

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ Β-
ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΝΝΑΣ Θ.ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΕΛΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2003**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. 07.01.2003
Αριθ. Πρωτ. 2455

αρ. βιβ. 19/9003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057247

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΝΙΑΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής-Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΦΗΜΙΑ

Λέκτορας Μικροβιολογίας

ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ ΕΛΕΝΗ

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2012/1
Ημερ. Εισ.: 3-2-2003
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΚΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	6
1.1. ΓΕΝΙΚΑ	6
1.2. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΩΝ	7
1.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	9
1.4. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	13
2. β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ	13
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ	13
2.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ	14
2.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ	14
3. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ	15
3.1. ΓΕΝΙΚΑ	15
3.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>mecA</i>	17
3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ	19
3.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ	22
4.0 ΟΙ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ	23
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	24
2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	24
2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΣΚΩΝ (ΤΕΧΝΙΚΗ KIRBY-BAYER)	25
2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MIC) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΣΕ ΑΓΑΡ	25
3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	26
3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA	26
3.2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	27
3.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	28

3.4.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	30
3.5.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	30
4.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RBP2α	30
4.1.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΜΕ LATEX	30
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
1.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	32
2.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	32
3.	ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	32
4.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>mecA</i>	33
5.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>mecI-mecR1</i>	34
6.	ΣΥΣΧΕΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ <i>mecI-mecR1</i> και των MIC ₅	35
7.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RBP2α	35
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	37
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	38
	ABSTRACT	40
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εξήντα χρόνια μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης, ο σταφυλόκοκκος κατορθώνει και επιβιώνει μέσα στο περιβάλλον της αντιμικροβιακής θεραπείας, κινητοποιώντας αρχικά απλούστερους και στη συνέχεια πιο σύνθετους μηχανισμούς αντοχής. Ο πρώτος μηχανισμός που ανέπτυξε το βακτήριο για να αντισταθεί στην πενικιλίνη ήταν η παραγωγή β-λακταμάσης. Αργότερα, μετά την εισαγωγή των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών (οξακιλλίνη, μεθικιλίνη, κλπ) στην κλινική θεραπευτική, αναπτύχθηκε ο δεύτερος μηχανισμός αντοχής που αφορά την αντοχή στη μεθικιλίνη.

Ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S.aureus* (MRSA) πρωτοεμφανίστηκαν σε νοσοκομεία της Ευρώπης στις αρχές του 1960. Έκτοτε, σταδιακά άρχισαν να εμφανίζονται αναφορές περί ανθεκτικών στελεχών *S.aureus* καθώς επίσης και πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων ανθεκτικών στη μεθικιλίνη από τον υπόλοιπο κόσμο.

Το ποσοστό αντοχής MRSA ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Σήμερα, το 25% των στελεχών *S.aureus* στα νοσοκομεία της Αμερικής εμφανίζουν αντοχή στη μεθικιλίνη. Στην Ελλάδα, και συγκεκριμένα στην περιοχή της Αθήνας, το ποσοστό είναι της τάξης του 41% σύμφωνα με μελέτη του 1997, ενώ στην περιοχή της Θεσσαλίας αγγίζει το 28%.

Ο κύριος μηχανισμός που ευθύνεται για την αντοχή στη μεθικιλίνη είναι η παρουσία ενός γονιδίου, του *mecA*, το οποίο κωδικοποιεί μια νεοεμφραζόμενη πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη, την PBP2a ή PBP2', που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη λειτουργεί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων β-λακταμικού αντιβιοτικού και βοηθά στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.

Το γονίδιο *mecA* βρίσκεται σε μεταθετή περιοχή του χρωμοσώματος και πιθανώς μέσω μεταθετών στοιχείων (τρανσποζονίων) μεταφέρεται από στέλεχος σε στέλεχος. Η περιοχή φέρει πολλές ακολουθίες εισδοχής οι οποίες προσελκύουν διάφορα γονίδια αντοχής. Τα περισσότερα *mecA*-θετικά στελέχη, εκτός από την αντοχή στη μεθικιλίνη



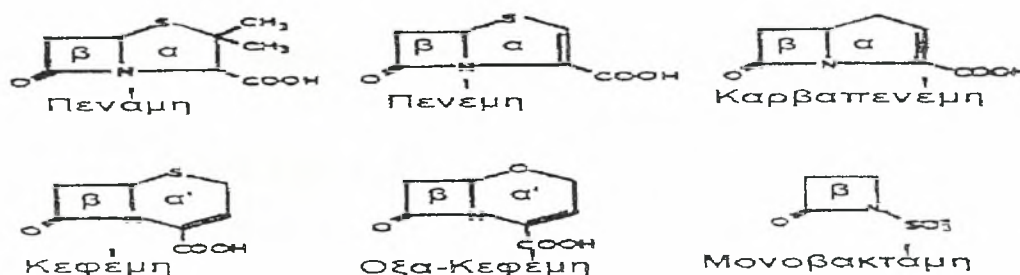
και κατά συνέπεια σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, παρουσιάζουν επίσης αντοχή και στις αμινογλυκοσίδες, τις μακρολίδες, την κλινταμυκίνη και την τετρακυκλίνη. Η διασπορά και η επικράτηση στο νοσοκομειακό περιβάλλον ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών σταφυλοκόκκων οφείλεται στην παρουσία μεταθετών στοιχείων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

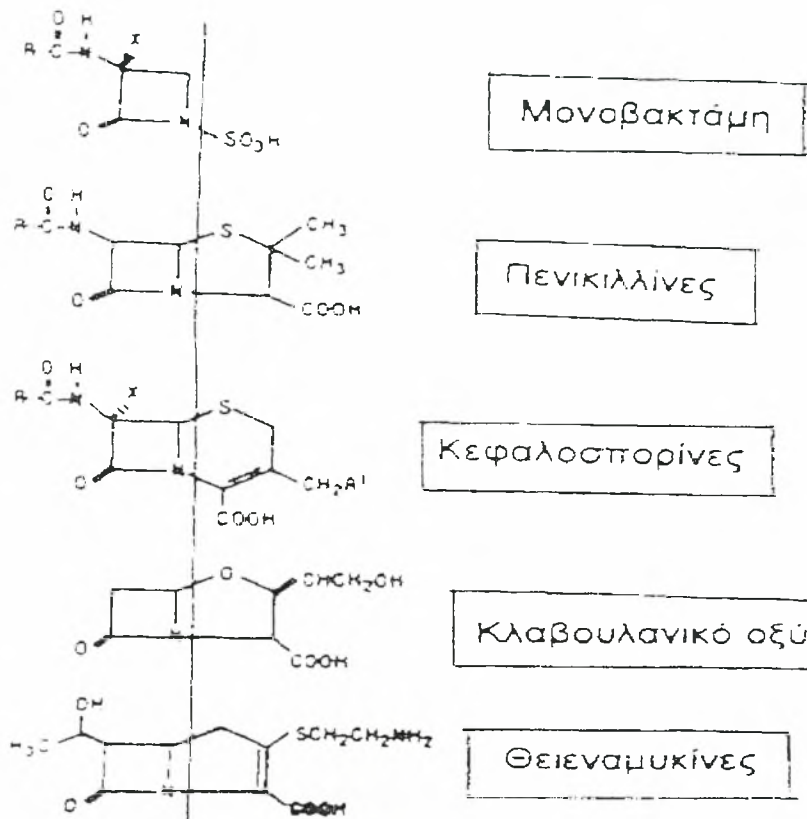
1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο μόριό τους του β-λακταμικού δακτυλίου και περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες αντιβιοτικών. Οι πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες, πενέμες, καρβαπενέμες και αναστολείς των β-λακταμασών ανήκουν στα β-λακταμικά αντιβιοτικά [46]. Ο β-λακταμικός πυρήνας αποτελείται από το β-λακταμικό δακτύλιο, που ενώνεται με δακτύλιο θειαζολιδίνης στις πενάμες (πενικιλίνες), τις πενέμες και τις καρβαπενέμες (θειεναμυκίνη), ή με δακτύλιο διυδροθειαζίνης όπως για παράδειγμα στις κεφέμες (κεφαλοσπορίνες) και οξα-κεφέμες (μοξαλακτάμη). Μόνος του ο β-λακταμικός δακτύλιος, χωρίς συνοδό δακτύλιο θειαζολιδίνης ή διυδροθειαζίνης, αλλά με υποκατάσταση των διαφόρων ομάδων του, βρίσκεται στις μονοβακτάμες ή μονολακτάμες [Σχήμα 1].



Σχήμα 1. Οι β-λακταμικοί πυρήνες: α: δακτύλιος θειαζολιδίνης, α': δακτύλιος διυδροθειαζίνης, β: β-λακταμικός δακτύλιος

Γενικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά η ύπαρξη και η ακεραιότητα του β-λακταμικού δακτυλίου σχετίζεται με τη βιολογική δράση, ενώ οι πλάγιες αλυσίδες καθορίζουν κυρίως το αντιμικροβιακό φάσμα, την αντοχή στα οξέα και στις β-λακταμάσες, καθώς επίσης και τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες [Σχήμα 2].

