκος της αντίδρασης (20 μl) συμπληρώθηκε με ddH₂O. Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 22°C για 40min μετά από ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια το μείγμα ήταν έτοιμο για μετασχηματισμό.

2.8.4.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Neuman *et al.*, 1982). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ρεύματος υψηλής τάσης σε κατάλληλα επεξεργασμένα κύτταρα ώστε να καταστούν διαπερατά σε πλασμίδια, με αποτέλεσμα την εισαγωγή των πλασμιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Ωστόσο, παρατεταμένη έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο είναι δυνατό να οδηγήσει σε απόπτωση των κυττάρων.

2.8.4.3.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων έως το μέσο της εκθετικής φάσης και διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος. Η κατεργασία αυτή εξασφαλίζει τη χαμηλή ιονική ισχύ του εναιωρήματος. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε συγκέντρωση 3×10^{10} κύτταρα/ml και διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C. Η απόδοση κυμαίνεται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μg DNA και

εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower *et al.* 1988).

ΥΛΙΚΑ

- κύτταρα *Escherichia coli* DH5A
- Luria-Bertani (LB) broth (Difco)
- Γλυκερόλη 10%
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) ενοφθαλμίστηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5α και επώαστηκαν υπό ανάδευση (220 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml, η οποία περιείχε υγρό θρεπτικό μέσο LB (100 ml), και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) του εναιωρήματος των κυττάρων να κυμαίνεται μεταξύ 0.4 και 0.6. Στη συνέχεια η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon όγκου 50 ml και παρέμεινε σε πάγο για 10 λεπτά ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση σε 4.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε ήπια σε προψυγμένο ddH₂O (50 ml/falcon). Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 4.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε επανάληψη των σταδίων επαναδιάλυσης ιζήματος σε ddH₂O και φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4 ml/falcon) και φυγοκεντρήθηκαν 4.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250 μl/falcon). Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράστηκε σε κλάσματα των 40 μl σε προψυγμένα σωληνάρια τύπου erpendorf. Τα κλάσματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

2.8.4.3.2 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Η εισαγωγή πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα προκαλείται με αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης κάτω από την επίδραση εξαιρετικά χαμηλής διάρκειας ηλεκτρικών παλμών, οι οποίοι διεγείρουν το σχηματισμό παροδικών οπών στην επιφάνειά της (Neuman *et al.*, 1982). Στο μεσοδιάστημα αυτό επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός του βακτηριακού κυττάρου. Η διαδικασία απαιτεί τη χρήση συσκευής παροχής ρεύματος, καθώς και ειδικής κυψελίδας η οποία τοποθετείται στη θέση υποδοχής ώστε να βρίσκεται σε επαφή με δύο ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με το τροφοδοτικό. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επώάζονται υπό ανάδευση σε θρεπτικό μέσο, σε χαμηλές στροφές ώστε να ανακάμψουν και να μπορούν να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υλικό.

ΥΛΙΚΑ

- δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5A
- διάλυμα SOC (bacto-tryptone, bacto-yeast extract, NaCl)
- Luria-Bertani (LB) broth
- Luria-Bertani (LB) agar
- τρυβλία petri 90mm
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κλάσμα (40 μl) δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5A κατεργασμένων για ηλεκτροδιάτρηση και διατηρημένων στους -80°C, τήχθηκαν σε πάγο. Στη συνέχεια το κλάσμα αναμείχτηκε με το ανασυνδυασμένο DNA, ποσότητας από 10 pg έως 25 ng και όγκου 1-2 μl, και επωάστηκε σε πάγο για 1 λεπτό. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0.2 cm και τοποθετήθηκε στη θέση υποδοχής της συσκευής. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ηλεκτρικός παλμός εντάσεως 13.8 kV/cm και διάρκειας 5-6 msec. Αμέσως μετά προστέθηκε 1 ml διαλύματος υγρού θρεπτικού διαλύματος SOC και το μείγμα μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και επωάστηκε υπό ήπια ανάδευση (180 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλίο petri (90mm) με στερεό θρεπτικό μέσο LB αγαρ. Το

τρυβλίο επώαστηκε ανεστραμμένο σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C για 12-16 ώρες.

2.8.4.4 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί σε πρώτη φάση πραγματοποιείται σε στερεό θρεπτικό μέσο. Η συνήθης πρακτική επιλογής βασίζεται στην ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων σε επιλεκτικές συνθήκες, εφόσον τα πλασμίδια που έχουν εισαχθεί (ανασυνδυασμένα ή μη) εκφράζουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ως επιλεκτικός δείκτης.

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα φέρει ένα θανατηφόρο γονίδιο του οποίου η αλληλουχία διακόπτεται όταν το προς μελέτη τμήμα DNA εισαχθεί στον φορέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την ανάπτυξη μόνο των κυττάρων στα οποία έχει εισαχθεί τμήμα DNA. Με τον τρόπο αυτό είναι ευκολότερη η επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί αφού μόνο αυτά αναπτύσσονται. Δεν απαιτείται ο κλασικός διαχωρισμός με οπτική παρατήρηση των αποικιών και διάκριση μπλε-λευκού χρώματος βάσει του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (Miller, 1972). Ωστόσο, για την πλήρη ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων απαιτείται επιβεβαίωση του ενθέματος με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών ή PCR στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξής του.

2.8.5 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης (Library screening)

Η διαλογή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει την απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών που έχουν κλωνοποιηθεί. Η διαδικασία συνίσταται στη μεταφορά σε μεμβράνη των βακτηριακών αποικιών που έχουν αναπτυχθεί σε στερεό υπόστρωμα και ακολούθως στον επιλεκτικό εντοπισμό συγκεκριμένων αποικιών με χρήση κατάλληλα σημασμένων ανιχνευτών μέσω της τεχνικής της υβριδοποίησης. Τελικά, οι μεμονωμένες-θετικές μετά την ανίχνευση αποικίες συλλέγονται από το στερεό θρεπτικό υλικό και το βακτηριακό εναιώρημα που προκύπτει μετά από καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την απομόνωση του

επιθυμητού τμήματος της βιβλιοθήκης. Αν δεν είναι εφικτή η συλλογή μεμονωμένης αποικίας μετά τη διαλογή, τότε συλλέγεται η ευρύτερη περιοχή του σήματος που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές αποικίες και ποσότητα του εναιωρήματος επαναεπιστρώνεται για δεύτερη διαλογή (secondary screening).

Η τεχνική ακολουθεί τα ίδια στάδια με την ανάλυση κατά Southern, όσον αφορά την υβριδοποίηση και την ανίχνευση του σήματος, με μόνη διαφορά τη διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη. Η διαδικασία αφορά στη δημιουργία ενός αντιγράφου της κατανομής των αποικιών μετά από επίστρωση μετασχηματισμένων βακτηρίων σε στερεό υπόστρωμα. Οι αποικίες μεταφέρονται μέσω τριχοειδών φαινομένων στη μεμβράνη, η οποία ακολουθώς επωάζεται σε αλκαλικό διάλυμα με σκοπό την αποδιάταξη του βακτηριακού DNA. Παράλληλα, το αρχικό τρυβλίο διατηρείται στους 37°C με αποτέλεσμα οι αποικίες να συνεχίσουν την αναπτυξή τους. Τελικά το DNA σταθεροποιείται στη μεμβράνη με ξήρανση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στη διαδικασία υβριδοποίησης.

Τα τμήματα του DNA που υβριδοποιήθηκαν με τους ανιχνευτές A και B αντιστοιχώντας στις εκατέρωθεν πλευρές του γονιδίου *lnu(B)*, απομονώθηκαν μετά από επανάληψη των πέψεων και ηλεκτροφόρησή τους σε πανομοιότυπες συνθήκες. Τα τμήματα του DNA που είχανε αμβλέα άκρα λόγω των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, εισήχθησαν στο φορέα pJET1.2/blunt Cloning Vector (ThermoScientific). Στη συνέχεια οι ανασυνδυασμένοι φορείς εισέδυσαν σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Τα κύτταρα που έλαβαν τον ανασυνδυασμένο φορέα αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν ελέγχθησαν για την παρουσία τμήματος DNA που περιείχε τμήμα της περιοχής που μελετάται με τους ανιχνευτές του αρχικού υβριδισμού κατά Southern χωριστά για τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από τις δύο πέψεις. Το γενετικό υλικό των μετασχηματισμένων κυττάρων μεταφέρθηκε σε μεμβράνη απευθείας από τις αποικίες του στερεού θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με έκαστο ανιχνευτή. Οι αποικίες που έδωσαν σήμα βάσει του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LBbroth. Μετά από επώασή τους, επιστρώθηκαν εκ νέου σε στερεό θρεπτικό υλικό και επαναλήφθηκε η διαδικασία ανίχνευσης σήματος κατά Southern (secondary screening) πριν την τελική επιλογή των αποικιών που περιείχανε τους πλασμιδιακούς φορείς με τις επιθυμητές αλληλουχίες.

ΥΛΙΚΑ

- 6x SSC
- Whatman 3MM
- Νάilon μεμβράνη
- διάλυμα αποδιάταξης
- διάλυμα εξουδετέρωσης
- 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 2x SSC
- ddH₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το τρυβλίο της στερεής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων βακτηρίων παρέμεινε σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 ώρες πριν την έναρξη της διαδικασίας. Η θερμοκρασία 4°C είναι κατάλληλη για την πλήρη στερεοποίηση του στερεού θρεπτικού υλικού (LBagar) και με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η αποκόλληση και επομένως η μεταφορά του στη μεμβράνη. Η μεμβράνη η οποία κόπηκε στο μέγεθος του τρυβλίου τοποθετήθηκε στην επιφάνειά του στερεού μέσου ανά πλευρά της επιφάνειας του πηκτώματος αφού είχε διαβραχεί διαδοχικά με ddH₂O και με διάλυμα SSC 6X. Κατά τη τοποθέτησή της, αρχικά η μεμβράνη ήρθε σε επαφή με το κέντρο του τρυβλίου και προοδευτικά κάλυψε την υπόλοιπη επιφάνειά του, με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κενού μεταξύ του υποκείμενου αγαρ και της μεμβράνης, γεγονός που θα παρεμπόδιζε τη μεταφορά του DNA. Η μεμβράνη παρέμεινε στην επιφάνεια του τρυβλίου για 2 λεπτά μέχρι να διαβραχεί πλήρως από την υγρασία του στερεού θρεπτικού υλικού. Στο διάστημα αυτό σημειώθηκε ο προσανατολισμός της μεμβράνης ως προς το τρυβλίο petri δημιουργώντας ασύμμετρους πόρους (τρυπήματα) σε μη αντιδιαμετρικά περιφερειακά σημεία της, μέσω διείσδυσης αποστειρωμένης βελόνας. Ο καθορισμός του προσανατολισμού απαιτείται ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός των αποικιών που αντιστοιχούν στα θετικά σήματα της υβριδοποίησης και κατ' επέκταση η απομόνωσή τους. Ακολούθως η μεμβράνη μεταφέρθηκε ανεστραμμένη στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά. Η αναστροφή της μεμβράνης περιορίζει την άμεση επαφή των αποικιών με το διάλυμα αποδιάταξης και επομένως διατηρείται η ακεραιότητα του DNA. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε κατά τον ίδιο τρόπο στην επιφάνεια

διαλύματος εξουδετέρωσης για 5 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση για διάστημα μικρότερο των 30 δευτερολέπτων σε διάλυμα που περιείχε 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) και SSC 2X. Τέλος η μεμβράνη ξηράνθηκε σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατά Southern όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.8.6 Ανάλυση αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger, γνωστή και ως διεδόξυ-μέθοδος, που βασίζεται στον βασηο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή.

Σύμφωνα με αυτή, διενεργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εκτέλεση της οποίας εκτός των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διεδόξυριβονουκλεοτιδια) που δύναται να σταματούν την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το διεδόξυριβονουκλεοτιδιο αυτό μπορεί να ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Τα διεδόξυριβονουκλεοτίδια αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διεδόξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Επειδή οι 4 φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση, αντιστοιχεί στο χρώμα του διεδόξυριβονουκλεοτιδίου που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο. Όταν τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή δύναται να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της συσκευής αυτόματης αλληλούχισης.

Τα κομμάτια μεταναστεύουν σύμφωνα με το μέγεθός τους και οι φθορίζουσες χρωστικές διακρίνουν πιο νουκλεοτίδιο είναι στο τέλος κάθε κομματιού. Κάθε διαδοχικό τμήμα είναι κατά ένα νουκλεοτίδιο μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Οι

φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από την ακτίνα laser ενός ανιχνευτή, καθώς τα τμήματα περνούν κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή. Αυτό το σήμα αναλύεται με αλγορίθμους ειδικούς για αλληλούχιση, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος, δηλαδή από το μικρότερο στο μεγαλύτερο τμήμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), μια σειρά, δηλαδή από κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποια βάση ανάλογη με το χρώμα φθορισμού. Συγκεκριμένα αναπαριστάται η ένταση των φθορίζοντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.

Οι αποικίες που απομονώθηκαν, οκτώ σε αριθμό για κάθε τμήμα εκατέρωθεν του γονιδίου *lnu(B)*, ανακαλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό ώστε να γίνει δυνατός ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη του κάθε κλώνου. Ποσότητα από κάθε υγρή καλλιέργεια φυλάχθηκε σε stock γλυκερόλης στους -80°C για ανάκτηση του κλώνου και επόμενη χρήση. Στη συνέχεια οι υγρές καλλιέργειες εμπλουτίστηκαν ώστε να δημιουργηθούν κορεσμένες υγρές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Από την παραπάνω διαδικασία απομονώθηκαν 16 πλασμίδια που ονομάστηκαν αναλόγως την πέψη του DNA από την οποία προήλθαν και τον αύξοντα αριθμό της αποικίας από την οποία απομονώθηκαν, π.χ. *HincII_plasmid_1*, *EcoRV_plasmid_1*. Τα ανασυνδυασμένα αυτά πλασμίδια στάλθηκαν σε ειδικό τμήμα του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για αλληλούχιση με την μέθοδο Sanger. Για κάθε αλληλούχιση στάλθηκαν 10μl DNA (100ng/ μl) και 20μl από έκαστο εκκινητή σε συγκέντρωση 5pmol/μl. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε μελέτη με το πρόγραμμα BLAST, όπως αναλύεται παρακάτω.

2.8.7 Σύγκριση Αλληλουχιών DNA

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) και συγκεκριμένα του προγράμματος BLASTN.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης με το εν λόγω πρόγραμμα απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει την στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης. Η τιμή E εκφράζει την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία και θεωρείται αποδεκτή όταν είναι σχεδόν μηδενική, θέτωντας ως όριο αμφισβήτησης τιμές μεγαλύτερες του 10^{-4} .

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιλογή Στελεχών- Πληθυσμός της μελέτης

3.1.1 Στελέχη ανθρώπινης προέλευσης

Μελετηθήκαν συνολικά 1234 στελέχη *S. aureus* εκ των οποίων τα 1200 απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα διαφορετικών ασθενών του ΠΓΝΛ, ενώ τα υπόλοιπα 34 απομονώθηκαν από ρινικά εκκρίματα υγιών ανθρώπων. Στον Πίνακα 3.1 περιγράφονται τα κλινικά δείγματα από τα οποία προήλθαν τα στελέχη.

Πίνακας 3. 1: Περιγραφή των κλινικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη *S. aureus*

Υλικό	Αρ.	%
πύο	398	30%
δερμ. βλάβη	201	16%
αίμα	165	14%
τραύμα	118	9%
ιστός	55	5%
πτύελα	51	4,5%
ωτικό έκκριμα	50	4,5%
ούρα	48	4%
ρινικό	34	3,5%
βρογχικές εκκρίσεις	29	2,5%
κατάκλιση	19	1,5%
οφθ. έκκριμα	16	1%
αρθρικό	15	1%
Λοιπά (πλευρ. υγρό, ασκ. υγρό, τραχειοσωλήνας)	35	3,5%
ΣΥΝΟΛΟ	1234	100%

3.1.2 Στελέχη ζωικής προέλευσης

Τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από ζώα ήταν 13 και προήλθαν από τον έλεγχο συνολικά 512 ρινικών και ορθοπρωκτικών δειγμάτων που λήφθηκαν από αντίστοιχο αριθμό ζώων. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν προήλθαν τόσο από ζώα εκτροφής (457 δείγματα) όσο και από ζώα συντροφιάς (55 δείγματα). Συμπεριελήφθησαν δείγματα από πρόβατα (232), αίγες (70), χοίρους (40), βοοειδή (80), άλογα (35), σκύλους (33) και γάτες (22). Στον Πίνακα 3.2 φαίνεται ο αριθμός των στελεχών που ελέγχθηκε από κάθε διαφορετικό είδος και ο αριθμός των στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκε.