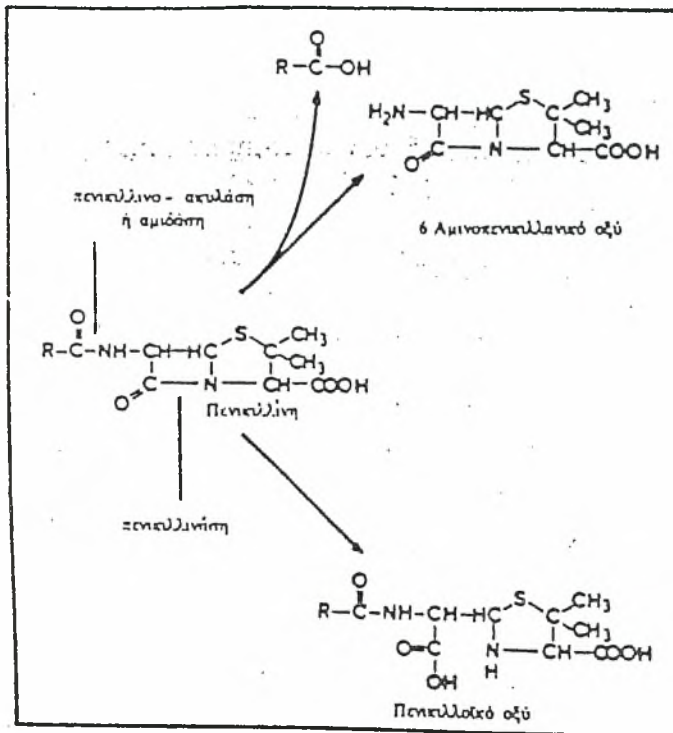


Σχήμα 2. Χημική δομή διαφόρων β-λακταμικών αντιβιοτικών

1.2. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΩΝ

Οι πενικιλίνες, λόγω της αξιοσημείωτης αντιμικροβιακής τους δράσης, της μικρής τοξικότητας και του χαμηλού κόστους, εξακολουθούν να είναι μεταξύ των σπουδαιότερων αντιβιοτικών. Η βασική δομή των πενικιλινών αποτελείται από το β-λακταμικό δακτύλιο συνδεδεμένο με δακτύλιο θειαζολιδίνης [Σχήμα 2]. Οι φυσικές πενικιλίνες παράγονται με εκχύλιση από καλλιέργειες μυκήτων του γένους *Penicillium*. Οι πενικιλίνες διασπώνται από τις β-λακταμάσες στο β-λακταμικό δακτύλιο και παράγεται το αδρανές πενικιλλοϊκό οξύ. Διάσπαση των πενικιλινών στον αμιδικό δεσμό γίνεται χημικά ή ενζυμικά με αμιδάσες που παράγονται από διάφορους

μικροοργανισμούς (μύκητες, ακτινομύκητες, βακτήρια). Η διάσπαση του δακτυλίου οδηγεί στο σχηματισμό 6-αμινοπενικιλλανικού οξέος [51], [Σχήμα 3].



Σχήμα 3. Ένζυμα που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Με προσθήκη διαφόρων ομάδων στο 6-αμινοπενικιλλανικό οξύ παράγονται οι ημισυνθετικές πενικιλίνες [Σχήμα 2]. Άλλοι τρόποι παρασκευής ημισυνθετικών παραγώγων είναι η ενσωμάτωση προδρόμων ουσιών στις καλλιέργειες μυκήτων ή η χημική μετατροπή των φυσικών πενικιλινών. Οι τρόποι όμως αυτοί χρησιμοποιούνται σπάνια. Τα ημισυνθετικά παράγωγα έχουν πολλές διαφορές από τις φυσικές πενικιλίνες. Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των διαφόρων πενικιλινών είναι συνάρτηση της διεισδυτικότητας στα βακτήρια, της συνδετικής ικανότητας με τις πενικιλινοδοδεσμευτικές πρωτεΐνες και της αντοχής στις β-λακταμάσες. Ανάλογα με το φάσμα δράσης οι πενικιλίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες:

A. Φυσικές πενικιλίνες: Περιλαμβάνουν την βενζυλοπενικιλίνη (πενικιλίνη G), τη φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη (πενικιλίνη V), τη φαινεθικιλίνη, την προπικιλίνη και τη φενμπενικιλίνη. Από αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως οι πενικιλίνες G και V.

Ευαίσθητοι στις φυσικές πενικιλίνες είναι οι Gram-θετικοί κόκκοι, όπως ο σταφυλόκοκκος, ο πνευμονιόκοκκος και ο β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος, οι αυστηρά αναερόβιοι κόκκοι, όπως οι πεπτόκοκκοι και πεπτοστρεπτόκοκκοι, αερόβια και αναερόβια Gram-θετικά βακτήρια. Ανθεκτικά στις φυσικές πενικιλίνες είναι τα εντεροβακτηριοειδή και το *Bacteroides fragilis*.

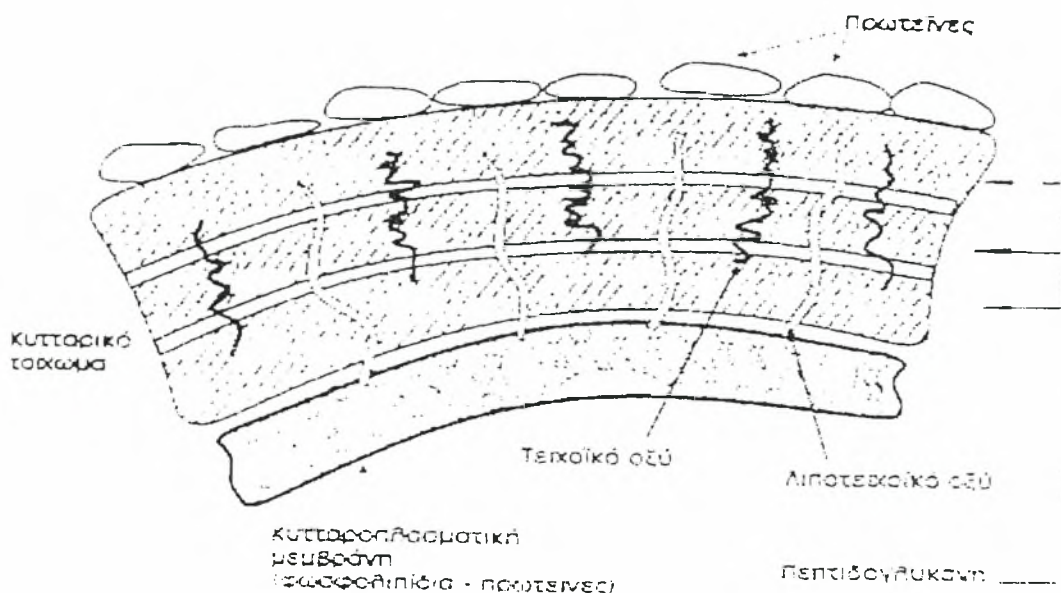
Β. Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες ή πενικιλινασοάντοχες πενικιλίνες: Περιλαμβάνουν τη μεθικιλίνη, την κλοξακιλλίνη, την οξακιλλίνη, τη δικλοξακιλλίνη, τη φλουκλοξακιλλίνη και τη ναφκιλλίνη. Οι πενικιλίνες της ομάδας αυτής είναι δραστικές στους σταφυλοκόκκους που παράγουν β-λακταμάση, ενώ δεν είναι δραστικές στα Gram-αρνητικά βακτήρια.

Γ. Πενικιλίνες δραστικές στα Gram-αρνητικά βακτηρίδια: Περιλαμβάνουν τη μεκιλλινάμη και τους εστέρες αυτής, πιβμεκιλλινάμη και μπακμεκιλλινάμη. Είναι δραστικές στα Gram-αρνητικά βακτήρια αλλά πολύ λιγότερο δραστικές σε Gram-θετικούς μικροοργανισμούς.

Δ. Ευρέως φάσματος πενικιλίνες: Περιλαμβάνουν την αμπικιλίνη, την αμοξυκιλλίνη, την ετακιλλίνη, την καρμπενικιλίνη, την τικαρκιλλίνη, τη μεζλοκιλλίνη, την αζλοκιλλίνη. Είναι δραστικές σε πολλά είδη Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων. Στους σταφυλοκόκκους είναι δραστικές στα στελέχη που δεν παράγουν β-λακταμάση.

1.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Οι πενικιλίνες, και γενικότερα όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, έχουν ως μηχανισμό δράσης την αναστολή βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης (μουκοπεπτιδίου) του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων [51]. Στα Gram-θετικά βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης, από δοκίδες τειχοϊκού και λιποτειχοϊκού οξέος, από διάσπαρτες θέσεις πρωτεϊνών στην επιφάνεια και από ομάδες πολυσακχαριδίων [Σχήμα 4].

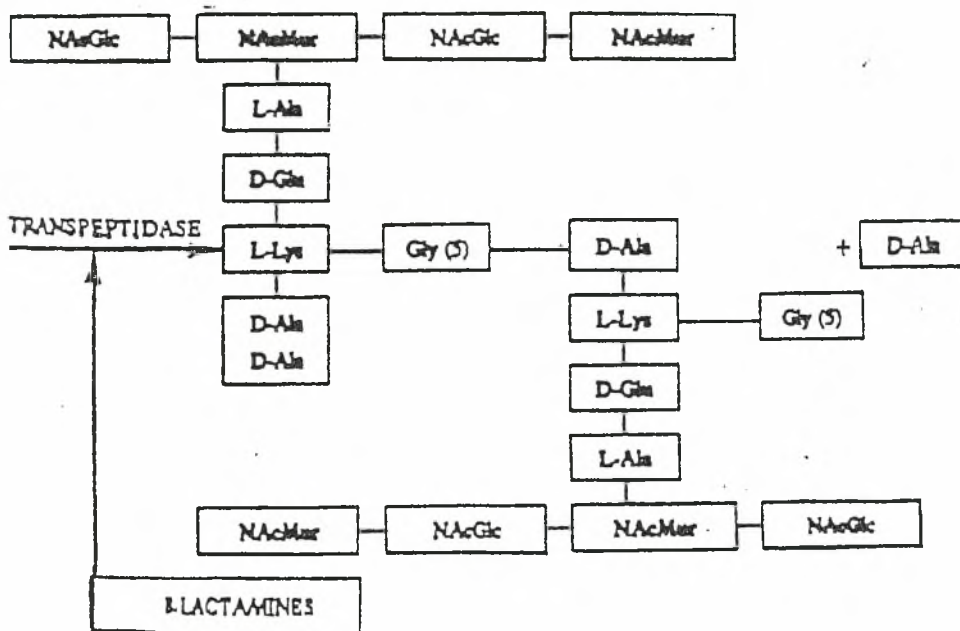


Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος Gram-θετικών βακτηρίων.

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το 90% του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος της είναι 80nm. Είναι ένα τεράστιο μόριο αποτελούμενο από αλυσίδες όπου συμπλέκονται εναλλάξ δύο αμινο-σάκχαρα, το N-ακετυλομουραμικό οξύ και η N-ακετυλογλυκοσαμίνη που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Με την καρβοξυλική ομάδα του N-ακετυλομουραμικού οξέος ενώνονται πεπτιδικές αλυσίδες που αποτελούνται από τρία, τέσσερα ή πέντε αμινοξέα, ανάλογα το βακτήριο. Οι αλυσίδες των δύο αμινοσακχάρων συνδέονται και ενδοπεπτικά με γεφυρωτούς δεσμούς που περιέχουν γλυκίνη, έτσι που τελικά σχηματίζεται ένα τεράστιο συνεχές μόριο που περιβάλλει το βακτήριο. Κατά τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου και συγκεκριμένα στη φάση της διχοτόμησης, λύεται σε κάποιο σημείο η συνέχεια της πεπτιδογλυκάνης μετά από δράση αυτολυσινών και προστίθεται η νεοσυντιθεμένη πεπτιδογλυκάνη. Από το σημείο αυτό αρχίζει και ο σχηματισμός του διαφράγματος που θα διαχωρίσει σε δύο νέα κύτταρα το αρχικό μητρικό κύτταρο [51].

Η πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus* αποτελείται από αλυσίδες δύο αμινοσακχάρων, του N-ακετυλομουραμικού οξέος και της N-ακετυλογλυκοσαμίνης. Από κάθε μόριο N-ακετυλομουραμικού οξέος ξεκινά μια πενταπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από τα αμινοξέα L-αλανίνη, D-γλουταμινικό οξύ, L-λυσίνη, D-αλανίνη και D-αλανίνη. Στην ε-

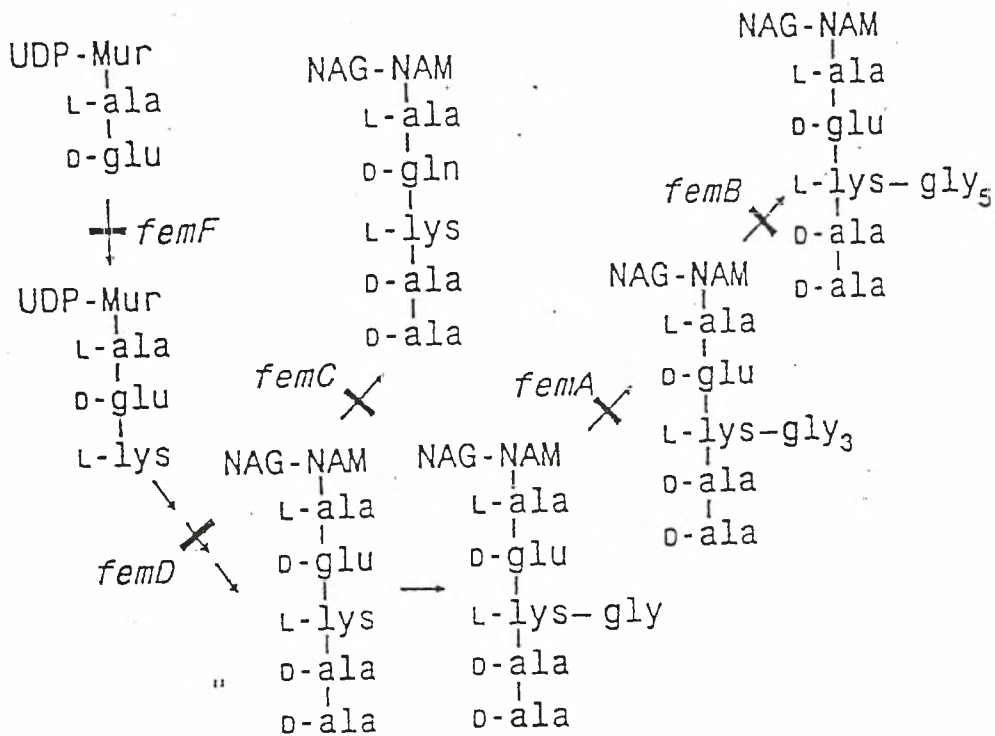
αμινομάδα της L-λυσίνης συνδέεται μια αλυσίδα από πέντε μόρια γλυκίνης [51]. Δύο υδρολυτικά ένζυμα, η καρβοξυπεπτιδάση της D-αλανίνης και η τρανσπεπτιδάση παίζουν ρόλο στη σύνδεση των αλυσίδων των αμινοσακχάρων. Η καρβοξυπεπτιδάση της D-αλανίνης υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό στο διπεπτίδιο D-αλανίνη, ενώ η τρανσπεπτιδάση ενώνει το αμινοτελικό άκρο της πέμπτης γλυκίνης της μιας αλυσίδας με το καρβοξυτελικό άκρο της τετάρτης D-αλανίνης της επομένης αλυσίδας. Έτσι, ευοδώνεται η χιαστί σύνδεση (cross-linking) της πεπτιδογλυκάνης [Σχήμα 5].



Σχήμα 5: Δομή της πεπτιδογλυκάνης του *S. aureus* (NAGlc: N-ακετυλογλυκοσαμίνη, NACMur: N-ακετυλομουραμικό TRANSPEPTIDASE: τρανσπεπτιδάση, β-LACTAMINES: β-λακταμικό αντιβιοτικό.

Σημαντικό ρόλο στη σύθεση της πεπτιδογλυκάνης παίζουν οι αυτολυσίνες, ένζυμα που λύουν την πεπτιδογλυκάνη σε κάποιο σημείο ώστε να προστεθεί η νεοσυντιθέμενη πεπτιδογλυκάνη [76]. Ιδιαίτερα για τον *S. aureus* έχει βρεθεί ότι τα γονίδια *fem* (*femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE*, *femF*) που σχετίζονται με τη σύθεση της αλυσίδας της πενταγλυκίνης, επηρεάζουν ουσιαστικά τη σύθεση της πεπτιδογλυκάνης

[20, 30, 66]. Μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια επηρεάζουν ανάλογα, σε διάφορα σημεία τη σύνθεση του μορίου [Σχήμα 6].



Σχήμα 6: Αλλαγές πεπτιδογλυκάνης σε μεταλλακτικά *fem* στελέχη *S. aureus*. (UDP-Mur: ουριδίνη-διφωσφομουραμυλ-πεπτιδίο, NAG-NAM: N-ακετυλογλυκοσαμίνη-N-ακετυλομουραμικό οξύ)

Απαραίτητη προϋπόθεση για να δράσουν οι πενικιλίνες, όπως και όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, είναι να ενωθούν με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-Binding Proteins, PBPs), που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι PBPs έχουν δράση τρανσπεπτιδάσης και καρβοξυπεπτιδάσης [82, 87]. Ο κύριος ρόλος αυτών είναι να βοηθούν στη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης, συνδέοντας στέρα τα αλυσίδες των αμινοσακχάρων. Η δράση των πενικιλινών στηρίζεται στο γεγονός ότι, από χημική άποψη, ο β-λακταμικός δακτύλιος αποτελεί ανάλογο του διπεπτιδίου της D-αλανίνης, με αποτέλεσμα να επέρχεται ισοστερική αναστολή των ενζύμων που αναφέρθηκαν. Με τη σύνδεση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλεται η χιαστί σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Το

κυτταρικό τοίχωμα είναι ασταθές και η λύση των βακτηριακών κυττάρων επέρχεται λόγω της αυξημένης ωσμωτικής πίεσης του κυτταροπλάσματος.

1.4. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Δύο είναι οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αντοχής των σταφυλοκόκκων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά [9, 12, 53, 32]. Ο πρώτος μηχανισμός (σύμφωνα με τη χρονική σειρά εμφάνισης), σχετίζεται με την παραγωγή β-λακταμάσης, η οποία υδρολύει το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού [24]. Ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την έκφραση μιας νέας πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης, της PBP2a ή PBP2', η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και αναφέρεται ως αντοχή στη μεθικιλίνη. Η συγκεκριμένη αντοχή είναι γνωστή και ως εγγενής (intrinsic) [11, 75].

2. Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ

Το 1944, στο περιοδικό *Science* περιγράφεται η παρασκευή από καλλιέργημα *S. aureus* ενός ισχυρού αναστολέα της πενικιλίνης, που είναι η πρώτη β-λακταμάση [42]. Το 1946, 60% των στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν στα νοσοκομεία της Αγγλίας ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη [3]. Το γεγονός αυτό αποτελεί και την πρώτη απόδειξη της ευφύιας του μικροοργανισμού. Ο *S. aureus* προσαρμόζεται και επιβιώνει στο εχθρικό περιβάλλον της αντιμικροβιακής θεραπείας, αρχικά παράγοντας β-λακταμάση.

Οι σταφυλοκοκκικές β-λακταμάσες είναι εξωκυττάρια ένζυμα [72]. Η ταξινόμησή τους, ανεξάρτητα από τη γονιδιακή τους προέλευση, γίνεται βάσει δύο κριτηρίων: (I) ορολογικής τυποποίησης, και (II) ενζυμικής κινητικής [41,53]. Τέσσερις είναι οι ορότυποι των β-λακταμασών του *S. aureus*: *A*, *B*, *C* και *D*. Οι β-λακταμάσες των οροτύπων *A* και *C* έχουν έντονη ενζυμική δραστηριότητα και εκκρίνονται από τυπικά

νοσοκομειακά στελέχη σταφυλοκόκκων . Οι β-λακταμάσες του οροτύπου Β είναι ένζυμα μικρής δραστηριότητας . Παρότι τα παραπάνω ένζυμα υδρολύουν την πενικιλίνη G και την αμπικιλίνη, φαίνεται ότι έχουν χαμηλή δράση στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (οξακιλλίνη και μεθικιλίνη).

2.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες των εντεροβακτηριοειδών που είναι κατά κανόνα συστασιακές [53], οι β-λακταμάσες του σταφυλοκόκκου είναι επαγωγίμες (με εξαίρεση την τύπου D) και παράγονται σε μεγάλες ποσότητες μόνο παρουσία πενικιλίνης [2]. Το υπεύθυνο γονίδιο για την παραγωγή της β-λακταμάσης είναι το γονίδιο *blaZ*. Στα Gram-θετικά βακτήρια, η ρύθμιση της έκφρασης β-λακταμάσης γίνεται μέσω του κατασταλτικού γονιδίου *blaI* [5]. Έχει αποδειχθεί ότι το γονίδιο *blaI* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία προσκολλάται στο χειριστή του γονιδίου *blaZ*, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη μεταγραφή του. Στη ρύθμιση παίρνουν μέρος και δύο άλλα γονίδια, το *blaR1* και το *blaR2* [97]. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *blaR1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα το μήνυμα ότι υπάρχει β-λακταμικό αντιβιοτικό στον εξωκυττάριο χώρο του βακτηρίου. Αποτέλεσμα είναι η απομάκρυνση της πρωτεΐνης BlaI από το χειριστή του *blaZ*, η ενεργοποίηση του γονιδίου *blaZ* και η έκφραση επαγωγίμης β-λακταμάσης. Αντίστοιχα, χωρίς να έχει διευκρινισθεί πλήρως, φαίνεται ότι το γονίδιο *blaR2* κωδικοποιεί μια άλλη πρωτεΐνη, η οποία παίζει το ρόλο μεσάζοντα ανάμεσα στην πρωτεΐνη BlaR1 και στην πρωτεΐνη BlaI.