Πίνακας 3. 2: Αριθμός δειγμάτων ζωικής προέλευσης που μελετήθηκαν από κάθε είδος σε συνδυασμό με τον αριθμό των *S. aureus* που απομονώθηκαν

Είδος	Αριθμός δειγμάτων/ Αριθμός ζώων	Στελέχη <i>S. aureus</i>
πρόβατα	232/232	6 (2,5%)
αίγες	70/70	4 (5,7%)
άλογα	35/35	2 (5,7%)
χοίροι	40/40	0
βοοειδή	80/80	0
σκύλος	33/33	1 (3%)
γάτα	22/22	0
ΣΥΝΟΛΟ	512/512	13 (2.5%)

3.2 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά

3.2.1 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στελεχών που απομονώθηκαν από ανθρώπινα δείγματα

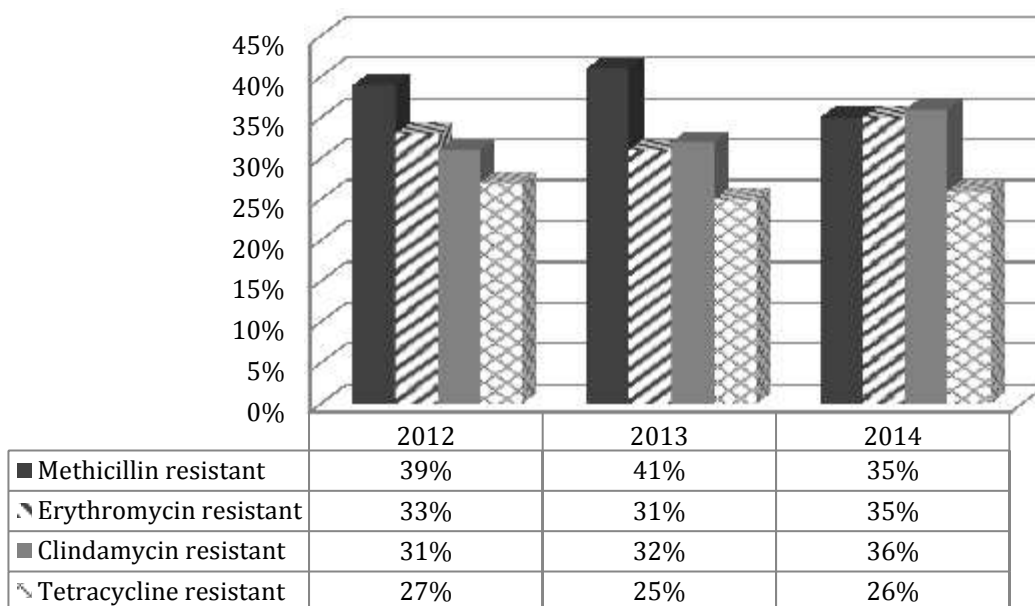
Σύμφωνα με τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά κεφοξιτίνη (cefoxitin) και οξακυλλίνη (oxacillin) που πραγματοποιήθηκε, 759 (61,5%) από τα 1234 στελέχη *S.*

aureus χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα, MSSA (Methicillin-Susceptible *S. aureus*), ενώ τα υπόλοιπα 475 (38,5%) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά, MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*) με MIC στην oxacillin από >2 µg/ml έως 256 µg/ml.

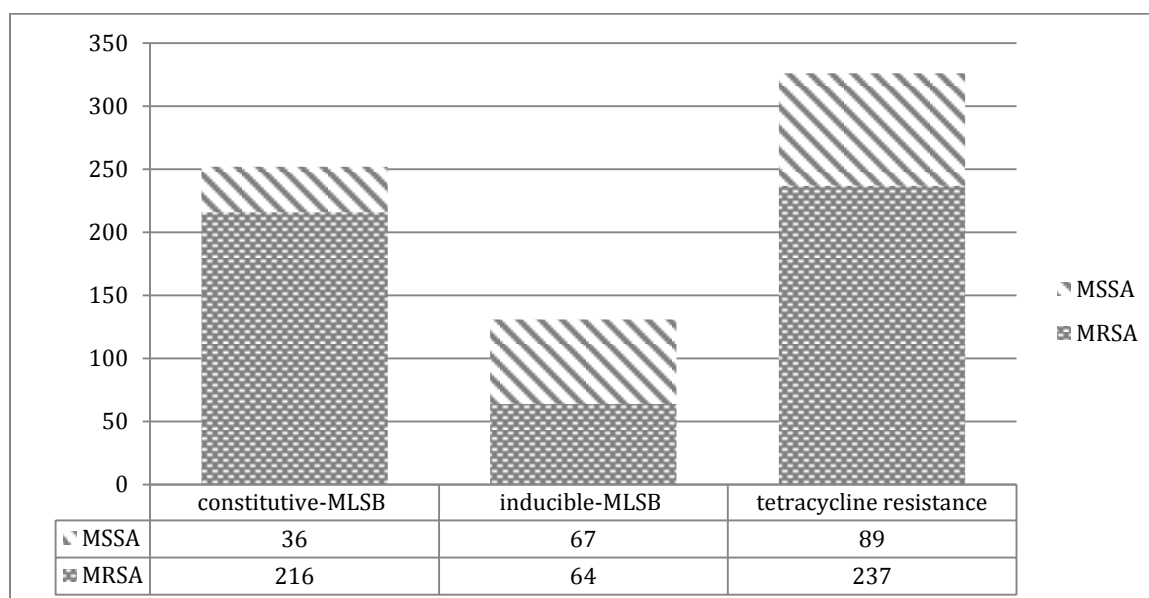
Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εκτός από τα δύο β-λακταμικά αντιβιοτικά που προαναφέρθηκαν, έμφαση δόθηκε στον έλεγχο ευαισθησίας των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών στην ομάδα των MLS_B αντιβιοτικών (Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη Β). Ο λόγος είναι ότι στην Ελλάδα, εκτός από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η ερυθρομυκίνη (εκπρόσωπος των μακρολιδών) και η κλινταμυκίνη (εκπρόσωπος των λινκοσαμιδών) αποτελούν αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη για την εμπειρική θεραπεία των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων και μάλιστα των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων της κοινότητας, αλλά έχουνε θέση και στην κτηνοτροφία όπου χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό ως ενισχυτικοί αυξητικοί παράγοντες. Έτσι, στην παρούσα εργασία με βάση τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά που πραγματοποιήθηκε και το αντιβιογράμμα που προέκυψε, 383 (31%) στελέχη παρουσίαζαν ταυτόχρονα αντοχή στην ερυθρομυκίνη και την κλινταμυκίνη (MLS_B-φαινότυπος) εκ των οποίων 278 MRSA (58%) και 105 MSSA (13%). Ανθεκτικά μόνο στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητα στην κλινταμυκίνη (M-φαινότυπος) βρέθηκαν 27 στελέχη (6,5 %) εκ των οποίων 4 MRSA (0,8%) και 23 MSSA (3%). Εκτός των συνήθων παραπάνω φαινοτύπων υπήρχαν 3 στελέχη τα οποία ήταν ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη και ανθεκτικά στην κλινταμυκίνη (L-φαινότυπος) 1 MRSA και 2 MSSA. Στο Γράφημα 3.1 φαίνεται η κατανομή των στελεχών που εμφάνισαν αντοχή σε μεθικιλίνη, ερυθρομυκίνη, κλινταμυκίνη ανά έτος για το διάστημα της μελέτης μας. Εκτός των ανωτέρω, έχει σημασία να παρουσιαστούνε και τα αποτελέσματα του ελέγχου της ευαισθησίας των στελεχών στην τετρακυκλίνη. Η αντοχή στην τετρακυκλίνη είναι ένα από τα χαρακτηριστικά των LA-MRSA, αφού η παρουσία του γονιδίου *tetM* έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ως δείκτης ανίχνευσης τέτοιων στελεχών. Από τα στελέχη της παρούσας μελέτης αντοχή στην τετρακυκλίνη εμφάνισαν 326 στελέχη, ποσοστό 26% εκ των οποίων 237 MRSA (50%) και 89 MSSA (12%). Η κατανομή της αντοχής ανά έτος της μελέτης φαίνεται στο Γράφημα 3.1. Το ποσοστό αντοχής στα MLS_B αντιβιοτικά και την τετρακυκλίνη ήταν υψηλότερο στα MRSA στελέχη από ότι στα MSSA. Ο έλεγχος του τύπου αντοχής στα MLS_B αντιβιοτικά, επαγώμενος (iMLS_B) ή ιδιοσυστασιακός (cMLS_B), έδωσε τα εξής αποτελέσματα: cMLS_B

βρέθηκε σε 252 στελέχη εκ των οποίων 216 MRSA (45%) και 36 MSSA (5%), ενώ iMLS_B βρέθηκε σε 131 στελέχη εκ των οποίων 64 MRSA (13%) και 67 MSSA (9%). Σχηματικά η επικράτηση των MRSA στελεχών στον cMLS_B φαινότυπο και την αντοχή στην τετρακυκλίνη φαίνονται στο Γράφημα 3.2.

Γράφημα 3. 1: Ποσοστά αντοχής σε Methicillin, Erythromycin, Clindamycin και Tetracycline για τα έτη 2012, 2013, 2014 στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ανθρώπων



Γράφημα 3. 2: Γραφική απεικόνιση αντοχής στα MLS_B αντιβιοτικά και την τετρακυκλίνη στελεχών MRSA και MSSA



3.2.2. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στελεχών που απομονώθηκαν από ζωικά δείγματα

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα στελέχη που προέκυψαν από τον έλεγχο των ζωικών δειγμάτων δεν ανέδειξε αντοχή σε κανένα από τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν. Ερυθρομυκίνη (erythromycin), κλινταμυκίνη (clindamycin), φουσιδικό οξύ (fucidic acid), πενικιλίνη (penicillin), οξακιλλίνη (oxacillin), κεφοξιτίνη (cefoxitin), τετρακυκλίνη (tetracycline) και καναμυκίνη (kanamycin). Στο σύνολό τους τα 13 στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητα σε όλους τους παραπάνω αντιμικροβιακούς παράγοντες.

3.3. Γονίδια αντοχής σε στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους (Methicillin-MLS_B αντιβιοτικά)

Όλα τα στελέχη (475) που σύμφωνα με τον φαινοτυπικό έλεγχο χαρακτηρίστηκαν ως MRSA έφεραν το *mecA* γονίδιο. Κανένα στέλεχος της μελέτης (είτε ανθρώπινης είτε ζωικής προέλευσης) δεν βρέθηκε να φέρει το *mecC* γονίδιο.

Επιπλέον, όλα τα στελέχη (415) που εμφάνισαν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά εξετάστηκαν για την ύπαρξη των γονιδίων που αντιστοιχούν στους κυριότερους μηχανισμούς αντοχής για τα συγκεκριμένα αντιμικροβιακά φάρμακα. Ο έλεγχος των γονιδίων *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)*, *msr(A)*, *vga(A)*, *vga(B)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)* απέδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

265 στελέχη έφεραν το γονίδιο *erm(A)* εκ των οποίων 227 MRSA (48% των MRSA) και 38 MSSA (5% των MSSA),

111 στελέχη έφεραν το γονίδιο *erm(C)* εκ των οποίων 54 MRSA (11% των MRSA) και 57 MSSA (7,5% των MSSA),

8 στελέχη MSSA έφεραν το γονίδιο *erm(T)*,

1 στέλεχος MSSA έφερε συνδυασμό των γονιδίων *erm(C)* και *erm(T)*,

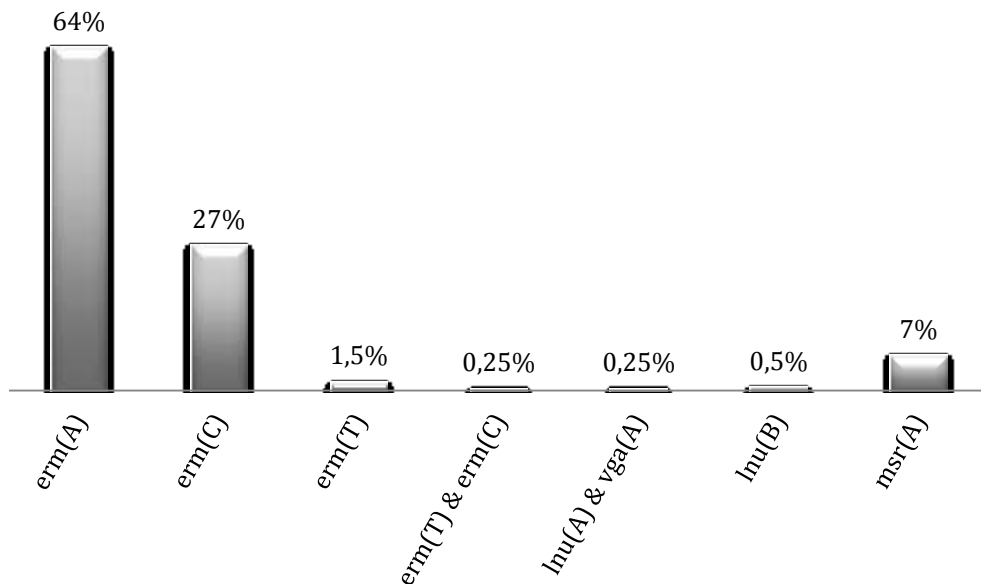
1 στέλεχος MRSA έφερε ταυτόχρονα τα γονίδια *lnu(A)* και *vga(A)*,

2 στελέχη MSSA έφεραν το γονίδιο *lnu(B)* και τέλος,

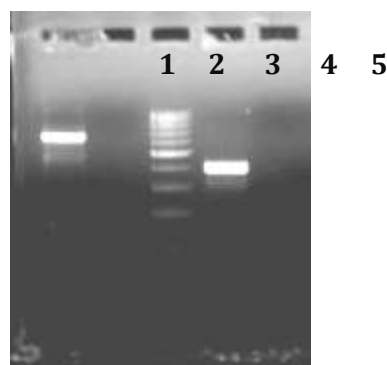
27 στελέχη έφεραν το γονίδιο *msrA* εκ των οποίων 4 MRSA (0,8% των MRSA) και 23 MSSA (3% των MSSA).

Στο Γράφημα 3.3 φαίνονται σχηματικά τα συνολικά ποσοστά των γονιδίων αντοχής μεταξύ των ανθεκτικών στα MLS_B αντιβιοτικά στελεχών (σε MSSA και MRSA) και στην Εικόνα 3.1 η ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης των παραπάνω γονιδίων.

Γράφημα 3. 3: Κατανομή των διαφόρων γονιδίων σε στελέχη *S. aureus* με αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά



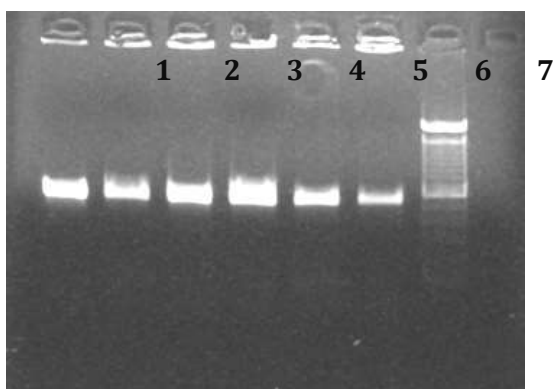
Εικόνα 3. 1: Ηλεκτροφόρηση γονιδίων *erm(C)* και *msr(A)*. (Βοθρία 1-5, 1:προιόν γονιδίου *erm(C)*, 2: αρνητικός μάρτυρας, 3:ladder 100bp, 4:προιόν γονιδίου *msr(A)*, 5: αρνητικός μάρτυρας)



3.4. Μοριακή τυποποίηση στελεχών *S. aureus*

Προκειμένου, να ανιχνευθεί η παρουσία στελεχών CC398 *S. aureus*, που σχετίζεται με την κτηνοτροφία, όλοι οι *S. aureus* της μελέτης (1247) στελέχη ελέγχθηκαν αρχικά με βάση το γονίδιο *aroE*. Το αλληλίο *aroE* που για το CC398 είναι το *aroE*:35, συναντάται σε 62 από τους 3.234 τύπους κατά MLST (1,9%, <http://saureus.mlst.net/sql/sthtml.asp>, Aug 2015). Για το λόγο αυτό το συγκεκριμένο αλληλίο θεωρήθηκε ικανό να διακρίνει μεταξύ των πολλών τύπων του *S. aureus* όσους ανήκουν στο CC398 και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης του κλωνικού συμπλέγματος. Στην Εικόνα 3.2 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση αλληλίων γονιδίου *aro* έξι στελεχών της μελέτης.

Εικόνα 3. 2: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση αλληλίων γονιδίου *aroE* 6 διαφορετικών στελεχών *S. aureus* (Βοθρία 1-6: στελέχη *S. aureus* LAR.2702, LAR2705, LAR2713, LAR2714, LAR2719, LAR2721, 7: ladder 100bp)



3.5. Ομαδοποίηση στελεχών βάσει αλληλίου *aro*

Το σύνολο των 1247 στελεχών χαρακτηρίστηκαν βάσει του αλληλίου *aroE*. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου έδωσαν ποικιλία αλληλίων. Επικράτησε η ανεύρεση του αλληλίου 4 με 384 στελέχη ενώ ακολούθησαν τα αλληλία 3 και 1 με 239 και 125 στελέχη αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3.3 φαίνεται αναλυτικά ο αριθμός και το ποσοστό των στελεχών ανά *aro* αλληλίο επί του συνόλου των στελεχών της μελέτης.

Πίνακας 3. 3: Κατανομή των διαφόρων αλληλιών του *aroE* γονιδίου στα στελέχη της μελέτης

Αλληλίο <i>aroE</i>	Αρ. στελεχών	%
4	384	31,12
3	239	19,37
1	125	10,13
2	87	7,05
5	76	6,16
14	75	6,08
13	74	6,00
6	69	5,59
7	23	1,86
35	21	1,70
27	12	0,97
75	10	0,81
9	9	0,73
23	6	0,49
37	3	0,24
71	3	0,24
123	3	0,24
308	3	0,24
26	2	0,16
31	2	0,16
43	2	0,16
66	2	0,16
181	2	0,16
207	2	0,16

3.6. Στελέχη κλωνικού συμπλέγματος CC398

3.6.1. Μοριακή τυποποίηση στελεχών CC398

Ο χαρακτηρισμός των στελεχών που ανήκουν στο CC398 συνεχίστηκε με τη διενέργεια πλήρους MLST τυποποίησης ώστε να επιβεβαιωθούν τα στελέχη του κλωνικού συμπλέγματος αυτού. Συνεπώς, στελέχη που δώσανε ως αποτέλεσμα το αλληλίο *aroE*:35 ελέγχθηκαν και για τα υπόλοιπα γονίδια της MLST μεθόδου, *arc*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil*, η αλληλούχιση των οποίων έδωσε το αποτελέσματα για τον τύπο του κάθε στελέχους.