Τα γονίδια *blaR1*, *blaI* και *blaZ* είναι συγγραμμικά και εδράζονται στην ίδια περιοχή του πλασμιδίου του σταφυλοκόκκου. Το γονίδιο *blaR2* εδράζεται πάνω στο χρωμόσωμα [53]. Ανάλογο μοντέλο επαγωγής β-λακταμάσης είχε περιγραφεί και στον *Bacillus licheniformis*, όπως και στον *Bacillus cereus* [96].

2.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ

Για πρώτη φορά το 1963, με πειράματα επαγωγής αποδείχτηκε ότι το γονίδιο της β-λακταμάσης εδράζεται σε πλασμίδιο. Σε πολλά ανθεκτικά στελέχη *S. aureus*

διαπιστώθηκε ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας πλασμιδίων. Φαίνεται μάλιστα ότι τα περισσότερα από αυτά τα πλασμίδια κωδικοποιούν επιπλέον ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής σε διάφορους παράγοντες (π.χ. ανόργανα άλατα, αντισηπτικά) οι οποίοι προσδίδουν στους φορείς-στελέχη ικανότητες ευκολότερης επιβίωσης στο περιβάλλον. Αντοχή στην ερυθρομυκίνη, στις αμινογλυκοσίδες (καναμυκίνη, γενταμυκίνη) και στο φουκιδικό οξύ κωδικοποιούνται επίσης από πλασμίδια [80].

Τέλος, σήμερα, έχει αναφερθεί και ένας μικρός αριθμός στελεχών που φέρουν το γονίδιο της β-λακταμάσης πάνω στο χρωμόσωμα [50]. Πιθανότατα, η ενσωμάτωση του γονιδίου της β-λακταμάσης στο χρωμοσωμικό DNA να σχετίζεται με την παρουσία τρανσποζονίου. Με τη θεωρία των τρανσποζονίων εξηγείται η μεγάλη διασπορά του γονιδίου της β-λακταμάσης στα στελέχη των σταφυλοκόκκων.

3. ANTOXH TΩN STAΦYΛOKOKKΩN ΣTH MEΘIKIΛΛIHNH

3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη σταφυλοκόκκων αποτελούν αντικείμενο έρευνας και ενδιαφέροντος για πολλούς ερευνητές, διότι αποτελούν συχνά αίτια σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων [14, 15, 22, 43, 44]. Στα στελέχη αυτά ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής είναι η παρουσία μεταξύ των συνήθων πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών μιας επιπλέον πρωτεΐνης, της PBP2a ή PBP2', η οποία δεν εκφράζεται στα ευαίσθητα στελέχη και χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά [11, 34, 35, 49, 67, 71, 91, 95].

Ο *S. aureus* έχει τέσσερις κύριες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες: την PBP1 (85 kDa), την PBP2 (81 kDa), την PBP3 (75 kDa), την PBP4 (45 kDa) [26, 71].

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνδέονται με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες μέσω ακυλιωτικού ομοιοπολικού δεσμού, αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων [13, 26, 70, 92]. Οι πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες είναι ένζυμα που συμμετέχουν στα τελικά στάδια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, καταλύοντας τις αντιδράσεις χιαστής σύνδεσης ανάμεσα στα πολυμερή της πεπτιδογλυκάνης. Συνδεόμενες οι πρωτεΐνες με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά

αδρανοποιούνται λειτουργικά, με αποτέλεσμα τη σύνθεση ελαττωματικού και ασταθούς κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο εύκολα λύεται εξαιτίας της αυξημένης ωσμωτικής πίεσης του κυτταροπλάσματος [82, 87].

Τα στελέχη με αντοχή στη μεθικιλίνη του *S. aureus*, εκφράζουν εκτός από τις συνήθεις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, επιπλέον μια νέα 78 kDa πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη, την PBP2a. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού, όταν οι συνήθεις PBPs έχουν αδρανοποιηθεί, η πρωτεΐνη PBP2a λειτουργεί και βοηθά στη δημιουργία σταθερού κυτταρικού τοιχώματος [13].

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η PBP2a δεν προέρχεται από μετάλλαξη κάποιας άλλης σταφυλοκοκκικής πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης. Η άποψη των Tonin και συν. ότι η PBP2a σχετίζεται με την PBP2 δεν επιβεβαιώθηκε [88]. Άλλωστε, πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι μετά από περιορισμένη πρωτεόλυση της ραδιοσημασμένης PBP2a τα παραγόμενα πεπτίδια διαφέρουν από εκείνα των PBP1, PBP2, PBP3.

Η PBP2a ανήκει στις μεγάλου μοριακού βάρους τάξης Β πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες [27]. Ορισμένες αλληλουχίες της υπάρχουν και στις άλλες μεγάλου μοριακού βάρους πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες [94], και συγκεκριμένα στα τμήματα σύνδεσης με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (penicillin-binding domain). Ωστόσο, δεν έχει ακόμη βρεθεί η βασική δομή στην οποία η πρωτεΐνη οφείλει τη χαμηλή της συγγένεια.

Η PBP2a κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το *mecA*, που έχει μέγεθος 4.2 kb, και ευρίσκεται σε μια ευρύτερη περιοχή του χρωμοσώματος μεγέθους 30-50 kb, την περιοχή *mec* [38]. Η περιοχή αυτή συχνά βρίσκεται κοντά στο σύμπλεγμα των γονιδίων *pur-nov-his* στο χρωμόσωμα του *S. aureus*. Τρανσποζόνια (Tn) και αλληλουχίες εισδοχής (Insertion Sequences, IS) υπάρχουν στην περιοχή *mec* [45]. Το Tn554, το οποίο φέρει το γονίδιο *ermA* που κωδικοποιεί την αντοχή στην ερυθρομυκίνη, εδράζεται στην περιοχή *mec*, στο 5' άκρο του γονιδίου *mecA* και βρίσκεται στο 90% των στελεχών *S. aureus*. Ακόμη, στην περιοχή βρίσκονται 1 έως 4 αντίγραφα της 431 αλληλουχίας εισδοχής (IS431). Τουλάχιστον ένα από τα αντίγραφα βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου *mecA* [1, 7, 38, 47]. Η απόσταση ανάμεσα στο γονίδιο *mecA* και στην IS431 *mec* διαφέρει



ανάμεσα στα στελέχη, εξαρτώμενη από μεταβολές (αποκοπές, ανασυνδυασμούς κλπ) που συμβαίνουν στην περιοχή.

Η αλληλουχία εισδοχής *+31* απαντάται συχνά τόσο στο χρωμόσωμα του σταφυλοκόκκου όσο και στα πλασμίδια της β-λακταμάσης [1, 28, 38, 79, 83]. Εκεί εδράζονται γόνιμοι υπεύθυνοι για αντοχές, όπως στην τετρακυκλίνη, το κάδμιο, τον υδράργυρο κλπ. [28, 57, 58, 79]. Το γονίδιο *aadD*, που κωδικοποιεί ένα ένζυμο για την αντοχή στην τομπραμυκίνη, εδράζεται στο πλασμίδιο pUB110 και εισχωρεί στην περιοχή *mec* μέσω της IS*+31* [23].

Με την παρουσία των αλληλουχιών εισδοχής διάφορα γονίδια αντοχής μπορούν και εισχωρούν εύκολα στην περιοχή *mec*. Η ικανότητα της IS*+31* να δέχεται γονίδια αντοχής που έχουν όμοιες αλληλουχίες εξηγεί την πολυανθεκτικότητα που είναι χαρακτηριστική των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων [12, 89]. Σήμερα, τα περισσότερα στελέχη με αντοχή στη μεθικιλίνη παρουσιάζουν επίσης αντοχή στην ερυθρομυκίνη, κλινταμυκίνη, χλωραμφενικόλη, τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, αμινογλυκοσίδες κλπ [12]. Η παρουσία των τρανσποζονίων στην περιοχή ευνοεί τη διασπορά της αντοχής, αφού η περιοχή μπορεί και μεταφέρεται από στέλεχος σε στέλεχος [12].

3.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *mecA*

Το γονίδιο *mecA*, το οποίο πιθανώς προέρχεται από συγχώνευση ενός γόνου β-λακταμάσης και ενός γόνου κάποιας PBP από εξωσταφυλοκοκκική πηγή, εδράζει πάνω στην περιοχή *mec* [47]. Η έκφραση του *mecA* και κατά συνέπεια η παραγωγή της PBP2a, μπορεί να είναι συστασιακή ή επαγωγίμη. Επαγωγίμη είναι κυρίως όταν υπάρχει πλασμίδιο β-λακταμάσης [33]. Η ύπαρξη πλασμιδίου β-λακταμάσης καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου *mecA*. Η παρουσία επαγωγέων (οξακιλλίνη, μεθικιλίνη, ναφκιλλίνη, β-αμινοπενικιλινοϊκό οξύ) οδηγεί σε άρση της καταστολής του *mecA*, μεταγραφή του *mecA*, και σύνθεση της PBP2a. Όταν, για οποιοδήποτε λόγο, το πλασμίδιο της β-λακταμάσης απομακρυνθεί από το στέλεχος, η PBP2a εκφράζεται συστασιακά.

Παρατηρήθηκε, ωστόσο, ότι η παραγωγή της PBP2α είναι επαγωγίμη σε πολλά στελέχη, που δεν φέρουν πλασμίδιο β-λακταμάσης. Αρχικά θεωρήθηκε ότι κάποιος καταστολέας επεμβαίνει στη μεταγραφή του γονιδίου *mecA*. Αργότερα, το γεγονός τεκμηριώθηκε με την ανακάλυψη των γονιδίων *mecRI-mecI* που βρίσκονται και αυτά πάνω στην περιοχή *mec* [37, 86]. Τα συγκεκριμένα γονίδια είναι συγγραμμικά με το γονίδιο *mecA*, βρίσκονται στο 5' άκρο του, μεταγράφονται αντίστροφα και μοιάζουν στη δομή, στη λειτουργία όπως και στο μηχανισμό της ρύθμισής τους με τα ρυθμιστικά γονίδια της β-λακταμάσης *blaRI-blaI* [24]. Το γονίδιο *mecI* (αναστολέας) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία εμποδίζει τη μεταγραφή του *mecA*, ενώ το γονίδιο *mecRI* κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη MecRI μεταφέρει μέσα στο κυτταρόπλασμα, με μηχανισμό που δεν είναι επακριβώς γνωστός, το μήνυμα ότι υπάρχει β-λακταμικό αντιβιοτικό στον εξωκυττάριο χώρο. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελείται από ένα μεμβρανικό τμήμα (membrane-spanning domain) και ένα τμήμα το οποίο συνδέεται με το β-λακταμικό αντιβιοτικό (penicillin-binding domain).

Η παρουσία των ρυθμιστικών γονιδίων *mecRI-mecI* σε μερικά είδη σταφυλοκόκκου φαίνεται να σχετίζεται με ισχυρή καταστολή του γονιδίου *mecA*, με πολύ αργή επαγωγή της μεταγραφής του *mecA* παρουσία επαγωγέα (β-λακταμικού αντιβιοτικού) και με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη μεθικιλίνη. Πολλές φορές η καταστολή που προκαλείται είναι τόσο μεγάλη, που ακόμη και με την παρουσία του επαγωγέα η ενεργοποίηση του *mecA* είναι πολύ αργή και η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) των στελεχών πλησιάζει τα επίπεδα της MIC των ευαισθητών στελεχών [48, 73].

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι τα περισσότερα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν πριν από το 1970 δεν έφεραν το κατασταλτικό γονίδιο *mecI*, όπως και μέρος από το γονίδιο *mecRI* [1, 40, 85]. Στα συγκεκριμένα στελέχη, εφόσον δεν έφεραν πλασμίδιο β-λακταμάσης, η παραγωγή της PBP2α ήταν συστασιακή. Αντίθετα, σε στελέχη που δεν έφεραν ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή, αλλά έφεραν πλασμίδιο β-λακταμάσης, η παραγωγή της PBP2α ήταν επαγωγίμη. Μετά το 1980, τα στελέχη που απομονώθηκαν, έφεραν ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή, παρότι το κατασταλτικό γονίδιο εμφάνιζε πολυμορφισμό [37]. Σε μερικά από αυτά η παραγωγή της PBP2α ήταν

πολύ ελαττωμένη και τα στελέχη ήταν φαινοτυπικά ευαίσθητα. Πρόσφατες πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η αδρανοποίηση της ρυθμιστικής περιοχής μπορεί να προκαλέσει σε κάποια στελέχη αύξηση της παραγωγής της PBP2a και να οδηγήσει σε έκφραση υψηλού επιπέδου αντοχής [48, 65, 77]. 'Αλλωστε, ο πολυμορφισμός που παρουσιάζουν κλινικά στελέχη *S. aureus* στη ρυθμιστική τους περιοχή αντικατοπτρίζει την αντίστασή τους στην πίεση της αντιμικροβιακής θεραπείας: η δημιουργία μεταλλακτικών στελεχών που δεν φέρουν ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή ή παρουσιάζουν πολυμορφισμό στην εν λόγω περιοχή, επιτρέπει την ικανοποιητική έκφραση της PBP2a και τη δυνατότητα επιβίωσης των μικροοργανισμών.

Σύμφωνα με μελέτη των Suzuki και συν. 60% των κλινικών στελεχών *S. aureus* και πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν σε διάφορες χώρες μεταξύ 1981-1991 φέρουν ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή, με ή χωρίς μεταλλάξεις στην περιοχή του κατασταλτικού γονιδίου *mecI* [85].

Το 1999, μελέτη του Weller έδειξε ότι στις Η.Π.Α. 48% των στελεχών *S. aureus* και φέρουν κατασταλτικό γονίδιο *mecI*. Σε κάποια στελέχη *S. aureus* παρατηρήθηκαν κάποιες μεταλλάξεις στην περιοχή του γονιδίου *mecI*. Ωστόσο, ταυτοποιήθηκαν στελέχη με υψηλό επίπεδο αντοχής στη μεθικιλίνη που φέρουν το κατασταλτικό γονίδιο χωρίς μετάλλαξη [93].

Η ύπαρξη του κατασταλτικού γονιδίου σε στελέχη με υψηλό επίπεδο αντοχής δείχνει ότι η μεταγραφή του γονιδίου *mecA* δεν εξαρτάται μόνο από τα ρυθμιστικά γονίδια *mecR1-mecI*. Εκτός των γονιδίων *mecR1-mecI*, και άλλα γονίδια, αταυτοποίητα ακόμη και εξαρτώμενα από το γενετικό υλικό κάθε στελέχους, σχετίζονται επίσης με τη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *mecA* [62, 65].

3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ

Τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην έκφραση της αντοχής. Υπάρχουν στελέχη που έχουν οριακή ή πολύ χαμηλή αντοχή (MIC: 2-8 μg/ml), στελέχη που έχουν μέτρια αντοχή (MIC: 8-128 μg/ml), και μεγάλος αριθμός στελεχών με υψηλή αντοχή (MIC≥256 μg/ml). Σε μελέτη του Weller καθώς και

στη δική μας μελέτη βρέθηκαν στελέχη *S. aureus*, που ενώ φέρουν χωρίς μεταλλάξεις το κατασταλτικό γονίδιο *mecI*, παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στη μεθικιλίνη (MIC>256 µg/ml) [93]. Η ύπαρξη των γονιδίων *mec* (*mecA*, *mecR1-mecI*) αδυνατεί να ερμηνεύσει την τεράστια ποικιλομορφία στην αντοχή που παρουσιάζουν τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη των σταφυλοκόκκων (MICs που κυμαίνονται από 2 µg/ml έως 1000 µg/ml).

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι για την αντοχή στη μεθικιλίνη, εκτός από τα γνωστά γονίδια *mecA*, *mecR1-mecI*, υπάρχουν και πολλά άλλα γονίδια που παίρνουν μέρος στη ρύθμιση της αντοχής, όπως είναι τα *fem* γονίδια. Τα γονίδια *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE*, *femF*, υπάρχουν σε ευαίσθητα και σε ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* και έχουν σχέση με τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος [7, 6, 62]. Το οπερόνιο *femAB* κωδικοποιεί δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες 49 kDa, οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της αλυσίδας της πενταγλυκίνης [8, 21, 36, 54, 84] [Σχήμα 6]. Στελέχη με μεταλλάξεις στα *fem* γονίδια εμφανίζουν διαφορετικής σύστασης πεπτιδογλυκάνη. Μεταλλακτικά *femA* στελέχη δεν μπορούν να ενσωματώσουν τη δεύτερη και την τρίτη γλυκίνη στην αλυσίδα. Μεταλλακτικά *femB* στελέχη έχουν στην αλυσίδα της πενταγλυκίνης τρία αντί για πέντε μόρια γλυκίνης. Μεταλλακτικά *femC*, *femD* και *femF* στελέχη έχουν μεγαλύτερη αντοχή από τα μητρικά. Χαρακτηριστικό είναι ότι ολόκληρος ο μικροβιακός πληθυσμός δεν έχει το ίδιο επίπεδο αντοχής [20, 30, 66]. Γενικά, τα μεταλλακτικά *fem* στελέχη χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη αυτόλυση, από αργό ρυθμό σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος και από διαφορετικού επιπέδου αντοχή σε σχέση με τα μητρικά.

Η ελαττωμένη αυτόλυση των μεταλλακτικών στελεχών οφείλεται στην ελαττωματική αλυσίδα της πενταγλυκίνης, που δεν αποτελεί το ιδανικό υπόστρωμα των αυτολυσινών [29, 31]. Οι αυτολυσίνες είναι ένζυμα με καθοριστικό ρόλο στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Κατά την έκθεση του μικροοργανισμού σε κάποιο β-λακταμικό αντιβιοτικό, το κύριο μέρος των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών συνδέεται με αυτό και αδρανοποιείται. Το μικρό ποσοστό αυτών που μένει ασύνδετο ανεπαρκεί να λειτουργήσει σωστά και συνθέτει ελαττωματική και ασταθή πεπτιδογλυκάνη. Οι αυτολυσίνες

διορθώνουν το ελαττωματικό τοίχωμα και βοηθούν έτσι έμμεσα την PBP2a να δράσει [76].

Το 1996 οι Berger-Bachi και συν. ταυτοποίησαν τα γονίδια *agr* και *sar* τα οποία σχετίζονται με την έκφραση εξωκυτταρίων πρωτεϊνών και παραγόντων λοιμογόνου δράσης (virulence factors). Σε *mecA*-θετικό στέλεχος, μετά από αδρανοποίηση των γονιδίων *agr* και *sar*, ελαττώθηκε η παραγωγή των PBP1 και PBP3, χωρίς να επηρεαστεί ωστόσο η παραγωγή της PBP2a. Η ποσοτική ελάττωση των παραπάνω πρωτεϊνών θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση του επιπέδου της αντοχής, παρότι στο υπό μελέτη στέλεχος το επίπεδο της αντοχής παρέμεινε το ίδιο [68].