Τα αποτελέσματα της τυποποίησης βάσει της MLST μεθόδου για τα 21 στελέχη που φέρανε το αλληλίο *aroE*:35 κατέδειξαν ότι τα 17 ανήκουν στον ST398 ενώ βάσει των αλληλουχιών των υπολοίπων στελεχών χαρακτηρίστηκαν τρεις νέοι τύποι κλωνικά συγγενείς με τον ST398, οι ST2684 (δύο στελέχη), ST2759 (ένα) και ST2978 (ένα). Στον Πίνακα 3.4 παρατίθεται το αλληλικό προφίλ των ανωτέρω αναφερθέντων τύπων που χαρακτηρίζουν τα στελέχη της μελέτης.

Πίνακας 3. 4: Αλληλικό προφίλ τύπων κλωνικού συμπλέγματος 398.(παρατίθενται τα αλληλίου για κάθε ένα από τα γονίδια *arc*,*aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil* για τον τύπο ST398 και τους τύπους ST2684, ST2759, ST2978. Οι τρεις τελευταίοι διαφέρουν κατά ένα αλληλίο από τον ST398)

ST	<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqil</i>
398	<u>3</u>	<u>35</u>	<u>19</u>	<u>2</u>	<u>20</u>	<u>26</u>	<u>39</u>
2684	<u>3</u>	<u>35</u>	<u>19</u>	<u>2</u>	<u>20</u>	<u>26</u>	<u>311</u>
2759	<u>3</u>	<u>35</u>	<u>19</u>	<u>2</u>	<u>20</u>	<u>295</u>	<u>39</u>
2978	<u>3</u>	<u>35</u>	<u>376</u>	<u>2</u>	<u>20</u>	<u>26</u>	<u>39</u>

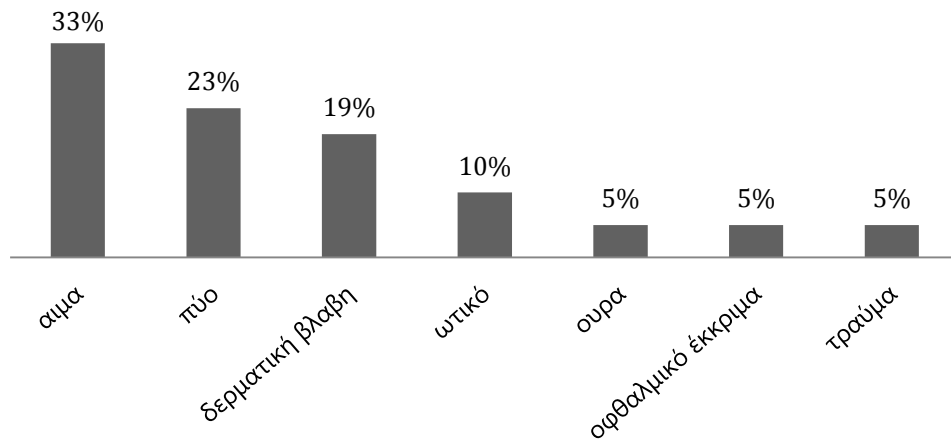
Τα στελέχη του CC398, εκτός του τύπου βάσει της MLST μεθόδου, χαρακτηρίστηκαν και ως προς την πρωτεΐνη A (*sra*-typing) και την ομάδα ρυθμιστικού γονιδίου *agr*. Όλα τα στελέχη ανήκουν στην ομάδα *agrI*, ενώ η τυποποίηση κατά *sra* έδωσε επτά διαφορετικούς τύπους που ομαδοποιούν τα στελέχη. Διαχωρίστηκαν οι εξής τύποι: t034, t011, t571, t6606, t1451, t1255 και t468, στους οποίους ταξινομήθηκαν 6, 4, 4, 3, 2, 1 και 1 στελέχη, αντίστοιχα.

3.6.2. Δημογραφικά στοιχεία στελεχών που ανήκουν στο CC398

Τα στελέχη προήλθαν από ποικίλα κλινικά δείγματα ασθενών που είτε νοσηλεύθηκαν σε κλινικές είτε προσήλθαν σε εξωτερικά ιατρεία του ΠΓΝΛ.

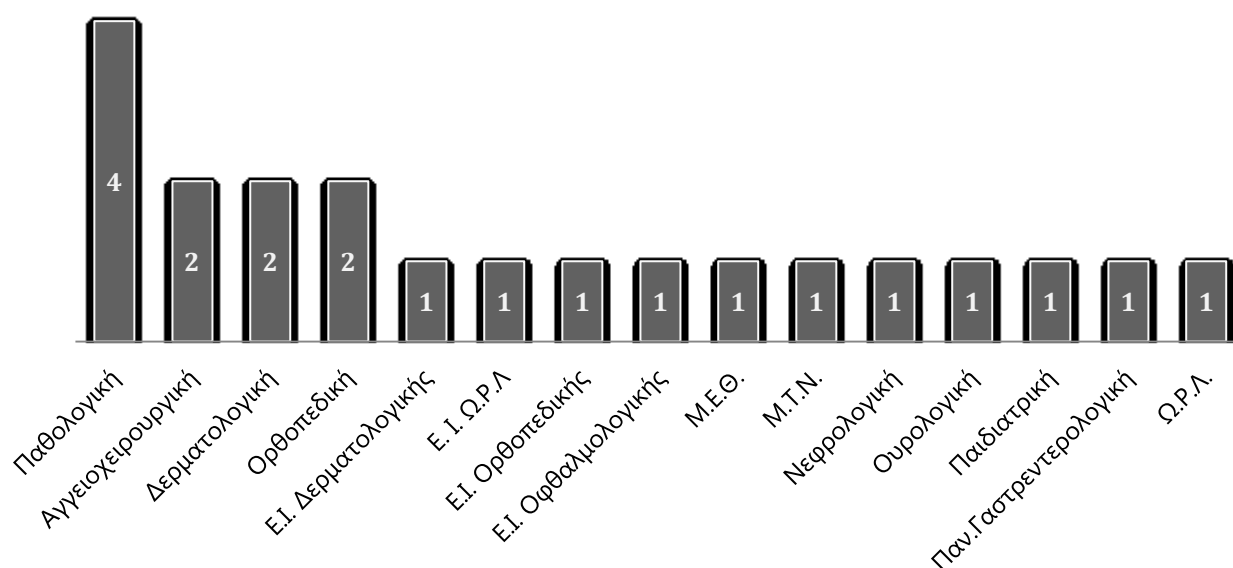
Τα περισσότερα δείγματα του κλωνικού αυτού συμπλέγματος προήλθαν από βακτηριαμίες και απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος, 7 από τα 21 στελέχη (33%). Ακολούθησαν αριθμητικά τα δείγματα πύου και δερματικών βλαβών, με 5 και 4 δείγματα αντίστοιχα, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη απομονώθηκαν από καλλιέργειες τραύματος, ούρων, ωτικού και οφθαλμικού εκκρίματος (Γράφημα 3.4).

Γράφημα 3.4: Κατανομή των στελεχών του CC398 της μελέτης ανά κλινικό δείγμα.



Η πλειοψηφία των στελεχών ανήκε στην Παθολογική κλινική, 4 από τα 21 δείγματα, ενώ από τις κλινικές Αγγειοχειρουργική, Δερματολογική και Ορθοπεδική απομονώθηκαν 2 δείγματα από την κάθε μία. Τα υπόλοιπα δείγματα προήλθαν από τις κλινικές: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ.), Μονάδα Τεχνητού Νεφρού (Μ.Τ.Ν), Νεφρολογική, Ουρολογική, Παιδιατρική, Γαστρεντερολογική, Ωτορινολαρυγγολογική (Ω.Ρ.Λ.), και τα εξωτερικά ιατρεία (Ε.Ι.) : Δερματολογικής, Ω.Ρ.Λ., Ορθοπεδικής, Οφθαλμολογικής (Γράφημα 3.5).

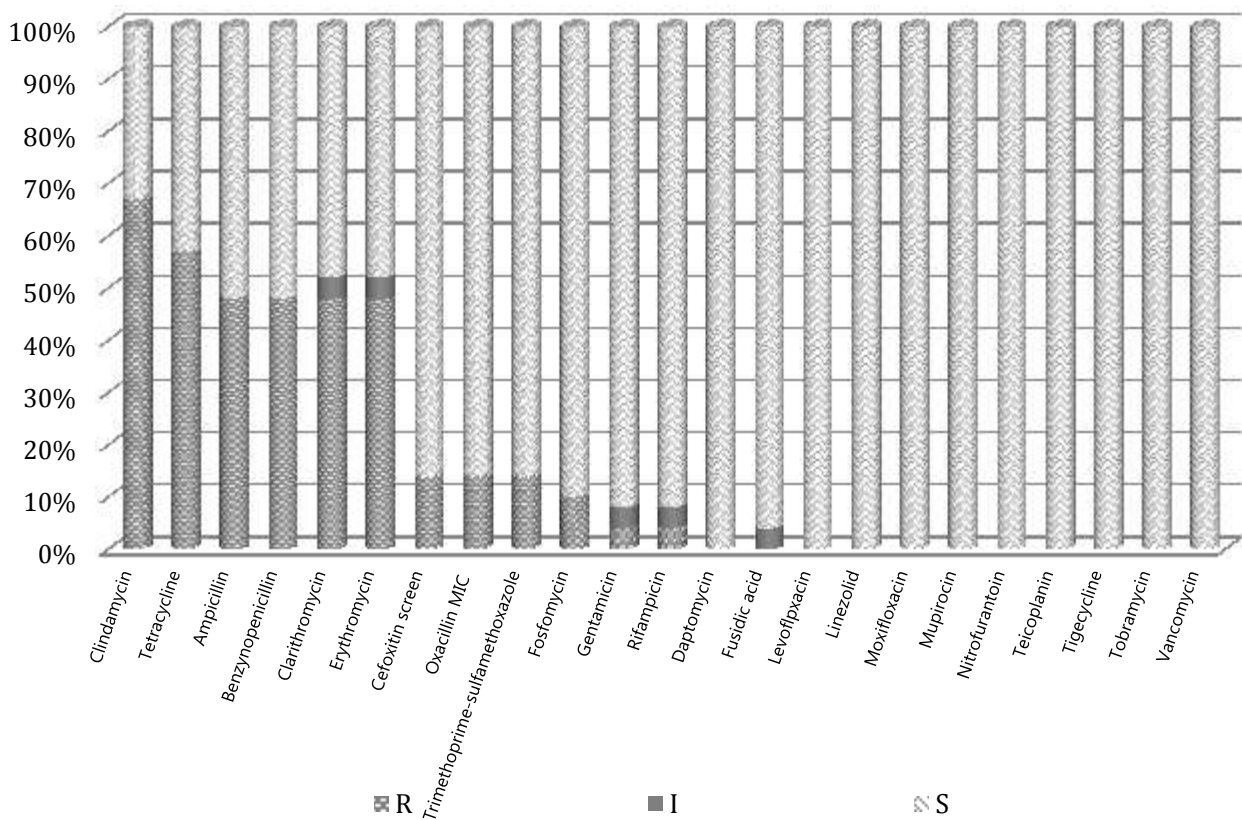
Γράφημα 3. 5: Προέλευση των στελεχών CC398 της μελέτης.



3.6.3. Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά στελεχών CC398

Η ερμηνεία του αντιβιογράμματος για κάθε ένα από τα στελέχη του CC398 έγινε βάσει των κριτηρίων της CLSI. Το 48% των στελεχών βρεθήκαν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, ενώ μεταξύ των στελεχών υπήρξαν 3 στελέχη τα οποία ήταν ανθεκτικά στην οξακιλλίνη (14%) και συνεπώς και στα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η αντοχή σε μακρολίδες και λινκοσαμίδες ανήλθε σε 48% και 67% για ερυθρομυκίνη και κλινταμυκίνη, αντίστοιχα. Επίσης περισσότερα από τα μισά στελέχη εμφάνισαν αντοχή στην τετρακυκλίνη (57%), ενώ σε τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη μόλις το 14%. Τα στελέχη στο σύνολο τους ήταν ευαίσθητα σε βανκομυκίνη, τομπραμυκίνη, τιγκεκυκλίνη, τεϊκοπλανίνη, μουπιροσίνη, μοξιφλοξασίνη, λινεζολίδη, λεβοφλοξασίνη, δαπτομυκίνη (Γράφημα 3.6).

Γράφημα 3. 6: Ποσοστά ευαισθησίας (S), μέσης ευαισθησίας (I) και αντοχής (R) των CC398 στελεχών στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα. R: αντοχή, I: μέτρια ευαισθησία, S: ευαισθησία



3.6.4. Έλεγχος γονιδίων αντοχής στελεχών CC398

Σύμφωνα με τα συνολικά αποτελέσματα αντοχής, τρία μόνο στελέχη του κλωνικού συμπλέγματος CC398 χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά ως MRSA και έφεραν το γονίδιο *mecA* και τη σταφυλοκοκκική κασέτα *SCCmecV*.

Όσον αφορά την αντοχή των στελεχών αυτών στα MLS_B αντιβιοτικά, βρέθηκε ότι, από τα 21 στελέχη, τα 11 χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά και σε μακρολίδες και σε λινκοσαμίδες. Οκτώ από τα στελέχη αυτά έφεραν το γονίδιο *erm(T)*, ένα στέλεχος ήταν θετικό για το γονίδιο *erm(A)*, ένα στέλεχος ήταν θετικό για το γονίδιο *erm(C)*, ενώ σε ένα στέλεχος συνυπήρχαν τα γονίδια *erm(C)* και *erm(T)*. Εκτός των παραπάνω στελεχών, βρέθηκαν επιπλέον 3 στελέχη τα οποία είχαν αντοχή μόνο στις λινκοσαμίδες.

Ο έλεγχος των στελεχών αυτών ανέδειξε υπεύθυνα για την αντοχή τους τα γονίδια *lnu(A)* και *vga(A)* στο ένα στέλεχος και το γονίδιο *lnu(B)* στα άλλα δύο στελέχη.

Η αντοχή στην τετρακυκλίνη, που έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης χαρακτηρισμού των στελεχών που σχετίζονται με την κτηνοτροφία, ελέγχθηκε και τα αποτελέσματα για τα 12 στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως φαινοτυπικά ανθεκτικά, ανέδειξαν υπεύθυνο το γονίδιο *tetM* για τα 9 στελέχη, ενώ για τα υπόλοιπα 3 να ευθύνεται το γονίδιο *tetK*. Τέλος η αντοχή σε τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη στα στα τρία στελέχη που παρατηρήθηκε αιτιολογείται με την παρουσία του γονιδίου *dfrG*.

Συνοδά με τον μοριακό έλεγχο των γονιδίων αντοχής, τα 21 στελέχη ελέγχθηκαν για την παρουσία τοξινογόνων γονιδίων, της λευκοκτονίνης Panton-Valentine (PVL) και της τοξίνης του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST). Όλα τα στελέχη βρεθήκανε αρνητικά στα γονίδια *lukS/lukF-PVL* και *tst*.

3.6.5. Προέλευση στελεχών (ανθρώπινος – ζωικός κλάδος)

Τα στελέχη του κλωνικού συμπλέγματος CC398 έχουν συνδεθεί κατεξοχήν με την ανεύρεσή και τη μετάδοσή τους στο χώρο της κτηνοτροφίας. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι γενετικά χαρακτηριστικά στο γονιδιώμα τους διαχωρίζουν το κλωνικό σύμπλεγμα σε δύο κλάδους, έναν κλάδο που προέρχεται από τα ζώα και έναν δεύτερο ανθρώπινης προέλευσης.

Έτσι, τα 21 στελέχη της μελέτης που χαρακτηρίστηκαν ότι ανήκουν στο CC398 ελέγχθηκαν περεταίρω με σκοπό την διάκριση των στελεχών στους δύο κλάδους. Τα στοιχεία τα οποία επιτρέπουν την παραπάνω διάκριση είναι η παρουσία του προφάγου 3 (*φSa3*) που διακόπτει το γονίδιο της β-αιμολυσίνης (*hly*), το ανθρωπο-ειδικό ανοσολογικό συμπλεγμα διαφυγής (IEC) με τα γονίδια *chp* και *scn*, η παρουσία συγκεκριμένων μονήρων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) καθώς και γονίδια αντοχής όπως τα *tetM* και *SCCmec* τα οποία για τα στελέχη της μελέτης αναφέρθηκαν ανωτέρω.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, 10 στελέχη ανήκουν στον κλάδο τον σχετιζόμενο με την κτηνοτροφία. Τα συγκεκριμένα στελέχη φέρουν τους πολυμορφισμούς: canSNP748(TCA), canSNP1002(ATA), canSNP3737(GAG), επίσης φέρουν το γονίδιο της αιμολυσίνη-β, το οποίο δεν διακόπτεται από την παρουσία βακτηριοφάγου.

Επιπρόσθετα, τα 9 από τα στελέχη χαρακτηρίζονται από αντοχή στην τετρακυκλίνη που οφείλεται στην παρουσία του γονιδίου *tetM* και επίσης ανήκουν σε δύο συγκεκριμένους κατά *sra* τύπους, τους t034 και t011.

Από την άλλη πλευρά, στον κλάδο ανθρώπινης προέλευσης συγκαταλέγονται τα υπόλοιπα 11 στελέχη τα οποία φέρουν τους πολυμορφισμούς canSNP748(CCA), canSNP1002(CTA), canSNP3737(GGG) και περιέχουν τον φSa3 με διάφορους συνδυασμούς των γονιδίων που φέρει (*scn*, *chr* και *sak*) αλλά πάντοτε διακόπτοντας το γονίδιο της αιμολυσίνης-β που δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα στελέχη. Οι τύποι κατά *sra* των στελεχών ήταν: t1255, t468, t1451, t6606 και t571, ενώ τρία από τα στελέχη που παρουσίασαν αντοχή στην τετρακυκλίνη έφεραν το γονίδιο *tetK*.