Πιθανώς, η αντοχή στη μεθικιλίνη να επηρεάζεται, εκτός από την παρουσία της PBP2a, και από την έκφραση των συνήθων πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών. Άλλωστε, ο ρόλος αυτών στην έκφραση της οριακής ή πολύ χαμηλής αντοχής έχει ήδη αποδειχτεί. Ορισμένες από τις PBPs παίζουν κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του μικροβιακού κυττάρου, ενώ κάποιες άλλες όχι. Η PBP4, η οποία *in vivo* λειτουργεί ως τρανσπεπτιδάση, ενώ *in vitro* έχει δράση καρβοξυπεπτιδάσης, δεν παίζει ουσιαστικό ρόλο. Για την PBP1 δεν υπάρχει κοινή άποψη για τον ουσιαστικό ή όχι ρόλο της [16, 17]. Αντίθετα, οι PBP2 και PBP3 είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των σταφυλοκόκκων. Πειραματικές μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι έκθεση του μικροοργανισμού σε κεφοταξίμη, η οποία εκλεκτικά συνδέεται με την PBP2, προκαλεί λύση του κυττάρου, ενώ έκθεση του μικροοργανισμού σε κεφαλεξίνη, η οποία συνδέεται εκλεκτικά με την PBP3, προκαλεί επιμήκυνση του μικροβιακού κυττάρου και αναστολή του διπλασιασμού [26]. Στους σταφυλοκόκκους η PBP2 πιθανώς είναι η κύρια τρανσπεπτιδάση, ενώ η PBP3 παίζει ουσιαστικό ρόλο στο διπλασιασμό.

Από τα ανωτέρω ευρήματα φαίνεται ότι η έκφραση της αντοχής στη μεθικιλίνη δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την παρουσία του γονιδίου *mecA* και όλων των υπολοίπων γονιδίων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του, αλλά και από άλλα γονίδια, ταυτοποιημένα ή μη, τα οποία παίζουν ρόλο στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

3.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ

Στο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο η ανίχνευση της αντοχής στη μεθικιλίνη γίνεται σήμερα με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων και με τη μέθοδο ενσωμάτωσης 6 μg/ml οξακιλλίνης σε Mueller-Hinton άγαρ με 4% NaCl, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της NCCLS [12, 25, 63, 64].

Η μέθοδος διάχυσης των δίσκων οξακιλλίνης 1 μg είναι η λιγότερο αξιόπιστη μέθοδος. Για στελέχη *S. aureus* ζώνη αναστολής ≤ 10 mm χαρακτηρίζει το στέλεχος ως ανθεκτικό, ζώνη αναστολής 11-12 mm χαρακτηρίζει το στέλεχος ως μέτρια ευαίσθητο, ενώ ζώνη αναστολής ≥ 13 mm χαρακτηρίζει το στέλεχος ως ευαίσθητο. Στελέχη που έχουν οριακή ή πολύ χαμηλή αντοχή και φέρουν το γονίδιο *mecA* μπορεί να διαφύγουν με τη μέθοδο αυτή. Συχνά για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου προστίθεται στο θρεπτικό υλικό 4% NaCl, αυξάνεται ο χρόνος επώασης και η επώαση γίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (30-35° C). Η χρησιμοποίηση επίσης πυκνότερου αρχικού εναιωρήματος (No 2 της κλίμακας Mc Farland αντί του 0.5) δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Με τις συνθήκες αυτές ανιχνεύονται και τα οριακής αντοχής στελέχη [12].

Η μέθοδος ενσωμάτωσης 6 μg/ml οξακιλλίνης σε Mueller-Hinton άγαρ με 4% NaCl είναι περισσότερο αξιόπιστη [12]. Μετά από 24 ώρες επώαση, η ανάπτυξη έστω και μιας αποικίας αποτελεί ένδειξη αντοχής. Η ευαισθησία της μεθόδου φτάνει το 100% για την ανίχνευση ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus*. Δυστυχώς όμως, και με τη μέθοδο αυτή διαφεύγουν τα στελέχη που έχουν οριακή αντοχή [12].

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) με τη μέθοδο αραιώσης του αντιβιοτικού σε άγαρ είναι ίσως καταλληλότερη για να χαρακτηριστεί το επίπεδο της αντοχής ενός στελέχους [12, 69]. Ως μέθοδος όμως ρουτίνας στο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο είναι δύσχρηστη. Η εφαρμογή του E-test oxacillin για τον προσδιορισμό της MIC έχει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, με δυνατότητα προσδιορισμού 100% των *mecA*-θετικών στελεχών, αν στο Mueller-Hinton άγαρ έχει προστεθεί 2% NaCl [39].

Τα ημιαυτόματα ή αυτόματα συστήματα εμφανίζουν ποικιλία στην ειδικότητα και την ευαισθησία, που φθάνει το 98,5% για τον *S. aureus* [52].

Οι μοριακές τεχνικές παραμένουν οι πλέον ευαίσθητες και ειδικές μέθοδοι για την ανίχνευση της αντοχής στη μεθικιλίνη [87]. Η ανίχνευση του γονιδίου *mecA* καθώς και των ρυθμιστικών γονιδίων μπορεί να γίνει με DNA υβριδισμό ή με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης [10, 60, 78, 90]. Σήμερα, η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης έχει αντικαταστήσει την τεχνική του υβριδισμού. Με τη βοήθεια της PCR υπάρχει η δυνατότητα της γρήγορης ανίχνευσης του γονιδίου *mecA* ακόμη και σε κλινικά δείγματα [74].

4. ΟΙ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Η δραστηριότητα των διαφόρων πενικιλινών στη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων είναι συνάρτηση της αντοχής των στις β-λακταμάσες και της συνδετικής ικανότητας με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες [46]. Η πενικιλίνη G, η αμπικιλίνη και η αμοξυκιλλίνη προτείνονται για τη θεραπεία λοιμώξεων που οφείλονται σε στελέχη που δεν παράγουν β-λακταμάση. Οι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες, όπως η οξακιλλίνη, η μεθικιλίνη, η δικλοξακιλλίνη κλπ, προτείνονται για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν β-λακταμάση. Σύμφωνα με τις οδηγίες της NCCLS σε περίπτωση που το στέλεχος εμφανίζει αντοχή στη μεθικιλίνη, θεωρείται ανθεκτικό σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων όλων των πενικιλινών, των κεφαλοσπορινών, των συνδυασμών β-λακταμικών με αναστολείς και της ιμιπενέμης. Τα παραπάνω αντιβιοτικά, ανεξάρτητα από τις *in vitro* δοκιμασίες, αποκλείονται από τη θεραπευτική αντιμετώπιση, επειδή το στέλεχος εκφράζει την PBP2a, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με αυτά [63, 64]. Φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία αυτών των λοιμώξεων παραμένει η βανκομυκίνη. Άλλα αντιβιοτικά που προτείνονται είναι η τείκοπλανίνη, οι φλουοροκινολόνες, η ριφαμπικίνη και η μουπιροκίνη [59].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το υλικό και οι μέθοδοι μελέτης που επελέγησαν είναι οι ακόλουθοι:

1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 53 στελέχη *S.aureus* με αντοχή στην οξακιλλίνη που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από διάφορα κλινικά δείγματα. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών ως *S. aureus* έγινε σύμφωνα με τη μορφολογία των αποικιών, τη Gram χρώση, τη δοκιμασία της καταλάσης, της πηκτάσης και με το σύστημα API Staph (La Balme les Grottes, France) [18, 19]. Το στέλεχος *S.aureus* ATCC 25923 χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο στο αντιβιογράμμα. Ένα στέλεχος *S. aureus* mecA-θετικό (BB270) και ένα στέλεχος *S.aureus* mecA-αρνητικό (BB225) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ανίχνευση του mecA γονιδίου.

2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Αρχικά, ο έλεγχος της ευαισθησίας όλων των στελεχών έγινε με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων χρησιμοποιώντας δίσκο οξακιλλίνης 1 μg σε Mueller-Hinton άγαρ, μετά από επώαση στους 35°C για 24 ώρες.

Σε όλα τα στελέχη έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στη οξακιλλίνη (Sigma) με τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού σε Mueller-Hinton άγαρ με προσθήκη 2% NaCl για 24 h στους 35°C, χρησιμοποιώντας πυκνότητα βακτηριακού εναιωρήματος 10^5 cfu. Στη μελέτη μας ως όριο αντοχής στην οξακιλλίνη ορίσαμε την τιμή των 0.5 μg/ml για τον *S. aureus*.

ΥΛΙΚΑ: Τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ (bioMerieux)

Δίσκοι οξακιλλίνης περιεκτικότητας 1 μg (Difco)

2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΣΚΩΝ (ΤΕΧΝΙΚΗ KIRBY-BAUER)

α) Αποικίες καθαρού καλλιεργήματος του μικροοργανισμού διαλύθηκαν σε δοκιμαστικό σωληνάριο με 4 ml Trypticase Soy Broth.

β) Ο ζωμός επώασθη στους 35-37°C για 2-6 h. Η θολερότητα της καλλιέργειας στο τέλος της επώασης ήταν ίση με την θολερότητα του προτύπου θολοσιμετρικού διαλύματος McFarland No 0.5.

γ) Εμβαπτίσθηκε βαμβακοφόρος στυλεός στο σωληνάριο για την παραλαβή του καλλιεργήματος. Η περίσσεια του καλλιεργήματος αφαιρέθηκε με πίεση και σταθερά περιστροφή του στυλεού στο εσωτερικό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωληναρίου, πάνω από το εναιώρημα.

δ) Ο βαμβακοφόρος στυλεός σύρθηκε στη συνέχεια σε τρυβλίο με Mueller-Hinton άγαρ σε τρεις διευθύνσεις, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη σπορά του υλικού. Έγινε και μια τελική κίνηση του στυλεού κυκλικά στην περιφέρεια του τρυβλίου.

ε) Τοποθετήθηκαν οι δίσκοι αντιβιοτικών εντός 15' και τα τρυβλία επώασθηκαν στους 35° C [4].

στ) Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε κανονικά μετά παρέλευση 24 ωρών. Μετρήθηκε ακριβώς η διάμετρος της ζώνης αναστολής, και σύμφωνα με τα δεδομένα της NCCLS ένα στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο, ή ανθεκτικό [63, 64].

ζ) Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με το πρότυπο στέλεχος *S.aureus* ATCC 25923.

2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MIC) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΣΕ ΑΓΑΡ

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην έκθεση του μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καλείται ελάχιστη

ανασταλτική πυκνότης του φαρμάκου (ΕΑΠ), (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) [64].

α) Έγιναν υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού (οξακιλλίνης) από 10000 µg/ml έως 5 µg/ml σε απεσταγμένο νερό.

β) Δύο ml από κάθε αραιώση του αντιβιοτικού αραιώθηκαν μέσα σε τρυβλίο με 18 ml υγρού Mueller-Hinton άγαρ με 4% NaCl (αραιώση 1/10).

γ) Το μικροβιακό καλλιέργημα που ενοφθαλμίσθηκε περιείχε 10^5 κύτταρα. Η επώαση έγινε σε 35° C για 18-24 ώρες και στη συνέχεια έγινε η ανάγνωση των τρυβλίων.

δ) Σαν πρότυπο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *S.aureus* ATCC 25923.

3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Έγινε έλεγχος για την παρουσία του γονιδίου *mecA*, όπως και των ρυθμιστικών γονιδίων *mecRI-mecI*, σε όλα τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη της συλλογής (MIC 2 µg/ml) με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Προγουμένως όμως έγινε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από όλα τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη.

3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA

Βακτηριακά κύτταρα από μια 18ωρη καλλιέργεια σε 30 ml Luria Bertani Broth μετά από φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκαν σε 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης με 1 mg lysozyme (Sigma) και 0.2 mg lysostaphin (Sigma Chemical Co St. Louis, Mo). Ακολούθησε επώαση για χρονικό διάστημα 30 min στους 37 ° C και η λύση των κυττάρων ολοκληρώθηκε με την προσθήκη 0.3 ml 5% SDS σε 50% ethanol. Μετά από επώαση 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο εναιώρημα προστέθηκε ίσος όγκος phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) και μετά από φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου, το DNA κατακρημνίστηκε με την προσθήκη 2 όγκων 100% ethanol.

Το DNA ελήφθη σε γυάλινο ραβδί και διαλύθηκε σε 2 ml TE buffer (10 mM Tris-HCl pH: 8, 1 mM EDTA pH: 8) με 1 µl RNase (Boehringer, Mannheim). Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες υπό κυκλική ανάδευση, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός του DNA και φύλαξη στους +4° C [81, 55, 61]

3.2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

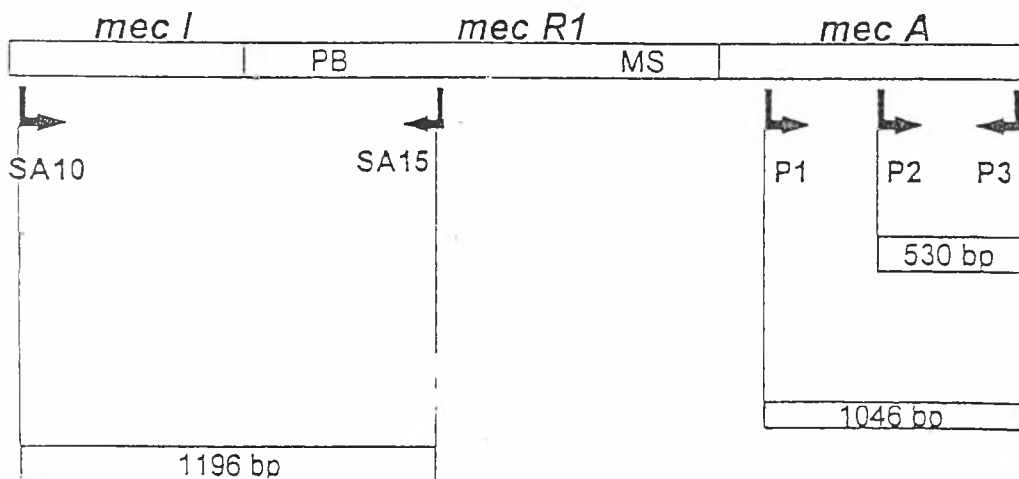
Η ανίχνευση του γονιδίου *mecA* όπως και των ρυθμιστικών γονιδίων *mecR1-mecI* έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Το χρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων απομονώθηκε και τμήμα αυτού πολλαπλασιάστηκε μετά από επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών. Οι τρεις εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του γονιδίου *mecA* ήταν οι P1, P2, P3 (P1 και P2 sense και P3 anti-sense), (Genset, Paris, France, Bioanalytica). Ο P1 εκκινητής σχεδιάστηκε από εμάς. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων τους είναι:

P1: 5'-GGTCCCATTAACTCTGAAG-3' (θέσεις 911-929)

P2: 5'-ATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' (θέσεις 1427-1445) και

P3: 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' (θέσεις 1956-1935) [Εικόνα 1], σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που περιγράφηκε από τους Matsuhashi και συν. [56, 61]. Οι εκκινητές συνδυάστηκαν ανά δύο (P1-P3, P2-P3) και έδωσαν προϊόντα PCR αντίστοιχα 1046 και 530 ζευγών βάσεων (bp). Χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου *mecA* προκειμένου να αποφύγουμε τυχόν ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις λόγω κάποιας σημειακής μετάλλαξης.

Για την ανίχνευση της ρυθμιστικής περιοχής *mecI-mecR1*, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών SA15-SA10 [Εικόνα 1].



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση των γονιδίων της περιοχής *mec*, των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και των προϊόντων της PCR.

Οι αλληλουχίες είναι οι εξής:

SA 10: 5'-(2403)GACTTGATTGTTTCCTCTGTT(2383)-3'

SA 15: 5'-(1208)CAAGCACCGTTACTATCTGC(1227)-3' (Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη). Ο εκκινητής SA10 δημοσιεύθηκε από τον Suzuki και συν. [37, 85], ενώ ο εκκινητής SA15 σχεδιάστηκε από μας για την μελέτη αυτή [81].

3.3.ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός τμήματος DNA, σε πολλά εκατομμύρια αντίγραφα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου της DNA πολυμεράσης, κατόπιν προσθήκης κατάλληλα επιλεγμένων εκκινητών και τριφωσφονουκλεοτιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στα πλαίσια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης επιλέγεται κάποια περιοχή του DNA του κυττάρου που ενδιαφέρει και η οποία θα αποτελέσει την «περιοχή-στόχο», που θα προσπαθήσουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια που είναι απαραίτητα σε κάθε αντίδραση σύνθεσης του DNA:

α)στάδιο αποδιάταξης των αλυσίδων του δίκλωνου μορίου DNA με θέρμανση στους 94-95° C

β)στάδιο σύνδεσης των ολιγονουκλεοτιδίων στις περιοχές του DNA στόχου που είναι συμπληρωματικές με αυτά, σε θερμοκρασία κατάλληλη, αναλόγως των αλληλουχιών που έχουν επιλεγεί,

γ)αντίδραση επέκτασης των ολιγονουκλεοτιδίων και αντιγραφή του τμήματος των αλυσίδων του DNA-στόχου που παρεμβάλλεται μεταξύ τους, με θέρμανση του διαλύματος στους 72° C.

Αυτά τα τρία στάδια επώασης αποτελούν τον καλούμενο θερμικό κύκλο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει 20-40 θερμικούς κύκλους. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (εκατομμύρια αντίγραφα ενός μορίου DNA συγκεκριμένου μήκους που προέρχεται από την κατ' επανάληψη αντιγραφή της περιοχής-στόχου) μπορεί να γίνει ορατό σε υπεριώδες φως μετά την ηλεκτροφόρησή του

σε πήκτωμα αγαρόζης, αφού προηγουμένως χρωματισθεί με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου [55].

ΥΛΙΚΑ

Yeast-extract (Difco Laboratories, Detroit), Tryptone (Difco), Tris (Merck), EDTA (Merck), NaCl, lysozyme, lysostaphin (Sigma), SDS, ethanol (Merck), phenol: chlorophorm: isoamylalcohol, RNase (Boehringer, Mannheim), dNTPs, Taq DNA Polymerase (Promega), ολιγονουκλεοτίδια, αγαρόζη (FMC, Bioanalytica), βρωμιούχο αιθίδιο, γλυκερόλη, μπλε της βρωμοφαινόλης

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Luria Bertani Broth (5 gr NaCl, 5 gr Yeast extract, 10 gr Tryptone σε 1 lit νερό)

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων (0.1 M Tris-HCl, pH: 7.5, 0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl)

SDS-ethanol (5% SDS σε 50% ethanol)

TE Buffer (0.01 M Tris-HCl, pH: 8, 1 mM EDTA)

κολλοειδές (gel) αγαρόζης 0.8%

10' TBE Buffer (108 gr Tris base, 55 gr boric acid, 40 ml 0.5 M EDTA pH: 8 σε 1 λίτρο dH₂O)

ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (loading buffer): 50% glycerol, 25mM EDTA, 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης

Μείγμα φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Θερμικός κυκλοποιητής Perkin-Elmer 2400

Τράπεζα Υπεριώδους Ακτινοβολίας και Σύστημα Απεικόνισης του DNA

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης από Plexiglass

3.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Το DNA (600 ng) πολλαπλασιάστηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε τελικό όγκο 25 μ l, που περιείχε 0.2 mM από το μίγμα των dNTPs, 25 pmoles από κάθε εκκινητή, 1U Taq DNA Polymerase (Promega), στις συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται από την εταιρεία. Η αποδιάταξη (denaturation) έγινε στους 94° C για 30sec, η επαναδιάταξη (annealing) για 1 min στους 50° C για τους εκκινητές P1, P2, P3 και στους 55° C για όλους τους υπόλοιπους εκκινητές. Η επιμήκυνση (primer extension) έγινε για 2 min στους 72° C. Συνολικά έγιναν 30 κύκλοι [81].

3.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η παρασκευή της αγαρόζης έγινε με διάλυση της απαιτούμενης ποσότητας σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 TBE. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν προσθέτοντας loading buffer σε αραιώση 1.5/1. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (10 μ l) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 TBE, παράλληλα με προτυπομένους δείκτες μοριακού βάρους (Φ 174 κατατεταμημένος με HaeIII).

4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PBP2A

Η έκφραση της PBP2a έγινε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος anti-PBP2a (latex MRSA test, Biomerieux) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΜΕ LATEX

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική συγκόλληση της πενικιλλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a με το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά αυτής με το οποίο είναι επικαλυμμένα τα σφαιρίδια latex.