3.6.6. Πίνακας στελεχών κλωνικού συμπλέγματος CC398

Στον ακόλουθο πίνακα 3. 5, συνοψίζονται τα στοιχεία των στελεχών του κλωνικού συμπλέγματος CC398. Αναφέρονται η ημερομηνία απομόνωσης, η κλινική προέλευσης και ο τύπος του δείγματος ο ST τύπος, ο *agr* τύπος, ο *sra* τύπος, η ύπαρξη γονιδίων αντοχής, και ο χαρακτηρισμός του κλάδου προέλευσης του στελέχους (ζωικός ή ανθρώπινος) σύμφωνα με τα στοιχεία από τη μελέτη των πολυμορφισμών, της ύπαρξης των γονιδίων της αιμολυσίνης, του φάγου φSa3 και του IEC.

Πίνακας 3. 5: Στελέχη κλωνικού συμπλέγματος CC398: υλικό και χρόνος απομόνωσης, φαινότυπος αντοχής σε συνδυασμό με τα υπεύθυναγονίδια, χαρακτηρισμός κλάδου

Strain	Προέλευση/ (CA/HA)	Ημ/νία απομόνωσης	Κλινική	ST/agr	sra/ SCCmec	Φαινότυπος αντοχής	Γονίδια αντοχής	canSNPs 748, 1002, 3737	φ3int/hlb	chp/sak/ scn/	κλάδος
2682-MSSA	πόο/CA	27-03-2012	Αγγειοχειρουργική	398/I	t034	P,CC, TET,SXT	<i>hnu(B), tetM, dfrG</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3125-MSSA	δερματική βλάβη/CA	09-10-2012	Ορθοπεδική	398/I	t034	P,CC, TET	<i>hnu(B), tetM,</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3130-MSSA	πόο/HA	13-10-2012	Ε.Ι. Ωτορινολαρυγγολογικής	398/I	t034	P, FOS, TET	<i>tetM</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3221-MRSA	δερματική βλάβη /CA	16-10-2012	Δερματολογική	398/I	t034/V	P, OX, E, CC, RA, TET, SXT	<i>mecA, erm(A), tetM, dfrG</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3158-MSSA	πόο/CA	24-10-2012	Οφθαλμολογική	2684/I	t011	P, SXT	<i>dfrG</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3303-MRSA	πόο/CA	20-12-2012	Παθολογική	398/I	t011/V	P, OX, CC, TET	<i>mecA, hnu(A), vgaA, tetM</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
3343-MSSA	δερματική βλάβη /CA	12-01-2013	Ορθοπεδική	398/I	t1255	-	-	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος
3402-MSSA	δερματική βλάβη/CA	01-02-2013	Παθολογία	398/I	t1451	E,CC,	<i>erm(T), erm(C),</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος
3659-MSSA	πόο/CA	11-05-2013	Ωτορινολαρυγγολογική	2759/I	t6606	E, CC	<i>erm(T)</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,-	Ανθρώπινος
3699-MSSA	αίμα/HA	22-05-2013	Παθολογική	398/I	t468	E, CC	<i>erm(T),</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος
4013-MSSA	αίμα/CA	29-09-2013	Δερματολογική	398/I	t1451	-	-	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος
4042-MSSA	αίμα/HA	09-10-2013	Παθολογική	2978/I	t6606	E, CC	<i>erm(T)</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,-	Ανθρώπινος
4066-MSSA	αίμα/CA	19-10-2013	Παθολογική	398/I	t6606	E,CC	<i>erm(T),</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,-	Ανθρώπινος
4218-MSSA	αίμα/HA	13-12-2013	Παθολογική	398/I	t011	P, TET	<i>tetM,</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
4219-MSSA	δερματική βλάβη /CA	13-12-2013	Δερματολογική	398/I	t034	P, FOS, TET	<i>tetM</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
4161-MRSA	τραύμα/CA	21-11-2013	Ορθοπεδική	2684/I	t034	P, OX, E, CC, RA, TET, SXT	<i>erm(C), tetM</i>	TCA,ATA,GAG	-,+	-,-,-	Ζωικός
4248-MSSA	πόο/CA	29-12-2013	Αγγειοχειρουργική	398/I	t571	E,CC	<i>erm(T)</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,-	Ανθρώπινος
4311-MSSA	δερματική βλάβη /CA	23-12-2014	Δερματολογική	398/I	t571	E, CC, TET	<i>erm(T), tetK</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,-	Ανθρώπινος
4617-MSSA	αίμα/CA	20-08-2014	Παιδιατρική	398/I	t571	E, CC, TET	<i>erm(T), tetK</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος
4802-MSSA	δερματική βλάβη /CA	11-11-2014	Παθολογική	398/I	t571	E, CC, TET	<i>erm(T), tetK</i>	CCA,CTA,GGG	+,-	+,-,+	Ανθρώπινος

CA: community-associated; HA: hospital-associated; ST: sequence type

P: penicillin; FOS: fosfomycin; E: erythromycin; CC: clindamycin; SXT: sulfamethoxazole-trimethoprim; RA: rifampicin; OX: oxacillin

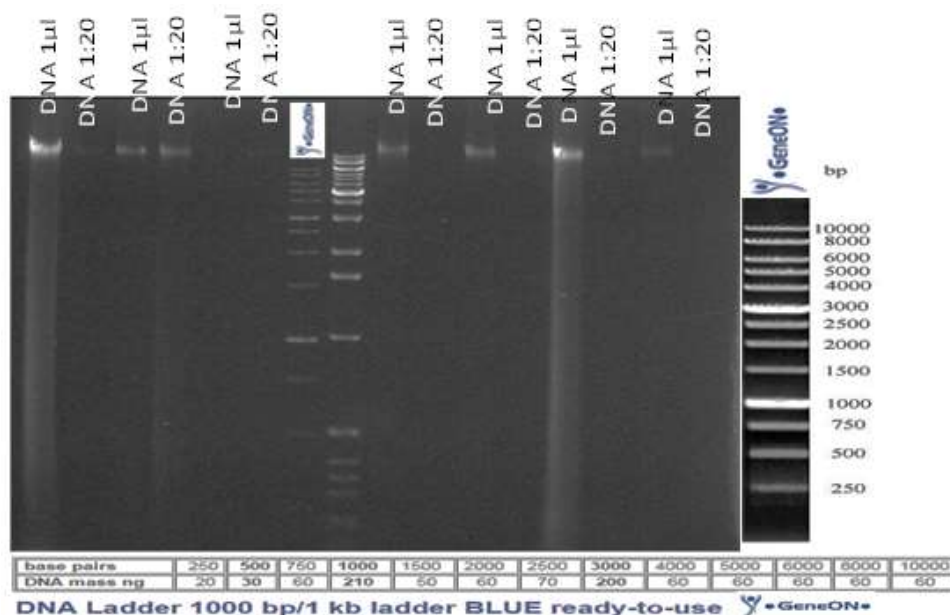
3.7. Χαρακτηρισμός γενετικού τύπου γονιδίου *lnu(B)*

Προσδιορισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *lnu(B)* με κλωνοποίηση τμημάτων γενωμικού DNA του LAR2682.

3.7.1. Απομόνωση και ποσοτικοποίηση DNA (πρωτόκολλο Gram θετικών κόκκων)

Το DNA που απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gram (+) κόκκων για απομόνωση υψηλής ποιότητας γενετικού υλικού που περιγράφεται παραπάνω ποσοτικοποιήθηκε με βάση τον μάρτυρα μοριακού βάρους (DNA Ladder 1kb, Blue, GeneOn) για τον οποίο είναι γνωστή η συγκέντρωση του DNA που περιέχει σε κάθε διακριτή ζώνη. Ποσότητα ίση με 1μl από το εξαχθέν DNA ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με αραιώση 1:20 του ίδιου DNA ώστε να καταστεί δυνατή η ποσοτικοποίησή του. Η σύγκριση της ηλεκτροφορημένης ποσότητας του αραιωμένου (1:20) DNA αντιστοιχίστηκε με εκείνη του μάρτυρα στη ζώνη των 500bp που περιέχει 30ng DNA. Συνεπώς, το αρχικό DNA έχει συγκέντρωση 0.5.-0.6 μg/μl. Το δείγμα του DNA κρίθηκε καλής ποιότητας αφού η ποσότητα του κατακεραματισμένου DNA θεωρήθηκε αμελητέα. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση του DNA παράλληλα με την αραιώσή του και το μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους και συγκέντρωσης DNA.

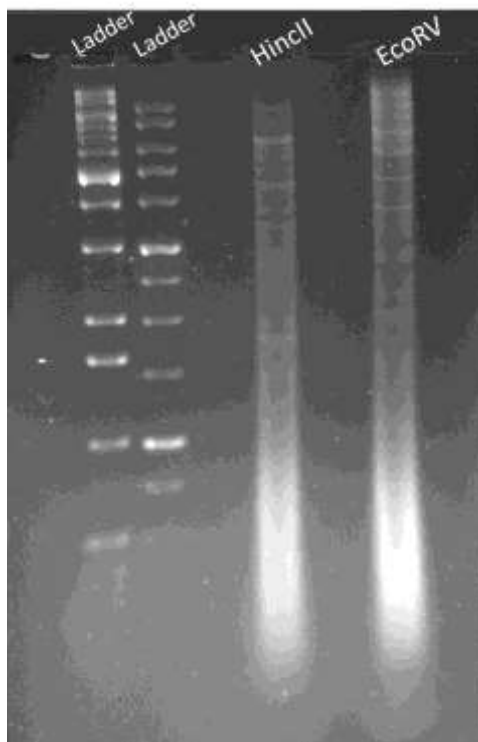
Εικόνα 3 3:ηλεκτροφόρηση του DNA παράλληλα με την αραιώσή του και το μάρτυρα μοριακού βάρους 10.000 bp



3.7.2 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ένζυμα που επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για πέψη του DNA του LAR2682 ήταν τα *HincII* και *EcoRV*. Στην Εικόνα 3.4 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των πέψεων με τα ένζυμα *HincII* και *EcoRV*.

Εικόνα 3. 4: Ηλεκτροφόρηση πέψεων DNA του LAR2682 με τα περιοριστικά ένζυμα *HincII*, *EcoRV*.

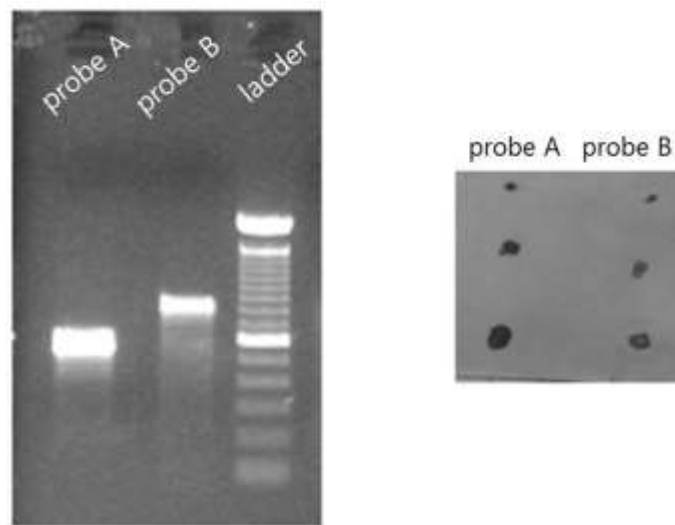


3.7.3 Αποτελέσματα υβριδισμού

Οι αλληλουχίες-ιχνηθέτες ενισχύθηκαν με PCR, στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε το προϊόν της αντίδρασης και ακολούθησε καθαρισμός αυτού. Τα τμήματα του DNA που προέκυψαν σημάνθηκαν με βιοτίνη όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική υβριδοποίηση σε νάilon μεμβράνη χωρίς DNA σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις και εμφάνιση του σήματος (spotting).

Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των ανιχνευτών με μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp DNA Ladder (Invitrogen) και το σήμα των δύο ανιχνευτών έπειτα από τη δοκιμαστική υβριδοποίηση.

Εικόνα 3. 5: Ηλεκτροφόρηση των ανιχνευτών probeA και B μεγέθους 573bp και 849bp αντίστοιχα με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (ladder) και έλεγχος σήματος των ανιχνευτών (spotting)

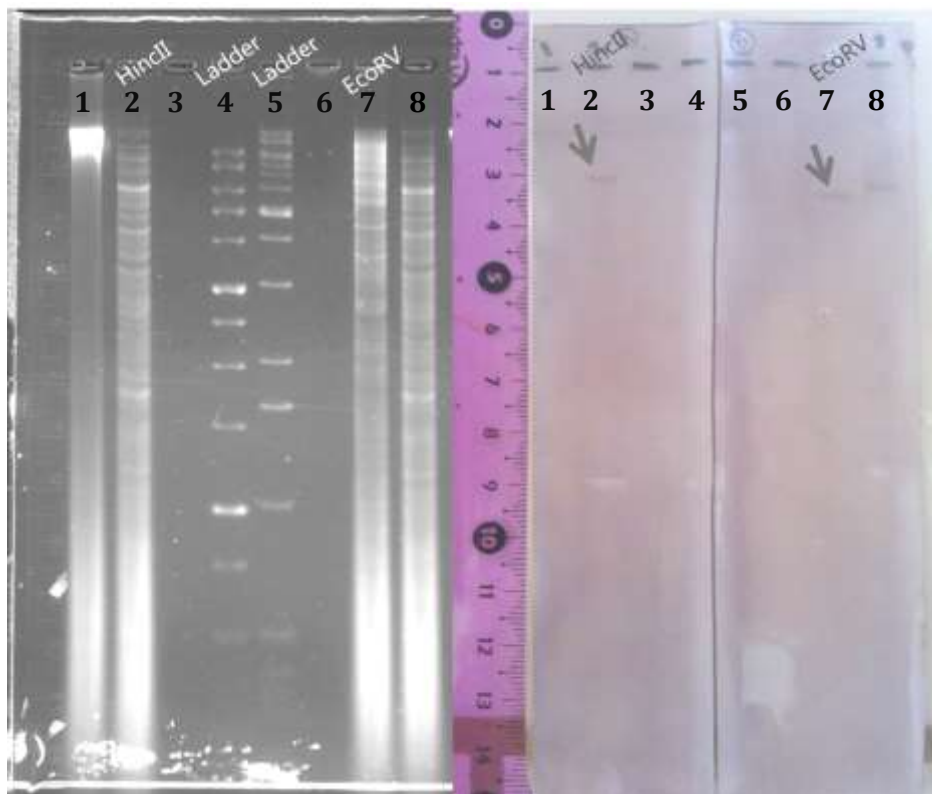


3.7.4 Υβριδισμός κατά Southern

Οι πέψεις του LAR2682 με τα ένζυμα *HincII* και *EcoRV* ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης με σκοπό τον διαχωρισμό των ζωνών που προέκυψαν και στη συνέχεια ακολούθησε ο υβριδισμός αυτών κατά Southern. Οι σημασμένοι ανιχνευτές probeA και probeB ανίχνευσαν σήμα στις πέψεις με τα ένζυμα *HincII* και *EcoRV*, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 3.6 φαίνονται σε παράθεση τα διαχωρισμένα τμήματα του DNA έπειτα από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα και η εμφάνιση των σημάτων ανίχνευσης των τμημάτων DNA που φέρουν το κομμάτι του ιχνηθέτη.

Το σήμα που ανιχνεύθηκε αντιστοιχεί σε τμήματα DNA μεγέθους υπολογιζόμενου μεταξύ 6.000-7.000bp όσον αφορά την πέψη με *HincII* και την υβριδοποίηση με τον probeA, και 5.300-5.700bp για την πέψη με *EcoRV* και την υβριδοποίηση με τον probeB. Τα παραπάνω τμήματα του DNA κρίθηκαν κατάλληλα για τη συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας αφού το μεγεθός τους επέτρεπε την κλωνοποίησή τους και πιθανόν περιείχαν τμήμα του μη αλληλουχιμένου τμήματος γύρω από το γονίδιο αντοχής.

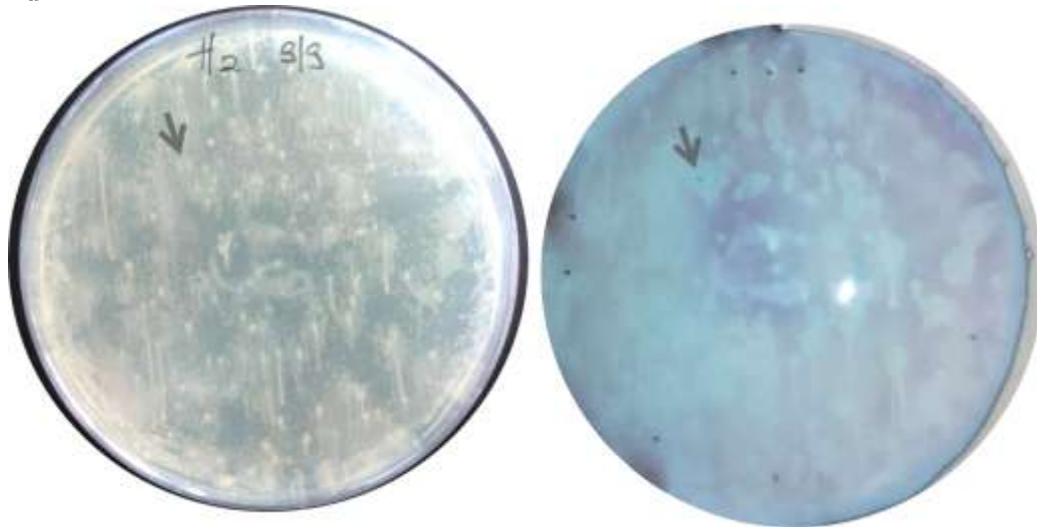
Εικόνα 3. 6: Ηλεκτροφόρηση πέψων (αριστερά) και ανίχνευση σήματος ιχνηθέτη (δεξιά). (Βοθρία: 1:άπεπτο DNA, 2:πέψη με *HincII*, 3: κενό, 4-5:ladder, 6: κενό, 7: πέψη με *EcoRV*, 8: δοκιμαστική πέψη με άλλο ένζυμο. Ανίχνευση σήματος (βέλη) παρατηρείται στις θέσεις 2 και 7 των πέψεων με *HincII* και *EcoRV*



3.7.5 Κλωνοποίηση γενετικού περιβάλλοντος γονιδίου *lhu(B)* [Δημιουργία αντίγραφων αποικιών και ανίχνευση κλώνων]

Στην Εικόνα 3.7 φαίνεται το στερεό θρεπτικό υλικό μετά τη μεταφορά του γενετικού υλικού στη μεμβράνη και η σήμανση της μεμβράνης μετά τον υβριδισμό. Η αποικία που φέρει τον ανασυνδυασμένο φορέα με την επιθυμητή αλληλουχία σημάνθηκε και απομονώθηκε από το αρχικό τρυβλίο.

Εικόνα 3. 7: Το τρυβλίο μετά τη μεταφορά του DNA στη μεμβράνη (αριστερά) η οποία υβριδοποιήθηκε κατά Southern (δεξιά) καθώς και η αποικία που σημάνθηκε συνέχεια απομονώθηκε από το αρχικό τρυβλίο (βέλη).



Η αλληλουχία που προέκυψε μετά την πέψη του LAR2682 με *HincII* ανευρέθηκε σε μία αποικία η οποία και σημάνθηκε (Εικόνα 3.7). Η αποικία αυτή στη συνέχεια αναδιλύθηκε και επώαστηκε σε LB broth. Την επόμενη ημέρα επιστρώθηκε σε διαφορετικές αραιώσεις σε στερεό θρεπτικό υλικό, το τρυβλίο που μετά την ανάπτυξη των αποικιών είχε εικόνα διαχωρισμένων αποικιών ικανών για απομόνωση χρησιμοποιήθηκε για νέα αποτύπωση κατά Southern. Τελικά οκτώ αποικίες που έδωσαν ικανά διαχωρισμένο σήμα, ανακαλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν για τη συνέχεια του πειράματος (Εικόνα 3.8). Αντίστοιχα, για την αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη με *EcoRV* αρχικά σημάνθηκαν δέκα αποικίες οι οποίες επανελέγχθηκαν με την προαναφερθείσα διαδικασία, αποδίδοντας τελικά οκτώ κλώνους με την επιθυμητή αλληλουχία.

Εικόνα 3.8: Επανελέγχος αποικιών που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα με την αλληλουχία μετά την πέψη *HincII* (secondary screening).



3.7.6 Αλληλούχιση νέων τμημάτων DNA.

Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τη διαλογή των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, αλληλουχήθηκαν αρχικά με εκκινητές του φορέα ώστε να γίνει δυνατή η οριοθέτηση της αλληλουχίας που κλωνοποιήθηκε. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST. Για την πρώτη αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν οι universal εκκινητές T7 και M13R(-48). Για το πλασμίδιο *EcoRV_plasmid_1* οι αλληλουχίες που προέκυψαν αντιστοιχούσαν για το ένα άκρο σε *resolvase* και για το άλλο άκρο σε υποθετική πρωτεΐνη που είχε ήδη αλληλουχηθεί πριν την κλωνοποίηση. Συνεπώς, η κλωνοποίηση δεν απέδωσε περεταίρω νουκλεοτιδική αλληλουχία που θα επέτρεπε την ανάγνωση του γενετικού τύπου προς την συγκεκριμένη πλευρά. Για το πλασμίδιο *HincII_plasmid_1* οι εκκινητές, περιέγραψαν αλληλουχία που στο ένα άκρο είχε τμήμα του γονιδίου *aadE* που ήδη είχε αναγνωστεί και στο άλλο άκρο δομή που αντιστοιχούσε σε γονίδιο χρωμοσώματος *S. aureus*. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στο πλασμίδιο αυτό συμπεριλαμβάνεται το ένα άκρο της δομής του μεταθετού στοιχείου που φέρει το γονίδιο αντοχής *lnu(B)*.

Η συνέχιση της αλληλούχισης του πλασμιδίου που κλωνοποιήθηκε έγινε με τεχνική walking, συνεπώς κάθε αλληλούχιση ενός τμήματος ακολουθούσαν από σχεδιασμό νέου εκκινητή για την ανάγνωση της ακόλουθης αλληλουχίας. Η ανάγνωση με τους παραπάνω εκκινητές αποκάλυψε την ύπαρξη αλληλουχίας κατά συνέχεια της γνωστής έως αυτό το σημείο που στο ένα άκρο της είχε την αλληλουχία εισδοχής ISSsu5. Η ίδια αλληλουχία υπήρχε και στο άλλο άκρο της αλληλουχίας που έφερε τα γονίδια *lsa(E)/lnu(B)*. Πρόκειται δηλαδή για μία νέα δομή μεγέθους 10.247bp που ορίζεται από τις αλληλουχίες εισδοχής ISSsu5 σε παράλληλη κατεύθυνση. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες εισδοχής ανήκουν στην οικογένεια IS1380 που περιγράφηκαν αρχικά σε στέλεχος *Streptococcus suis* (Chen *et al*,2007).

Αναλυτικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.9, καθοδικά της αριστερά ευρισκόμενης αλληλουχίας εισδοχής ISSsu5 βρίσκεται τμήμα 6.243bp (nts 818-7,060) που περιέχει έξι πλαίσια ανοιχτής ανάγνωσης (ORFs). Η σειρά των οποίων είναι: *lsa(E)*, *lnu(B)*, *resolvase*, *toxin/antitoxin*, *nucleotidyl-transferase*, and *methyl-transferase*. Το τμήμα αυτό

παρουσιάζει ομοιότητα 99% με το αντίστοιχο τμήμα του πλασμιδίου p3 του *E. Faecium* (GenBank accession NoCP006623).

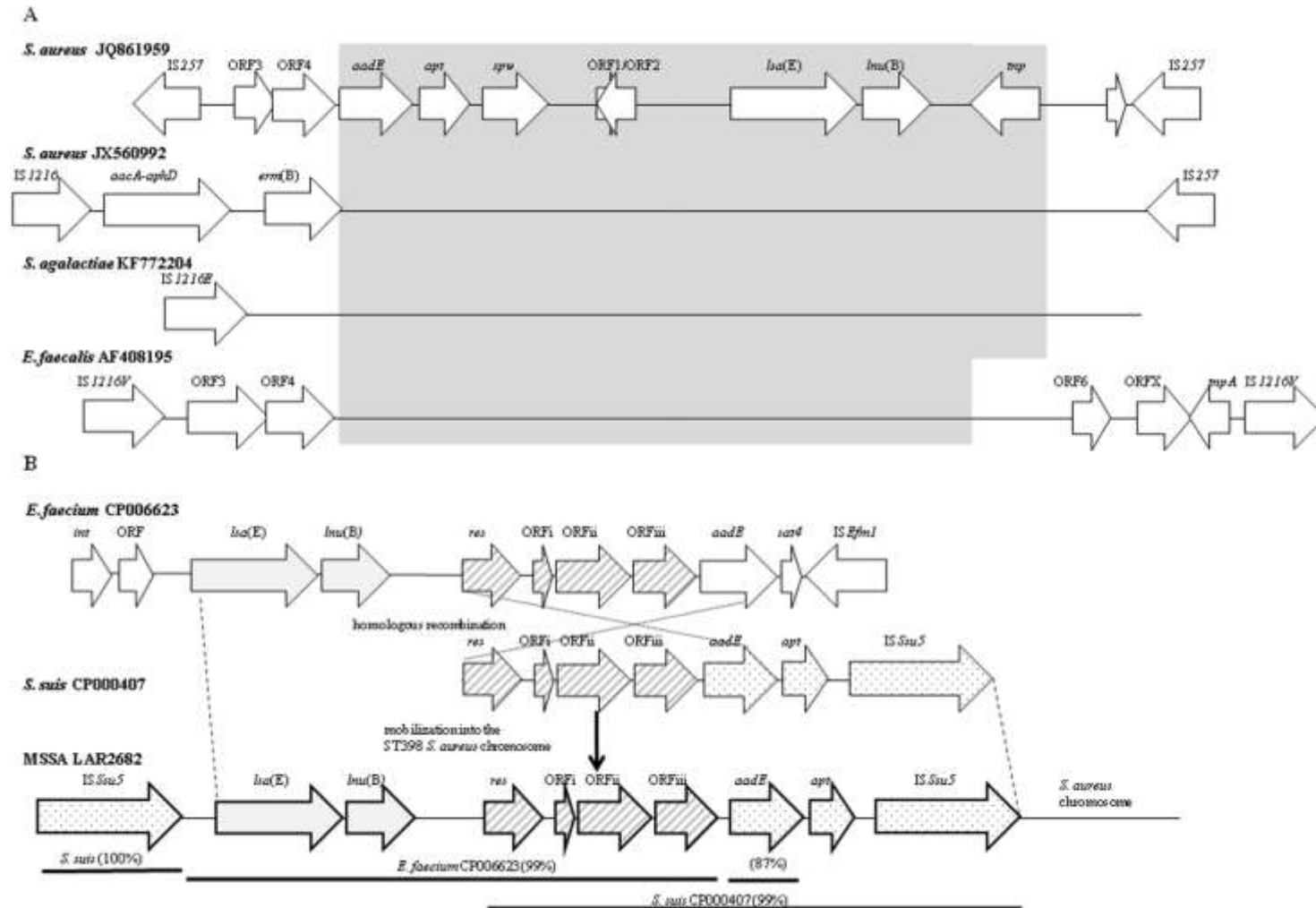
Δίπλα στο τελευταίο κομμάτι του παραπάνω τμήματος, βρίσκεται το γονίδιο *aadE* που ευθύνεται για αντοχή στη στρεπτομυκίνη. Το γονίδιο αυτό πιθανολογείται να είναι διαφορετικής προέλευσης, δεδομένου ότι έδειξε μόνο 87% ομοιότητα με το αντίστοιχο τμήμα γενετικού υλικού που συναντάται στον *E. faecium*, ενώ είναι ταυτόσημο με τα αντίστοιχα σε παρόμοιες δομές από *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* και *Streptococcus suis* (GenBank accession NoJQ861959, JX560992, AF408195, KF772204 και CP000407).

Κατά συνέχεια του *aadE* περιγράφεται το γονίδιο *apt*, μια αδενίνη φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράση, το οποίο συγκρινόμενο με τις προηγούμενες περιγραφείσες δομές που φέρουν το συνδυασμό *Isa(E)/Inu(B)* βρίσκεται καθοδικά του *Inu(B)* και όχι ανοδικά.

Τέλος η δεξιά ευρισκόμενη αλληλουχία εισδοχής ISSsu5 περιγράφεται δίπλα σε ένα τμήμα 2.213bp αλληλουχίας *S. aureus*, που υποδεικνύει τη θέση ενσωμάτωσης αυτού του νέου μεταθετού στοιχείου στο χρωμόσωμα του MSSA LAR2682 στελέχους. Έχει σημασία να συσχετιστεί η ομοιότητα κατά 99% τμήματος 5913 bp (από το γονίδιο *resolvase* μέχρι τη δεξιά περιγραφόμενη αλληλουχία εισδοχής ISSsu5) με περιοχή στελέχους *S. suis* (GenBank accession No CP000407) αφού το εν λόγω στέλεχος δεν έφερε το συνδυασμό των *Isa(E)/Inu(B)*.

Εικόνα 3. 9: Σχηματική εικόνα γενετικού τύπου γονιδίου *Inu(B)*

(Α) Γενετικό περιβάλλον γονιδίου *Inu(B)* όπως έχει περιγραφεί από άλλα είδη Gram θετικών βακτηρίων. Η γκριζα περιοχή υποδεικνύει την ομοιότητα των αλληλουχιών
 (Β) Η νέα δομή που φέρει το γονίδιο *Inu(B)* και χαρακτηρίστηκε κατά τη μελέτη αυτή. Γονίδια των *E. Faecium* και *S. suis* παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με το τρανσποζόνιο του *S. aureus* (MSSA) LAR2682, έχουν σημειωθεί με διαγώνιες γραμμές, ανοιχτή γκρι σκίαση, και τελείες αντίστοιχα, υποδεικνύοντας το σχηματισμό της νέας δομής έπειτα από ομόλογο ανασυνδυασμό και ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του *S. aureus*.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταξύ των Gram-θετικών βακτηρίων, ο *S. aureus*, εξακολουθεί να αποτελεί αίτιο λοιμώξεων τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα . Η διασπορά συγκεκριμένων «επιτυχημένων» κλώνων όσο και η ανάπτυξη στελεχών με νέα γονίδια αντοχής και παθογονικότητας καθιστούν αναγκαία την επιδημιολογική επιτήρηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Drougka *et al.*, 2014). Μελέτες έχουν δείξει ότι ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή κυριαρχούν διαφορετικοί κλώνοι *S. aureus*, με χαρακτηριστικές ευαισθησίες σε αντιμικροβιακά φάρμακα (Grundmann *et al.*, 2014)

Είναι γνωστό ότι η χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων δεν έχει περιοριστεί μόνο στη θεραπεία των λοιμώξεων αλλά συχνά αντιβιοτικά, όπως τετρακυκλίνη, στρεπτογραμμίνες, αβοπαρσίνη κλπ, έχουν χρησιμοποιηθεί και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες στην κτηνοτροφία, με αποτέλεσμα την αλλαγή της μικροβιακής χλωρίδας των ζώων και την επιλογή-ανάδυση ανθεκτικών στελεχών, τα οποία αργότερα μέσω της τροφικής αλυσίδας ή άλλων οδών μετάδοσης αποτελούν δυνητικά παθογόνα για λοιμώξεις στον άνθρωπο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη των βανκομυκίνη-ανθεκτικών εντεροκόκκων (VRE) μετά από την ευρεία χρήση στην κτηνοτροφία της αβοπαρσίνης, ενός γλυκοπεπτιδίου αναλόγου δομής και δράσης με την βανκομυκίνη (López *et al.*, 2013). Τα στελέχη αυτά αποτελούν ακόμη και σήμερα αίτιο σοβαρών λοιμώξεων, και ενδοноσοκομειακών επιδημιών. Άλλωστε και στη Γαλλία η χρήση της πριστιναμυκίνης ως αυξητικού παράγοντα στην κτηνοτροφία ευνόησε την ανάπτυξη σταφυλοκόκκων με αντοχή στις στρεπτογραμμίνες. Είναι φανερό ότι η επιτήρηση της κατανάλωσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία είναι ζωτικής σημασίας στη συντονισμένη προσπάθεια περιορισμού της αντιμικροβιακής αντοχής (Aarestrup *et al.*, 1998)

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε στα πλαίσια μιας γενικότερης επιδημιολογικής επιτήρησης του *S. aureus* στην περιοχή της Θεσσαλίας και περιέλαβε για πρώτη φορά εκτός από τα κλινικά ανθρώπινα δείγματα και δείγματα από παραγωγικά ζώα και ζώα συντροφιάς. Είναι γνωστό ότι άτομα με ρινική φορεία χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου κάνουν δερματικές λοιμώξεις, οι οποίες μπορεί να υποτροπιάσουν αν δεν γίνει θεραπεία ριζικής εκρίζωσης του *S. aureus* με μουπιροσίνη (Mehraj *et al.*, 2016). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι συχνά ζώα συντροφιάς αποικίζονται από στελέχη *S. aureus* τα οποία στη συνέχεια μεταδίδουν σε ανθρώπους οι οποίοι εκδηλώνουν σταφυλοκοκκική λοίμωξη.

Υπάρχουν διάφορες μελέτες σχετικά με τη συχνότητα απομόνωσης του *S. aureus* στα ζώα. Στην παρούσα μελέτη το συνολικό ποσοστό απομόνωσης του *S. aureus* από τα ζώα που ελέγχθηκαν ήταν πολύ χαμηλό (13/512; 2,5%), σε σύγκριση με μελέτη των Drougka *et al.*, που έδειξε ότι 37% των σκύλων και 30% των γατών βρέθηκαν αποικισμένα με χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο στις ρινικές τους χοάνες. Επίσης μελέτη που έγινε σε ζώα του Αττικού Ζωολογικού Πάρκου έδειξε ποσοστό αποικισμού με *S. aureus* 9.8% (Drougka *et al*, 2015). Το χαμηλό ποσοστό (2,5%) μπορεί να αποδοθεί στην λήψη ενός δείγματος από κάθε ζώο και όχι παράλληλο έλεγχο ρινικού και ορθοπρωκτικού δείγματος στα ζώα της μελέτης που πιθανότατα θα αύξανε το ποσοστό ανίχνευσης.

Ο αρχικός στόχος της μελέτης μας ήταν να προσδιοριστούν τα ποσοστά αντοχής του *S. aureus* σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά (β-λακταμικά, μακρολίδες, λινκοσαμίδες, τετρακυκλίνη) και να συγκριθούν πιθανές διαφορές της αντοχής ανάμεσα σε στελέχη ανθρώπων και ζώων. Στη συνέχεια, ανάμεσα στα στελέχη της μελέτης προσδιορίστηκε ο κλώνος CC398, ο οποίος έχει συσχετιστεί στην Ευρώπη με λοιμώξεις σε ζώα και σε ανθρώπους, και ο οποίος έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα στη χώρα μας από δύο περιστατικά σοβαρών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Τέλος, σε στέλεχος CC398 ζωικής προέλευσης, που απομονώθηκε από λοίμωξη σε άνθρωπο και το οποίο έφερε ένα σπάνιο γονίδιο αντοχής στις λινκοσαμίδες, χαρακτηρίστηκε το γενετικό του περιβάλλον.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας, το ποσοστό αντοχής στελεχών *S. aureus* στη μεθικιλίνη που απομονώθηκαν από ανθρώπινα δείγματα ήταν 38.5%, ποσοστό το οποίο συμβαδίζει με εκείνο που περιγράφεται στις πρόσφατες πολυκεντρικές μελέτες από Drougka *et al*, 2014 και Souli *et al*, 2015. Η πρώτη καταγραφή των MRSA στην περιοχή μας (Petinaki *et al*, 2001) έγινε το 2000 με το ποσοστό αντοχής στην μεθικιλίνη να είναι 14,8%. Στη συνέχεια, από το 2001 και μέχρι το 2008, το ποσοστό των MRSA που απομονώθηκαν στο ΠΓΝΑ εμφάνισε αύξηση, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής παρατηρήθηκε το 2007 (55%) (Drougka *et al*, 2014). Από το 2008 και μέχρι το 2012 παρατηρείται σταδιακή μείωση της επίπτωσης των *S. aureus* η οποία πλέον σταθεροποιείται τα τελευταία χρόνια μεταξύ 38-40%. Η διαφορά ανάμεσα στο σημερινό ποσοστό 38,5% σε σχέση με το χαμηλό 14,8% στη μελέτη του 2001 θα μπορούσε να εξηγηθεί αφενός επειδή τα στελέχη αφορούσαν κυρίως λοιμώξεις από την κοινότητα όπου τα στελέχη είναι περισσότερο ευαίσθητα και αφετέρου διότι τα όρια αντοχής στη μεθικιλίνη ήταν σαφώς υψηλότερα από τα σημερινά (4mg/L το

2000 έναντι 2 mg/L το 2016). (CLSI,2012; CLSI,2016). Όλα τα ανθεκτικά στη cefoxitin ανθρώπινης προέλευσης στελέχη έφεραν το *mecA* γονίδιο. Κανένα στέλεχος MRSA δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ αυτών που απομονώθηκαν από τα ζώα της μελέτης μας. Προηγούμενη μελέτη των Drougka et al, 2016 έχει αναδείξει ποσοστό 10,8% των *S. aureus* που απομονώθηκαν από ζώα συντροφιάς να είναι MRSA. Ωστόσο, στη μελέτη που έγινε σε ζώα του Αττικού Ζωολογικού Πάρκου δεν ανιχνεύθηκε κανένα MRSA στέλεχος (Drougka et al, 2015).

Επιπλέον, τα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες και στις λινκοσαμίδες του *S. aureus* της μελέτης μας ήταν 37.5% και 32% αντίστοιχα, σημαντικά χαμηλότερα συγκρινόμενα με τα αποτελέσματα των Souli et al (66.5% αντοχή σε μακρολίδες, 79.2% σε λινκοσαμίδες). Πιθανή ερμηνεία για τη διαφορά των ποσοστών ανάμεσα στις μελέτες θα μπορούσε να αποτελεί ο διαφορετικός πληθυσμός των στελεχών δεδομένου ότι η μελέτη των Souli et al αφορούσε αποκλειστικά νοσοκομειακά στελέχη. Στην παρούσα μελέτη, ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν η μεγάλη αύξηση του ποσοστού αντοχής στα MLS_B αντιβιοτικά σε σχέση με προηγούμενα δεδομένα στην περιοχή μας (21.1% από μελέτη των Katorodis et al, 2010; 11.7% από μελέτη των Spilioroulou et al, 2004). Πιθανόν η αύξηση της αντοχής να συσχετίζεται με την ευρεία χρήση των μακρολιδών ως θεραπεία στη φαρυγγοαμυγδαλίτιδα και της κλινδαμυκίνης ως θεραπεία δερματικών λοιμώξεων. Ανάμεσα στα MRSA και στα MSSA της μελέτης παρατηρούνται διαφορές στο ποσοστό αντοχής τους στα MLS_B αντιβιοτικά (58% έναντι 13% αντίστοιχα). Σημαντική αλλαγή σε σχέση με παλαιότερες μελέτες παρατηρείται και στην κατανομή των υπευθύνων γονιδίων, αφού το γονίδιο *erm(A)* κυριαρχεί στα MRSA, ενώ το γονίδιο *erm(C)* κυριαρχεί στα MSSA (Spilioroulou et al, 2004). Σύμφωνα με την μελέτη των Spilioroulou et al το 2004 το γονίδιο που κυριαρχούσε στα MSSA ήταν το *erm(A)*, ενώ στα MRSA κυριαρχούσε αντίστοιχα το *erm(C)*. Επιπλέον, για πρώτη φορά μέχρι σήμερα ανιχνεύονται στη χώρα μας MLS_B ανθεκτικά στελέχη που φέρουν γονίδια όπως το *erm(T)*, *lnu(A)*, και *lnu(B)*. Τα παραπάνω ευρήματα, σε συνδυασμό με την αλλαγή της κατανομή των *erm* γονιδίων επιβεβαιώνουν την ανάγκη της συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης των στελεχών *S. aureus*. Κανένα από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα ζώα δεν εξέφραζε αντοχή σε μακρολίδες ή λινκοσαμίδες. Αντίθετα, στη μελέτη των Drougka et al σε *S. aureus* που απομονώθηκαν από ζώα συντροφιάς αναφέρεται ποσοστό αντοχής στην ερυθρομυκίνη 24.5% και στην κλινδαμυκίνη 22.6%.

Τέλος, η αντοχή σε τετρακυκλίνη των στελεχών της μελέτης μας ανέρχονταν στο 26%, και αφορούσε αποκλειστικά στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από ανθρώπους. Συγκεκριμένα το ποσοστό αντοχής των MRSA ήταν 50% ενώ το ποσοστό αντοχής στα MSSA ήταν 9.8%. Η ανίχνευση των γονιδίων που συσχετίζονται με αντοχή στην τετρακυκλίνη έγινε μόνο σε στελέχη CC398, όπου ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *tetM* και *tetK*, ανάλογα με την προέλευση των CC398. Κανένα στέλεχος με αντοχή στην τετρακυκλίνη δεν ανιχνεύθηκε στα στελέχη των ζώων. Αντίστοιχα, στη μελέτη των ζώων συντροφιάς 35.8% των *S. aureus* ήταν ανθεκτικοί στην τετρακυκλίνη (Drougka et al, 2016).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στελέχη CC398 του *S. aureus*, και συγκεκριμένα MRSA, έχουν συσχετιστεί με την κτηνοτροφία, και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες τα στελέχη αυτά αποτέλεσαν αίτιο νοσοκομειακών επιδημιών (Petinaki and Spilioroulou, 2012). Στην Ελλάδα το πρώτο στέλεχος MRSA CC398 απομονώθηκε από αιματοκαλλιέργεια ασθενούς στην Αθήνα ενώ ένα δεύτερο στέλεχος MSSA CC398 απομονώθηκε επίσης από καλλιέργεια αίματος στην Πάτρα (Drougka et al, 2012). Στην τριετία της μελέτης μας μεταξύ των 1.247 στελεχών της συλλογής ανιχνεύθηκαν 21 στελέχη που ανήκαν στο CC398 (1,7%), εκ των οποίων τα 3 ήταν MRSA ενώ τα υπόλοιπα 18 στελέχη ήταν MSSA. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι όλα τα CC398 απομονώθηκαν από λοιμώξεις ανθρώπων οι οποίοι δεν είχαν καμία επαφή με ζώα, ενώ, παράλληλα και ο έλεγχος των δειγμάτων στα ζώα δεν ανέδειξε στελέχη *S. aureus* CC398. Πρόσφατη ελληνική μελέτη έδειξε την παρουσία CC398 σε ζώα έστω και σε μικρό ποσοστό σε σχέση με το υψηλό ποσοστό που περιγράφεται σε ευρωπαϊκές χώρες. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν τέσσερα στελέχη CC398 MRSA (7.5%) τα οποία απομονώθηκαν από ζώα συντροφιάς στην περιοχή της Βόρειας Ελλάδας και τα οποία δεν είχαν καμία επαφή με ζώα φάρμας (Drougka et al, 2016). Στα στελέχη αυτά η αντοχή στην μεθικιλίνη συσχετιζόταν με την παρουσία του γονιδίου *mecC*, το οποίο αναφέρεται συχνά να βρίσκεται σε CC398 στελέχη (Becker et al, 2014). Στη δική μας μελέτη η απουσία του CC398 μπορεί να αποδοθεί αφενός στο μικρό αριθμό των *S. aureus* που απομονώθηκαν από ζώα (13 στελέχη) και αφετέρου στο ότι το 60% των ζώων που μελετήθηκαν ήταν αιγοπρόβατα και όχι χοίροι οι οποίοι κατ' εξοχήν αποικίζονται από τον συγκεκριμένο κλώνο. (Petinaki and Spilioroulou, 2012). Συνεπώς, δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα σχετικά με την πιθανή μετάδοση του *S. aureus* CC398 από τα ζώα της περιοχής στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Με σκοπό να καθορίσουμε ακριβώς την προέλευση των CC398 στελεχών της μελέτης συνεχίσαμε τον χαρακτηρισμό τους με συνδυασμό διαφόρων γονιδιακών δεικτών, βάσει των οποίων έντεκα στελέχη ταξινομήθηκαν στον ανθρώπινο κλάδο, ενώ τα υπόλοιπα δέκα στο ζωικό. Η κατάταξη αυτή έγινε μετά από συνδυασμό αποτελεσμάτων των δεικτών που έχουν προταθεί για τη συγκεκριμένη επιλογή στελεχών. Αναλυτικότερα, συνδυάστηκαν οι πληροφορίες από τον προσδιορισμό των σημειακών μεταλλάξεων *canSNP_748*, *canSNP_1002* και *canSNP_3737* (Stegger *et al.*, 2013), την παρουσία του προφάγου 3 (*φSa3*) (Cuny *et al.*, 2013), του γονιδίου της β-αιμολυσίνη *hly* (Gómez-Sanz *et al.*, 2010), την παρουσία των γονιδίων *scn*, *chp* και *sak* (VanWamel *et al.*, 2006) και των γονιδίων αντοχής *tetM* και *erm(T)* (Vandendriessche *et al.*, 2011, Gómez-Sanz *et al.*, 2013). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, ο MRSA CC398 αρχικά απομονώθηκε σε ζώα, σε ζωικά προϊόντα και σε ανθρώπους που ασχολούνται με την κτηνοτροφία, ενώ αργότερα, στελέχη MSSA CC398 απομονώθηκαν σε νοικοκυρές στις ΗΠΑ οι οποίες δεν είχαν προηγούμενη σχέση με ζώα (Rinsky *et al.*, 2013). Σήμερα οι ερευνητές θεωρούν ότι προϋπήρχε ο ανθρώπινος MSSA CC398 κλάδος, από τον οποίο αργότερα προέκυψε ο ζωικός κλάδος MRSA CC398 (Price *et al.*, 2012). Αξιοσημείωτο είναι ότι στα στελέχη του κλώνου αυτού παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αντοχής σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και τετρακυκλίνη (48%, 67% και 57% αντίστοιχα). Τα περισσότερα CC398 στελέχη μας, που ήταν ταυτόχρονα ανθεκτικά σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη, έφεραν το *erm(T)* γονίδιο, το οποίο αποτελεί και έναν αρχικό μοριακό «δείκτη» για τυποποίηση του στελέχους ως CC398. (Gómez-Sanz *et al.*, 2013). Γενικά τα στελέχη CC398 είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν σε μικροβιολογικά εργαστήρια ρουτίνας διότι απαιτείται μοριακή τυποποίηση, και έτσι δεν μπορούμε να έχουμε πλήρη εικόνα της διασποράς του στη χώρα μας. Φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να σχετίζεται με τον CC398 είναι η αντοχή στη λινκομυκίνη με ταυτόχρονη ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη, διότι μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί στη χώρα μας κλώνος πλην του CC398 με αυτό το συνδυασμό.

Ένα ακόμη, ιδιαίτερο εύρημα της μελέτης μας ήταν ο χαρακτηρισμός ενός νέου γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *lnu(B)* σε ένα στέλεχος CC398 από πυώδη συλλογή ασθενούς της Αγγειοχειρουργικής Κλινικής. Το στέλεχος αυτό παρουσίαζε ένα σπάνιο φαινότυπο αντοχής που εκφραζόταν με ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη και αντοχή στην κλινδαμυκίνη. Ο αρχικός μοριακός έλεγχος έδειξε ότι το υπεύθυνο γονίδιο αντοχής ήταν το *lnu(B)* το οποίο δεν είχε άλλη φορά ανιχνευθεί σε στέλεχος *S. aureus*

στην Ελλάδα, αλλά είχε βρεθεί σε στελέχη CC398 στην Ευρώπη (Kadlec *et al*, 2012). Συνεχίζοντας τη διερεύνηση προχωρήσαμε σε μοριακή τυποποίηση του στελέχους και τελικά το στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως CC398 ζωικού κλάδου. Μελετώντας το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου διαπιστώθηκε ότι δεν είχε ομοιότητες με δομές που έφεραν το *Inu*(B) και οι οποίες είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί σε μικροοργανισμούς όπως *S. aureus* JQ861959, *S. aureus* JX560992, *Streptococcus agalactiae* KF772204, *Enterococcus faecalis* AF408195, αλλά ότι ήταν μια νέα γενετική δομή η οποία είχε μεταφερθεί με αλληλουχίες εισδοχής στο χρωμόσωμα του στελέχους. Η νέα δομή (GenBank accession No KP998101) φαίνεται ότι προήλθε μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό γενετικών τμημάτων του *Enterococcus faecium* CP006623 και *Streptococcus suis* CP0000407 (Sarrou *et al*, 2016). Συγκεκριμένα η νέα δομή έφερε στα άκρα της την ακολουθία εισδοχής ISSu5 που προερχόταν από τον *S. suis*, τα γονίδια *Isa*(E) και *Inu*(B) προερχόμενα από τον εντερόκοκκο, ένα κοινό τμήμα του εντεροκόκκου και του στρεπτοκόκκου που περιελάμβανε τα γονίδια *res*, ORFi, ORFii, ORFiii, *aadE*, και τέλος το γονίδιο *apt* του στρεπτοκόκκου. Τα δεδομένα χαρακτηριστικά της δομής που περιγράφηκε, δεν επιτρέπουν τον ακριβή καθορισμό των βημάτων που έγιναν ώστε να προκύψει η σύνθεση της νέας αυτής δομής. Με οδηγό την αλληλουχία όμως, μπορεί υποθεθεί ότι το συμβάν ανασυνδυασμού έγινε στην περιοχή των *resolvase-toxin/antitoxin-nucleotidyltransferase-methyltransferase-aadE*. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στην ύπαρξη του συνδυασμού αυτών των γονιδίων στους *E. faecium* και *S. suis*, οπότε και θεωρείται δυνατό να αποτέλεσε το σημείο αυτό τη θέση ομόλογου ανασυνδυασμού. Πιθανότατα, το δεξιό άκρο του *E. faecium* αντικαταστάθηκε από το αντίστοιχο τμήμα του *S. suis* με αποτέλεσμα τη δημιουργία της δομής, η οποία στη συνέχεια μετακινήθηκε και ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα του *S. aureus*.

Τα παραπάνω γενετικά συμβάντα, δηλαδή ο ομόλογος ανασυνδυασμός των γονιδίων και η μετακίνηση της δομής στο χρωμόσωμα του *S. aureus* θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι συνέβησαν στο γαστρεντερικό σύστημα κάποιου ζώου (Michael *et al*, 2015). Τόσο ο εντερόκοκκος όσο και ο στρεπτόκοκκος αποτελούν μικρόβια της εντερικής χλωρίδας των ζώων, γεγονός που θα υποστήριζε την υπόθεση ότι ο ανασυνδυασμός έγινε στον εντερικό σωλήνα κάποιου ζώου και στη συνέχεια η νέα δομή μετακινήθηκε σε στέλεχος *S. aureus*. Δεδομένου της ζωικής προέλευσης του *S. aureus* με τη νέα αυτή δομή η παραπάνω υπόθεση θα μπορούσε να θεωρηθεί βάσιμη. Πέρα από το χαρακτηρισμό μιας νέας γενετικής δομής, το συγκεκριμένο εύρημα παρουσιάζει

ενδιαφέρον διότι δείχνει τη δυναμική των μικροοργανισμών να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό, να αποκτούν συνδυασμό γονιδίων αντοχής ακόμη και σε περιβάλλοντα εκτός νοσοκομείων και στη συνέχεια να διασπείρονται στην ανθρώπινη κοινότητα ως αίτια λοιμώξεων. Ο *S. aureus* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος παρουσιάζει εξαιρετική προσαρμοστική ικανότητα στα πλαίσια της επιβίωσης του και της διασποράς του, γεγονός που εξηγεί την αναγκαιότητα συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης.

Συμπεράσματα

- Το ποσοστό φορέας *S. aureus* σε ζώα στην περιοχή της Θεσσαλίας ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα (2,5%).
- Το ποσοστό των MRSA από ανθρώπινες λοιμώξεις στην περιοχή μας την περίοδο της μελέτης ανέρχεται στο 38.5%.
- Το ποσοστό των στελεχών *S. aureus* CC398 που ανευρέθησαν στην περιοχή της Θεσσαλίας από ανθρώπινα και ζωικά δείγματα για την τριετία 2012-2014 ήταν 1,7%.
- Η αντοχή των στελεχών *S. aureus* της μελέτης μας σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και τετρακυκλίνη ήταν 37.5%, 32% και 26%, αντίστοιχα. Ενώ, για τα στελέχη του CC398 παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό αντοχής (48%, 67% και 57% αντίστοιχα).
- Τα στελέχη του CC398 που απομονώθηκαν στην Θεσσαλία ανήκουν και στο ζωικό και στον ανθρώπινο κλάδο με ποσοστά ανίχνευσης 48% και 52%, αντίστοιχα.
- Ο χαρακτηρισμός του γενετικού τύπου του γονιδίου *Inu*(B) δείχνει προέλευση από ομόλογο ανασυνδυασμό γενετικών τμημάτων στελεχών *E. faecium* και *S. suis*, υποδεικνύοντας τη συνεχή εξέλιξη του *S. aureus*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Staphylococcus aureus* είναι Gram θετικός κόκκος, καταλάση και πηκτάση θετικός. Αποτελεί το κύριο, μεταξύ των σταφυλοκόκκων, παθογόνο για τον άνθρωπο. Βρίσκεται στο περιβάλλον, δύναται να αποικίζει τον άνθρωπο και υπό τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να προκαλέσει πληθώρα λοιμώξεων. Η θεραπεία των λοιμώξεων αυτών αποτελεί πρόκληση για τον θεράποντα ιατρό, ιδιαίτερα μετά την ανάδυση στελεχών *S. aureus* με αντοχή σε ποικίλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, με κυρίαρχο το μεθικιλίνη ανθεκτικό *S. aureus* (MRSA). Πρόσφατα, στελέχη *S. aureus* απομονώθηκαν σε κτηνοτροφικό πληθυσμό, θέτοντας ερωτήματα σχετικά τα χαρακτηριστικά τους, την παθογονικότητά τους, την προέλευσή τους και την σχέση τους με τον άνθρωπο. Η αναγνώριση αυτών τα κατέταξε σε ένα συγκεκριμένο κλωνικό σύμπλεγμα, CC398, το οποίο μελετάται καθώς στελέχη του απομονώνονται από ζωικά αλλά και ανθρώπινα δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκαν στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν στην περιοχή της Θεσσαλίας την τριετία 2012-2014, και τα οποία προήλθαν από δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων και από φορεία ζώων της περιοχής. Πρώτο στάδιο της έρευνας αποτέλεσε η μελέτη των ποσοστών αντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν από ανθρώπινα και ζωικά δείγματα στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα. Τα β-λακταμικά, η MLS_B ομάδα αντιβιοτικών και η τετρακυκλίνη ήταν μεταξύ των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν. Ακολούθησε η ανίχνευση των γονιδίων αντοχής για όλα τα στελέχη τα οποία φαινοτυπικά εμφάνισαν αντοχή στα ανάλογα αντιβιοτικά. Δεύτερο αντικείμενο της μελέτης ήταν η ανίχνευση, μεταξύ των στελεχών, του κλώνου CC398 ο οποίος έχει συσχετιστεί με την κτηνοτροφία. Τα χαρακτηριστικά των στελεχών αυτών διερευνήθηκαν με μοριακές μεθόδους και ομαδοποιήθηκαν βάσει γενετικών δεικτών στον ανθρώπινο ή ζωικό κλάδο. Τελευταίο κομμάτι της μελέτης αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου αντοχής *Inu*(B) που προσδίδει αντοχή στις λινκοσαμίδες σε στέλεχος *S. aureus* ST398 που απομονώθηκε από λοίμωξη ανθρώπου και ανήκε στο ζωικό κλάδο.

Το ποσοστό των μεθικιλίνη ανθεκτικών *S. aureus* της μελέτης ανήλθε στο 38,5% και αφορούσε ανθρώπινα δείγματα. Επιπλέον, ο έλεγχος ευαισθησίας στους υπόλοιπους αντιμικροβιακούς παράγοντες έδωσε ποσοστό αντοχής για τις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και την τετρακυκλίνη 37,5%, 32% και 26%, αντίστοιχα. Ο κλώνος CC398

ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1,7% στα στελέχη της μελέτης μας. Τα στελέχη αυτά ελέγχθηκαν με μοριακές τεχνικές και μέσω συγκεκριμένων δεικτών ταξινομήθηκαν και στον ανθρώπινο και στο ζωικό κλάδο. Τέλος, η μελέτη για το χαρακτηρισμό του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *Inu(B)* οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μία νέα γενετική δομή η οποία είχε μεταφερθεί με αλληλουχίες εισδοχής στο χρωμόσωμα του στελέχους μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό των γονιδίων σε στελέχη *E. faecium* και *S. suis*.

Ο *S. aureus* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος παρουσιάζει εξαιρετική προσαρμοστική ικανότητα στα πλαίσια της επιβίωσης του και της διασποράς του, γεγονός που εξηγεί την αναγκαιότητα συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus belongs to Gram positive cocci, catalase and coagulase positive. Among staphylococci, it is the main human pathogen. It can be situated in the environment, colonize humans and under suitable conditions can cause a variety of infections. The treatment of staphylococcal infections is a challenge for the physician after the emergence of strains resistant to various antimicrobial agents. Recently, *S. aureus* strains isolated from livestock, raising questions about their characteristics, pathogenicity, origin and the relationship with human population. *S. aureus* isolates of animal origin may be classified into the clonal complex CC398, which includes strains isolated from animal and human samples.

The present study aims to investigate *S. aureus* strains associated with livestock and isolated from humans and animals. The study group consisted by *S. aureus* strains isolated from the region of Thessaly during 2012-2014. Strains derived from samples of patients, healthy individuals and animals. First stage of the research was to determine the percentages of resistance in different antimicrobial drugs of the strains isolated from human and animal samples. Beta-lactam, MLS_B group of antibiotics and tetracycline were among the factors that were tested. Subsequently, resistance genes for all the strains which exhibited phenotypic resistance in the aforementioned antimicrobial agents were investigated. The second part of the study included the identification of ST398 among staphylococci associated with farming. The characteristics of these strains were investigated by molecular methods and grouped according to their origin in the human or animal clades. Last part of the study was to describe the genetic environment of *lnu*(B) resistance gene. This gene confers resistance to lincosamides in one *S. aureus* strain isolated from human infection, but according to its characteristics is related to the livestock (ST398).

From the 1247 strains of the study the proportion of methicillin-resistant *S. aureus* was 38.5%. Susceptibility testing of the remaining antimicrobial resistance revealed resistance rates for macrolides, lincosamides and the tetracycline 37.5%, 32% and 26%, respectively. Of all the samples of the study CC398 stains associated with farming were 21, percentage 1.7%. These strains were tested by molecular techniques and through specific indicators were classified into the human clade (eleven strains) and the animal clade (ten strains). Finally, the experiments conducted for the characterization of the

genetic environment of *lnu(B)* gene led to the conclusion that this is a new genetic structure which was transported by insertion sequences in the chromosome of the strain. This structure appears to be created after homologous recombination of genes between strains of *E. faecium* and *S. suis*.

S. aureus is a microorganism which exhibits excellent adaptability as part of its ability for survival and dissemination, which explains the need for continuous epidemiological surveillance.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A., Wegener, H.C., 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *APMIS* 106, 606–622.
- Adachi, H., Ishiguro, M., Imajoh, S., Ohta, T., Matsuzawa, H., 1992. Active-site residues of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2 from *Escherichia coli*: similarity in catalytic mechanism to class A beta-lactamases. *Biochemistry* 31, 430–437.
- Alonso, A., Sanchez, P. and Martinez, J. L. 2001 'Environmental selection of antibiotic resistance genes', *Environmental Microbiology*, 3 (1), pp. 1-9
- Alós, J.I., Aracil, B., Oteo, J., Torres, C., Gómez-Garcés, J.L., 2000. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 605–609.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.H., Thornsberry, C., 1991. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 29, 533–538.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R., Kriegeskorte, A., 2014. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 794–804. doi:10.1016/j.ijmm.2014.06.007
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R., Kriegeskorte, A., 2014. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 794–804. doi:10.1016/j.ijmm.2014.06.007
- Bens, C.C.P.M., Voss, A., Klaassen, C.H.W., 2006. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1875–1876. doi:10.1128/JCM.44.5.1875-1876.2006
- Bierowiec, K., Płoneczka-Janeczko, K., Rypuła, K., 2016. Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners? *PLoS ONE* 11, e0156052. doi:10.1371/journal.pone.0156052
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Boerlin, P. and White, D. G. 2006 'Antimicrobial resistance and its epidemiology', *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, No. Ed. 4. Blackwell Publishing, pp.27-43.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2, 75–93.
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R., 1999. A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925–929.
- Bryskier, A. and Bergogne-Berezin, E. (2005) 'Macrolides', *Antimicrobial Agents. Antibacterials and Antifungals*, Ed. 1, ASM Press, pp. 475-526
- Butaye, P., Argudín, M.A., Smith, T.C., 2016. Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution. *Curr Clin Micro Rpt* 3, 19–31. doi:10.1007/s40588-016-0031-9
- Catry, B., Van Duijkeren, E., Pomba, M.C., Greko, C., Moreno, M.A., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Ungemach, F., Törneke, K., Munoz-Madero, C., Torren-Edo, J., Scientific Advisory Group on

- Antimicrobials (SAGAM), 2010. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol. Infect.* 138, 626–644. doi:10.1017/S0950268810000014
- Chambers, H.F., 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infect. Dis.* 7, 178–182. doi:10.3201/eid0702.700178
- Chambers, H.F., DeLeo, F.R., 2009. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat Rev Microbiol* 7, 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200
- Chen, C., Tang, J., Dong, W., Wang, C., Feng, Y., Wang, J., Zheng, F., Pan, X., Liu, D., Li, M., Song, Y., Zhu, X., Sun, H., Feng, T., Guo, Z., Ju, A., Ge, J., Dong, Y., Sun, W., Jiang, Y., Wang, J., Yan, J., Yang, H., Wang, X., Gao, G.F., Yang, R., Wang, J., Yu, J., 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE* 2, e315. doi:10.1371/journal.pone.0000315
- Chini, V., Petinaki, E., Meugnier, H., Foka, A., Bes, M., Etienne, J., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I., 2008. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *Scand. J. Infect. Dis.* 40, 368–372. doi:10.1080/00365540701749230
- Chomczynski, P., 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res.* 20, 3791–3792.
- Church, G.M., Gilbert, W., 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1991–1995.
- Cloete, T. E. 2003 'Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51 (4), pp. 277-282
- Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E., 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3675–3681.
- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., Witte, W., 2010. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 109–117. doi:10.1016/j.ijmm.2009.11.002
- Cuny, C., Kummerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B., Witte, W., 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill.* 11, 44–47.
- Cuny, C., Layer, F., Köck, R., Werner, G., Witte, W., 2013. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) of clonal complex CC398, t571 from infections in humans are still rare in Germany. *PLoS ONE* 8, e83165. doi:10.1371/journal.pone.0083165
- David, M.Z., Daum, R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 616–687. doi:10.1128/CMR.00081-09
- de Lencastre, H., Oliveira, D., Tomasz, A., 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 428–435. doi:10.1016/j.mib.2007.08.003
- de Vries, L.E., Christensen, H., Skov, R.L., Aarestrup, F.M., Agersø, Y., 2009. Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 490–500. doi:10.1093/jac/dkp214
- Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E., 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747–763. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007
- Devriese, L.A., Van Damme, L.R., Fameree, L., 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 19, 598–605.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127–6145.

- Drougka, E., Foka, A., Koutinas, C.K., Jelastopulu, E., Giormezis, N., Farmaki, O., Sarrou, S., Anastassiou, E.D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2016. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Prev. Vet. Med.* 126, 190–198. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.02.004
- Drougka, E., Foka, A., Koutinas, C.K., Jelastopulu, E., Giormezis, N., Farmaki, O., Sarrou, S., Anastassiou, E.D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2016. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Prev. Vet. Med.* 126, 190–198. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.02.004
- Drougka, E., Foka, A., Liakopoulos, A., Doudoulakakis, A., Jelastopulu, E., Chini, V., Spiliopoulou, A., Levidiotou, S., Panagea, T., Vogiatzi, A., Lebessi, E., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2014. A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 0796-803. doi:10.1111/1469-0691.12624
- Drougka, E., Foka, A., Liakopoulos, A., Doudoulakakis, A., Jelastopulu, E., Chini, V., Spiliopoulou, A., Levidiotou, S., Panagea, T., Vogiatzi, A., Lebessi, E., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2014. A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 0796-803. doi:10.1111/1469-0691.12624
- Drougka, E., Foka, A., Marangos, M.N., Liakopoulos, A., Makatsoris, T., Anastassiou, E.D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2012. The first case of *Staphylococcus aureus* ST398 causing bacteremia in an immunocompromised patient in Greece. *Indian J Med Microbiol* 30, 232–236. doi:10.4103/0255-0857.96706
- Drougka, E., Foka, A., Posantzis, D., Giormezis, N., Anastassiou, E.D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2015. Human *Staphylococcus aureus* lineages among Zoological Park residents in Greece. *Open Vet J* 5, 148–153.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J., Lina, G., 2002. High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* 184, 1180–1186.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7687–7692. doi:10.1073/pnas.122108599
- Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., Moore, C.E., Day, N.P.J., 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185, 3307–3316.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1984. “A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity”. *Addendum. Anal. Biochem.* 137, 266–267.
- Fessler, A.T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S., 2011. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7151–7157. doi:10.1128/AEM.00561-11
- Funke, G., Funke-Kissling, P., 2005. Performance of the new VITEK 2 GP card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 43, 84–88. doi:10.1128/JCM.43.1.84-88.2005
- García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11, 595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8

- Gharsa, H., Ben Slama, K., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Klibi, N., Ben Sallem, R., Gómez, P., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C., 2012. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet. Microbiol.* 156, 367–373. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.009
- Gillespie, M.T., Lyon, B.R., Skurray, R.A., 1988. Structural and evolutionary relationships of beta-lactamase transposons from *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2857–2866. doi:10.1099/00221287-134-11-2857
- Goerke, C., Pantucek, R., Holtfreter, S., Schulte, B., Zink, M., Grumann, D., Bröker, B.M., Doskar, J., Wolz, C., 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* 191, 3462–3468. doi:10.1128/JB.01804-08
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Fernández-Pérez, R., Aspiroz, C., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., 2010. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 1269–1277. doi:10.1089/fpd.2010.0610
- Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D., Wagenaar, J.A., 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 630–634. doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.004
- Graveland, H., Wagenaar, J.A., Heesterbeek, H., Mevius, D., van Duijkeren, E., Heederik, D., 2010. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS ONE* 5, e10990. doi:10.1371/journal.pone.0010990
- Gravey, F., Galopin, S., Grall, N., Auzou, M., Andremont, A., Leclercq, R., Cattoir, V., 2013. Lincosamide resistance mediated by *lnu(C)* (L phenotype) in a *Streptococcus anginosus* clinical isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2464–2467. doi:10.1093/jac/dkt255
- Grundmann, H., Aanensen, D.M., van den Wijngaard, C.C., Spratt, B.G., Harmsen, D., Friedrich, A.W., European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group, 2010. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 7, e1000215. doi:10.1371/journal.pmed.1000215
- Grundmann, H., Schouls, L.M., Aanensen, D.M., Pluister, G.N., Tami, A., Chlebowicz, M., Glasner, C., Sabat, A.J., Weist, K., Heuer, O., Friedrich, A.W., ESCMID Study Group on Molecular Epidemiological Markers, European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group, 2014. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *Euro Surveill.* 19.
- Grundmann, H., Tami, A., Hori, S., Halwani, M., Slack, R., 2002. Nottingham *Staphylococcus aureus* population study: prevalence of MRSA among elderly people in the community. *BMJ* 324, 1365–1366.
- Guay, G.G., Rothstein, D.M., 1993. Expression of the *tetK* gene from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*: comparison of substrate specificities of TetA(B), TetA(C), and TetK efflux proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 191–198.
- Haenni, M., Saras, E., Châtre, P., Médaille, C., Bes, M., Madec, J.-Y., Laurent, F., 2012. A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 326–329. doi:10.1093/jac/dkr499
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5442–5448.
- Hashisaki, P.A., Jacobson, J.A., 1982. Characteristics, control, and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Pharm* 1, 343–348.
- Ish-Horowicz, D., Burke, J.F., 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9, 2989–2998.

- Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T.G., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., Buist, G., International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4997–4999. doi:10.1128/AAC.01199-12
- Jamrozny, D.M., Fielder, M.D., Butaye, P., Coldham, N.G., 2012. Comparative genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. *PLoS ONE* 7, e40458. doi:10.1371/journal.pone.0040458
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70, 631–641.
- Jevons, M.P., Coe, A.W., Parker, M.T., 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* 1, 904–907.
- Kadlec, K., Fessler, A.T., Hauschild, T., Schwarz, S., 2012. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 745–755. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03842.x
- Katopodis, G.D., Grivea, I.N., Tsantsaridou, A.J., Pournaras, S., Petinaki, E., Syrogiannopoulos, G.A., 2010. Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece. *BMC Infect. Dis.* 10, 351. doi:10.1186/1471-2334-10-351
- Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
- Köck, R., Ballhausen, B., Bischoff, M., Cuny, C., Eckmanns, T., Fetsch, A., Harmsen, D., Goerge, T., Oberheitmann, B., Schwarz, S., Selhorst, T., Tenhagen, B.-A., Walther, B., Witte, W., Ziebuhr, W., Becker, K., 2014. The impact of zoonotic MRSA colonization and infection in Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 127, 384–398.
- Lazarevic, V., Gaïa, N., Girard, M., François, P., Schrenzel, J., 2013. Comparison of DNA extraction methods in analysis of salivary bacterial communities. *PLoS ONE* 8, e67699. doi:10.1371/journal.pone.0067699
- Leclercq, R., 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* 34, 482–492. doi:10.1086/324626
- Lekkerkerk, W.S.N., Wamel, W.J.B. van, Snijders, S.V., Willems, R.J., Duijkeren, E. van, Broens, E.M., Wagenaar, J.A., Lindsay, J.A., Vos, M.C., 2015. What Is the Origin of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 Isolates from Humans without Livestock Contact? An Epidemiological and Genetic Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1836–1841. doi:10.1128/JCM.02702-14
- Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (ed).: "Manual of Clinical Microbiology, 4th ed". American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.
- Leonard, F.C., Markey, B.K., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet. J.* 175, 27–36. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.008
- Lewis, H.C., Mølbak, K., Reese, C., Aarestrup, F.M., Selchau, M., Sørup, M., Skov, R.L., 2008. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infect. Dis.* 14, 1383–1389. doi:10.3201/eid1409.071576
- Li, B., Wendlandt, S., Yao, J., Liu, Y., Zhang, Q., Shi, Z., Wei, J., Shao, D., Schwarz, S., Wang, S., Ma, Z., 2013. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1251–1255. doi:10.1093/jac/dkt015
- Li, B., Wendlandt, S., Yao, J., Liu, Y., Zhang, Q., Shi, Z., Wei, J., Shao, D., Schwarz, S., Wang, S., Ma, Z., 2013. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance

- gene *lsa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1251–1255. doi:10.1093/jac/dkt015
- Li, X.-S., Dong, W.-C., Wang, X.-M., Hu, G.-Z., Wang, Y.-B., Cai, B.-Y., Wu, C.-M., Wang, Y., Du, X.-D., 2014. Presence and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in enterococci of human and swine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1424–1426. doi:10.1093/jac/dkt502
- Lichtenstein, A.V., Moiseev, V.L., Zaboikin, M.M., 1990. A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. *Anal. Biochem.* 191, 187–191.
- Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., 2003. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of *Staphylococcal agr* alleles. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 18–23.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066.
- Lindsay, J.A., 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 98–103. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.013
- Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B., Lloyd, D.H., 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 692–697. doi:10.1093/jac/dki312
- López, M., Tenorio, C., Torres, C., 2013. Study of vancomycin resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. *Zoonoses Public Health* 60, 160–167. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01502.x
- Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532. doi:10.1056/NEJM199808203390806
- Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111, 1265–1273. doi:10.1172/JCI18535
- Lozano, C., Aspiroz, C., Sáenz, Y., Ruiz-García, M., Royo-García, G., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2012. Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2804–2808. doi:10.1093/jac/dks320
- Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Torres, C., 2011. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 500–505. doi:10.1016/j.ijmm.2011.02.004
- Lyon, B.R., Skurray, R., 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* 51, 88–134.
- Macinga, D.R., Rather, P.N., 1999. The chromosomal 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*: physiological functions and genetic regulation. *Front. Biosci.* 4, D132-140.
- Macleod, A.J., Ross, H.B., Ozere, R.L., Digout, G., Van Rooyenc, null, 1964. LINCOMYCIN: A NEW ANTIBIOTIC ACTIVE AGAINST STAPHYLOCOCCI AND OTHER GRAM-POSITIVE COCCI: CLINICAL AND LABORATORY STUDIES. *Can Med Assoc J* 91, 1056–1060.
- Magerlein, B.J., 1971. Modification of lincomycin. *Adv. Appl. Microbiol.* 14, 185–229.
- Malachowa, N., DeLeo, F.R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057–3071. doi:10.1007/s00018-010-0389-4
- Martinez, J.L., Baquero, F., 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1771–1777.
- Mediavilla, J.R., Chen, L., Uhlemann, A.-C., Hanson, B.M., Rosenthal, M., Stanak, K., Koll, B., Fries, B.C., Armellino, D., Schilling, M.E., Weiss, D., Smith, T.C., Lowy, F.D., Kreiswirth, B.N., 2012. Methicillin-

- Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398, New York and New Jersey, USA. *Emerg Infect Dis* 18, 700–702. doi:10.3201/eid1804.111419
- Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M.K., Layer, F., Werner, G., Krause, G., 2016. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* doi:10.1007/82_2016_497
- Michael, G.B., Freitag, C., Wendlandt, S., Eidam, C., Feßler, A.T., Lopes, G.V., Kadlec, K., Schwarz, S., 2015. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiol* 10, 427–443. doi:10.2217/fmb.14.93
- Milheiro, C., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3374–3377. doi:10.1128/AAC.00275-07
- Montilla, A., Zavala, A., Cáceres Cáceres, R., Cittadini, R., Vay, C., Gutkind, G., Famiglietti, A., Bonofiglio, L., Mollerach, M., 2014. Genetic environment of the *lnu(B)* gene in a *Streptococcus agalactiae* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5636–5637. doi:10.1128/AAC.02630-14
- Morgan, M., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1181–1187. doi:10.1093/jac/dkn405
- Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P., 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol Appendix 3, Appendix 3C.* doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15
- Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S., 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2240–2244.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Ιατρική Μικροβιολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αντωνιάδης Α, Μαλισιόβας Ν, 5η Έκδοση, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, 2008:221-237*
- Musser, J.M., Kapur, V., 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2058–2063.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H., 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841–845.
- Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N., 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* 395, 559–575. doi:10.1515/hsz-2013-0292
- Nouwen, J.L., Ott, A., Kluytmans-Vandenberg, M.F.Q., Boelens, H.A.M., Hofman, A., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., 2004. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a “culture rule.” *Clin. Infect. Dis.* 39, 806–811. doi:10.1086/423376
- Olsvik, B., Olsen, I., Tenover, F.C., 1995. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 87–92.
- Olszewska, E., Jones, K., 1988. Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trends Genet.* 4, 92–94.
- Otter, J.A., French, G.L., 2010. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 10, 227–239. doi:10.1016/S1473-3099(10)70053-0
- Pantosti, A., 2012. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front Microbiol* 3, 127. doi:10.3389/fmicb.2012.00127
- Petinaki, E., Arvaniti, A., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I., 2001. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 297–304.
- Petinaki, E., Miriagou, V., Tzouveleakis, L.S., Pournaras, S., Hatzi, F., Kontos, F., Maniati, M., Maniatis, A.N., Bacterial Resistance Study Group of Thessaly, 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospitals of central Greece. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18, 61–65.

- Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 626–634. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03881.x
- Petinaki, E., Spiliopoulou, I., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 626–634. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03881.x
- Pinho, M. (2008) 'Mechanisms of β -lactam and glycopeptides resistance in *Staphylococcus aureus*', *Staphylococcus Molecular Genetics*, Ed. 1, Caister Academic Press, pp. 207-226
- Popovich, K.J., Weinstein, R.A., Hota, B., 2008. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin. Infect. Dis.* 46, 787–794. doi:10.1086/528716
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P.S., Pearson, T., Waters, A.E., Foster, J.T., Schupp, J., Gillece, J., Driebe, E., Liu, C.M., Springer, B., Zdovc, I., Battisti, A., Franco, A., Zmudzki, J., Schwarz, S., Butaye, P., Jouy, E., Pomba, C., Porrero, M.C., Ruimy, R., Smith, T.C., Robinson, D.A., Weese, J.S., Arriola, C.S., Yu, F., Laurent, F., Keim, P., Skov, R., Aarestrup, F.M., 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 3. doi:10.1128/mBio.00305-11
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P.S., Pearson, T., Waters, A.E., Foster, J.T., Schupp, J., Gillece, J., Driebe, E., Liu, C.M., Springer, B., Zdovc, I., Battisti, A., Franco, A., Zmudzki, J., Schwarz, S., Butaye, P., Jouy, E., Pomba, C., Porrero, M.C., Ruimy, R., Smith, T.C., Robinson, D.A., Weese, J.S., Arriola, C.S., Yu, F., Laurent, F., Keim, P., Skov, R., Aarestrup, F.M., 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio* 3, e00305-11. doi:10.1128/mBio.00305-11
- Pyörälä, S., Baptiste, K.E., Catry, B., van Duijkeren, E., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C.M.F., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., Törneke, K., 2014. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *Vet. J.* 200, 230–239. doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.028
- Quddoumi, S.S., Bdour, S.M., Mahasneh, A.M., 2006. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock and poultry meat. *Ann. Microbiol.* 56, 155–161. doi:10.1007/BF03174998
- Rasigade, J.-P., Laurent, F., Hubert, P., Vandenesch, F., Etienne, J., 2010. Lethal Necrotizing Pneumonia Caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* Strain. *Emerg Infect Dis* 16, 1330. doi:10.3201/eid1608.100317
- Rasschaert, G., Vanderhaeghen, W., Dewaele, I., Janež, N., Huijsdens, X., Butaye, P., Heyndrickx, M., 2009. Comparison of Fingerprinting Methods for Typing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398. *J Clin Microbiol* 47, 3313–3322. doi:10.1128/JCM.00910-09
- Reagan, D.R., Doebbeling, B.N., Pfaller, M.A., Sheetz, C.T., Houston, A.K., Hollis, R.J., Wenzel, R.P., 1991. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann. Intern. Med.* 114, 101–106.
- Rinsky, J.L., Nadimpalli, M., Wing, S., Hall, D., Baron, D., Price, L.B., Larsen, J., Stegger, M., Stewart, J., Heaney, C.D., 2013. Livestock-associated methicillin and multidrug resistant *Staphylococcus aureus* is present among industrial, not antibiotic-free livestock operation workers in North Carolina. *PLoS ONE* 8, e67641. doi:10.1371/journal.pone.0067641
- Robinson, D.A., Monk, A.B., Cooper, J.E., Feil, E.J., Enright, M.C., 2005. Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 8312–8321. doi:10.1128/JB.187.24.8312-8321.2005

- Rouch, D.A., Byrne, M.E., Kong, Y.C., Skurray, R.A., 1987. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.* 133, 3039–3052. doi:10.1099/00221287-133-11-3039
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sarrou, S., Liakopoulos, A., Tsoumani, K., Sagri, E., Mathiopoulos, K.D., Tzouveleakis, L.S., Miriagou, V., Petinaki, E., 2016. Characterization of a Novel *Isa(E)*- and *lnu(B)*-Carrying Structure Located in the Chromosome of a *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1164–1166. doi:10.1128/AAC.01178-15
- Schmitz, F.J., Krey, A., Sadurski, R., Verhoef, J., Milatovic, D., Fluit, A.C., European SENTRY Participants, 2001. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 239–240.
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201–225. doi:10.1051/vetres:2001120
- Schwarz, S., Kadlec, K., Strommenger, B., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 282–285. doi:10.1093/jac/dkm487
- Sgaramella, V., Ehrlich, S.D., 1978. Use of the T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* 86, 531–537.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Sabatelli, F.J., Mann, P., Munayyer, H., Mierzwa, R., Petrikkos, G.L., Hare, R.S., Miller, G.H., Bennett, P., Downey, P., 1992. Characterization of the chromosomal *aac(6')*-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1447–1455.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehm, M., Naidich, S., Kreiswirth, B.N., 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3556–3563.
- Silva, N.C.C., Guimarães, F.F., Manzi, M.P., Júnior, A.F., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C., 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 665–669. doi:10.1111/lam.12329
- Skov, R., SSAC MRSA Working Party, 2005. MRSA infections increasing in the Nordic countries. *Euro Surveill.* 10, E050804.2.
- Smith, J.M., Feil, E.J., Smith, N.H., 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22, 1115–1122. doi:10.1002/1521-1878(200012)22:12<1115::AID-BIES9>3.0.CO;2-R
- Smith, T.C., 2015. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus* : The United States Experience. *PLOS Pathog* 11, e1004564. doi:10.1371/journal.ppat.1004564
- Smith, T.C., Pearson, N., 2011. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 327–339. doi:10.1089/vbz.2010.0072
- Solberg, C.O., 2000. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 587–595.
- Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J., Woodford, N., 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 433–436.
- Souli, M., Karaiskos, I., Galani, L., Maraki, S., Perivolioti, E., Argyropoulou, A., Charissiadou, A., Zachariadou, L., Tsiplakou, S., Papaioannou, V., Tsorlini, H., Katsifa, H., Baka, V., Pantazi, P., Paschali, A., Kyratsa, A., Triikka-Graphakos, E., Giannopoulou, P., Vogiatzakis, E., Moraitou, H., Papadogeorgaki, H., Avgerinou, H.,

- Panagea, T., Pantazatou, A., Petinaki, E., Stamatopoulou, G., Toutouza, M., Karatzoglou, I., Kontopoulou, K., Orfanidou, M., Karantani, I., Fytas, P., Tzanetou, K., Platsouka, E., Kazila, P., Chli, A., Statiri, N., Giamarellou, H., 2015. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals, 2012-2013. *Infect Dis (Lond)* 1-6. doi:10.3109/23744235.2015.1110858
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spiliopoulou, I., Petinaki, E., Papandreou, P., Dimitracopoulos, G., 2004. *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 814-817. doi:10.1093/jac/dkh197
- Spring, M., 1975. A brief survey of the history of the antimicrobial agents. *Bull N Y Acad Med* 51, 1013-1015.
- Stefani, S., Varaldo, P.E., 2003. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1179-1186.
- Stegger, M., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R., Larsen, A.R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 395-400. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x
- Stellwag, E.J., Dahlberg, A.E., 1980. Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzyloxymethyl (DBM) - paper. *Nucleic Acids Res.* 8, 299-317.
- Strommenger, B., Kehrenberg, C., Kettlitz, C., Cuny, C., Verspohl, J., Witte, W., Schwarz, S., 2006. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 461-465. doi:10.1093/jac/dki471
- Tenhagen, B.-A., Fetsch, A., Stührenberg, B., Schleuter, G., Guerra, B., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Kowall, J., Kämpe, U., Schroeter, A., Bräunig, J., Käsbohrer, A., Appel, B., 2009. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *Vet. Rec.* 165, 589-593.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Bozdogan, B., Courvalin, P., Reverdy, M.-E., Enright, M.C., Vandenesch, F., Etienne, J., 2007. Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerging Infect. Dis.* 13, 594-600. doi:10.3201/eid1304.061316
- Trnovsky, J., 1992. Semi-dry electroblotting of DNA and RNA from agarose and polyacrylamide gels. *BioTechniques* 13, 800-804.
- Trzcinski, K., Cooper, B.S., Hryniewicz, W., Dowson, C.G., 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 763-770.
- Ubukata, K., Nonoguchi, R., Matsuhashi, M., Konno, M., 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J. Bacteriol.* 171, 2882-2885.
- Uhlemann, A.-C., Porcella, S.F., Trivedi, S., Sullivan, S.B., Hafer, C., Kennedy, A.D., Barbian, K.D., McCarthy, A.J., Street, C., Hirschberg, D.L., Lipkin, W.I., Lindsay, J.A., DeLeo, F.R., Lowy, F.D., 2012. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *MBio* 3. doi:10.1128/mBio.00027-12
- Valentin-Domelier, A.-S., Girard, M., Bertrand, X., Violette, J., François, P., Donnio, P.-Y., Talon, D., Quentin, R., Schrenzel, J., van der Mee-Marquet, N., Bloodstream Infection Study Group of the Réseau des Hygiénistes du Centre (RHC), 2011. Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for

- bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS ONE* 6, e28369. doi:10.1371/journal.pone.0028369
- van Belkum, A., Melles, D.C., Peeters, J.K., van Leeuwen, W.B., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., Spalburg, E., de Neeling, A.J., Verbrugh, H.A., Dutch Working Party on Surveillance and Research of MRSA-SOM, 2008. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerging Infect. Dis.* 14, 479–483. doi:10.3201/eid1403.070760
- VAN DEN Broek, I.V.F., VAN Cleef, B. a. G.L., Haenen, A., Broens, E.M., VAN DER Wolf, P.J., VAN DEN Broek, M.J.M., Huijsdens, X.W., Kluytmans, J. a. J.W., VAN DE Giessen, A.W., Tiemersma, E.W., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol. Infect.* 137, 700–708. doi:10.1017/S0950268808001507
- van Wamel, W.J.B., Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1310–1315. doi:10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006
- Vandendriessche, S., Kadlec, K., Schwarz, S., Denis, O., 2011. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm*(T) in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2455–2459. doi:10.1093/jac/dkr348
- Vannuffel, P., Cocito, C., 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 51 Suppl 1, 20–30.
- Vester, B., Douthwaite, S., 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1–12.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G., 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N. Engl. J. Med.* 344, 11–16. doi:10.1056/NEJM200101043440102
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. *Emerg Infect Dis* 11, 1965–1966. doi:10.3201/eid1112.050428
- Wassenberg, M.W.M., Bootsma, M.C.J., Troelstra, A., Kluytmans, J. a. J.W., Bonten, M.J.M., 2011. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 316–319. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03260.x
- Weese, J.S., 2006. Investigation of antimicrobial use and the impact of antimicrobial use guidelines in a small animal veterinary teaching hospital: 1995-2004. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 553–558. doi:10.2460/javma.228.4.553
- Weese, J.S., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J* 51, 233–244.
- Weese, J.S., Archambault, M., Willey, B.M., Hearn, P., Kreiswirth, B.N., Said-Salim, B., McGeer, A., Likhoshvay, Y., Prescott, J.F., Low, D.E., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerging Infect. Dis.* 11, 430–435. doi:10.3201/eid1103.040481
- Wendlandt, S., Li, J., Ho, J., Porta, M.A., Feßler, A.T., Wang, Y., Kadlec, K., Monecke, S., Ehricht, R., Boost, M., Schwarz, S., 2014. Enterococcal multiresistance gene cluster in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from various origins and geographical locations. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2573–2575. doi:10.1093/jac/dku137
- Werbick, C., Becker, K., Mellmann, A., Juuti, K.M., von Eiff, C., Peters, G., Kuusela, P.I., Friedrich, A.W., Sinha, B., 2007. Staphylococcal chromosomal cassette *mec* type I, *spa* type, and expression of *Pls* are determinants of reduced cellular invasiveness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Infect. Dis.* 195, 1678–1685. doi:10.1086/517517
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751–762. doi:10.1016/S1473-3099(05)70295-4

- Winn, W. C., & Koneman, E. W. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wulf, M.W.H., Verduin, C.M., van Nes, A., Huijsdens, X., Voss, A., 2012. Infection and colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 versus other MRSA in an area with a high density of pig farms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 61–65. doi:10.1007/s10096-011-1269-z
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishai, W.R., 2005a. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 5, 275–286. doi:10.1016/S1473-3099(05)70112-2
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishai, W.R., 2005b. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 5, 275–286. doi:10.1016/S1473-3099(05)70112-2
- Zhao, C., Liu, Y., Zhao, M., Liu, Y., Yu, Y., Chen, H., Sun, Q., Chen, H., Jiang, W., Liu, Y., Han, S., Xu, Y., Chen, M., Cao, B., Wang, H., 2012. Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL+ ST398. *PLoS ONE* 7, e38577. doi:10.1371/journal.pone.0038577
- Ζιάκας Γ. Εσωτερική Παθολογία, 3η Έκδοση, 1ος Τόμος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ιατρικής-Τομέας Παθολογίας, Θεσσαλονίκη, UniversityStudioPress, 2004:175-180