α) Σε γυάλινο σωληνάριο προσθέτουμε 4 σταγόνες Extraction reagent 1 (διάλυμα NaOH 0.1mol/l) στο οποίο ενοφθαλμίζουμε με τη βοήθεια κρίκου απομονωμένες αποικίες *S.aureus* που αναπτύχθηκαν σε αιματούχο άγαρ ύστερα από επώαση στους 35° C για 18-24ώρες. Το διάλυμα ομογενοποιείται.

β) Το σωληνάριο τοποθετείται σε υδατόλουτρο και θερμαίνεται στους 95° C για 3 λεπτά.

γ) Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προσθέτουμε μια σταγόνα Extraction reagent 2 (διάλυμα KH₂PO₄ 0.5mol/l), το ομογενοποιούμε και το φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 10 λεπτά.

δ) Χρησιμοποιούμε ειδική κάρτα στην οποία προσθέτουμε μια σταγόνα Sensitized latex (σφαιρίδια latex καλυμμένα με μονοκλωνικό αντι-PBP2a) και 50μl από το υπερκείμενο του δείγματος. Αναδεύουμε για 3 λεπτά και παρατηρούμε για τυχόν συγκόλληση. Ταυτόχρονα χρησιμοποιούμε θετικό και αρνητικό μάρτυρα.

ΥΛΙΚΑ Slidex MRSA detection kit (biomerieux)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα στελέχη *S.aureus* που εξετάστηκαν απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα κατά τη διάρκεια ενός έτους στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών *S.aureus* (54.7%) απομονώθηκε από καλλιέργειες τραυμάτων, το 22.6% από καλλιέργειες πτυέλων, το 11.3% από καλλιέργειες ωτικών εκκριμάτων, ενώ μικρό ποσοστό (11.4%) απομονώθηκε από καλλιέργειες περιτοναϊκών -πλευριτικών - εγκεφαλονωτιαίων και αρθρικών υγρών. Από ένα σύνολο 186 στελεχών *S. aureus*, 53 (28%) ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη.

2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα στελέχη των σταφυλοκόκκων ταυτοποιήθηκαν ως *S.aureus* με τις δοκιμασίες παραγωγής καταλάσης και πηκτάσης και με το Api Staph System (Biomérieux, France).

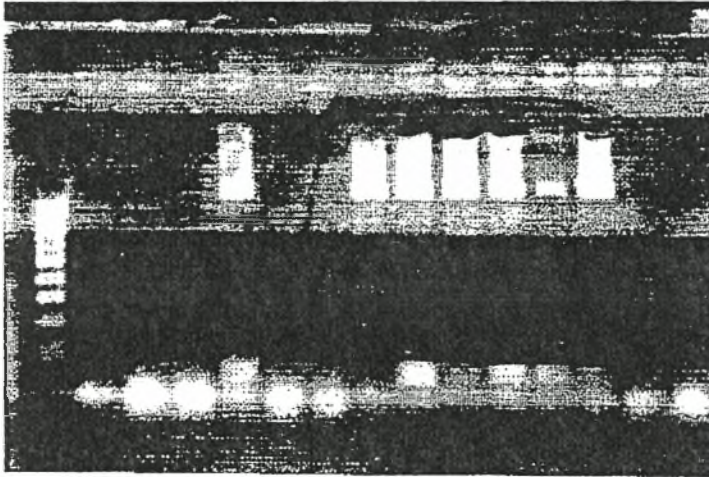
3. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Από τα 186 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν, τα 53 στελέχη (28%) εμφάνισαν αντοχή στην οξακιλλίνη με τη μέθοδο των δίσκων (Kirby-Bauer). Η αντοχή των στελεχών επιβεβαιώθηκε παράλληλα και με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στην οξακιλλίνη. Βρέθηκε ότι από τα 53 στελέχη, τα 13 (24.5%) είχαν MIC στην οξακιλλίνη που κυμαινόταν από 0.5 έως 256μg/ml, ενώ τα υπόλοιπα 40 στελέχη (75.5%) είχαν MIC>256 μg/ml.

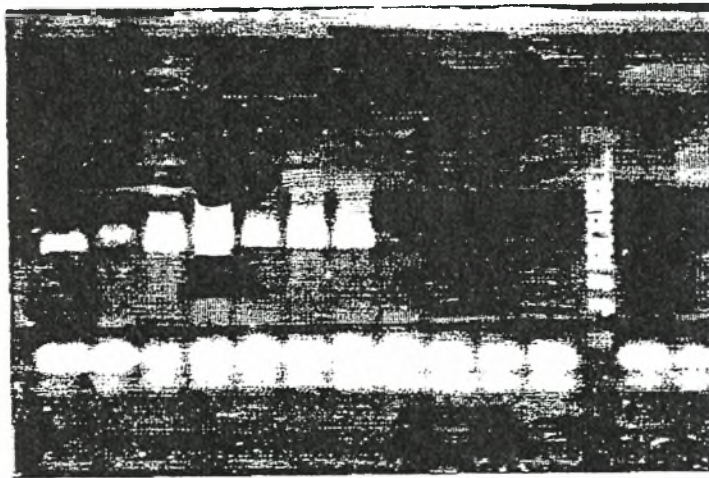
4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *mecA*

Και τα 53 ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S.aureus* έφεραν το γονίδιο *mecA* (έδωσαν προϊόν PCR τουλάχιστον με ένα από τα δύο ζεύγη των εκκινητών – Εικόνα 1).

α)



β)



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αгарόζης.α) Προϊόν 1046 bp ζεύγους P1-P3 β) Προϊόν 530 bp ζεύγους P2-P3, Φχ 174 κατατετμημένος με Hae III

Πιο αναλυτικά, από τα 53 *mecA*-θετικά στελέχη, τα 29 στελέχη (ποσοστό 54.7%) δεν παρουσιάζουν μεταβολή στην περιοχή του γονιδίου, σε θέσεις που αντιστοιχούν

στους P1, P2, P3 εκκινητές, αφού μετά από συνδυασμό των εκκινητών ανά δύο (P1-P3, P2-P3), παράγονταν προϊόντα ακριβώς ίδιου μοριακού βάρους με εκείνα του πρότυπου στελέχους BB270 και σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής *mecA*. Επτά στελέχη (ποσοστό 13.2 %) παρουσιάζουν μεταβολή στη θέση του εκκινητή P2 (1427-1445), αφού έδωσαν θετική αντίδραση με το ζεύγος των εκκινητών P1-P3 και αρνητική με το P2-P3. Δεκαεπτά στελέχη (ποσοστό 32.1%) παρουσιάζουν μεταβολή στη θέση του εκκινητή P1 (911-929), αφού έδωσαν προϊόν (530 bp) μόνο με το ζεύγος P2-P3 [Πίνακας 1].

Πίνακας 1. Αλλαγές του γονιδίου *mecA* στα στελέχη *S.aureus*. Οι αστερίσκοι στους εκκινητές P1, P2, P3 περιγράφουν τις αντίστοιχες θέσεις μεταβλητότητας.

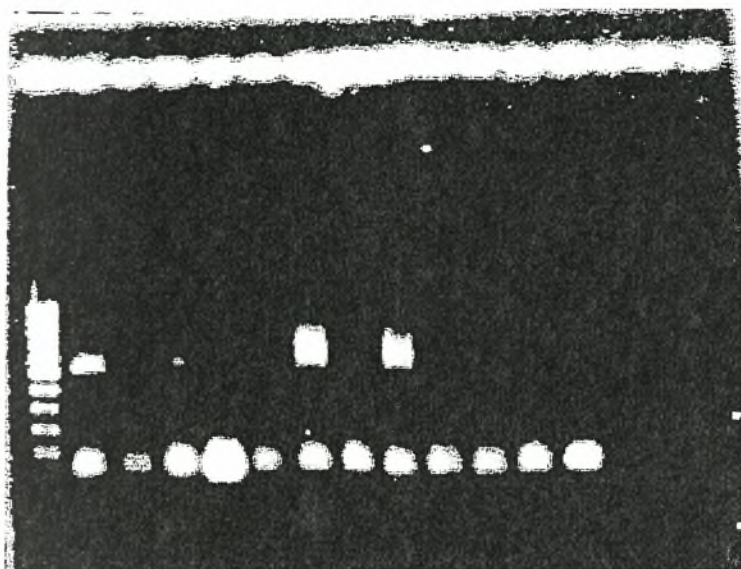
Στελέχη	<i>mecA</i> P1P2P3		<i>mecA</i> P1*P2P3		<i>mecA</i> P1P2*P3		Σύνολο	
	No	%	No	%	No	%	No	%
<i>S.aureus</i>	29	(54.7)	17	(32.1)	7	(13.2)	53	(100)

5.ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *mecRI-mecI*

Όλα τα *mecA*-θετικά στελέχη *S.aureus* εξετάστηκαν για την ύπαρξη των ρυθμιστικών γονιδίων *mecRI-mecI* και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών. Από τα 53 *mecA*-θετικά στελέχη τα 10 (ποσοστό 18.9%) έφεραν ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή αμετάβλητη (Εικόνα 2), τουλάχιστον στις θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, (προϊόντα ίδιου μοριακού βάρους με αυτά του προτύπου-στελέχους BB830)Για την καλύτερη κατανόηση εξηγείται ότι:

- α) τα 10 στελέχη που φέρουν αμετάβλητη τη ρυθμιστική περιοχή έδωσαν θετική αντίδραση με το ζεύγος των εκκινητών SA10-SA15..
- β) τα υπόλοιπα 43 στελέχη δεν έδωσαν θετική αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών SA10-SA15 είτε διότι δε φέρουν καθόλου ρυθμιστική περιοχή είτε διότι φέρουν κάποια μετάλλαξη στην περιοχή πρόσδεσης του/των συγκεκριμένων εκκινητών.





Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Προϊόν 1196 bp ζεύγους SA10-SA15.

6. ΣΥΣΧΕΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ *mecI-mecR1* ΚΑΙ ΤΩΝ MICs

Τα δέκα στελέχη *S. aureus* που φέρουν τη ρυθμιστική περιοχή *mecI-mecR1* έχουν υψηλή MIC (>256 µg/ml). Από τα υπόλοιπα 43 στελέχη *S. aureus* που δεν έδωσαν θετική την αντίδραση PCR για το ζεύγος των εκκινητών SA10-SA15, 31 έχουν υψηλή MIC (>256µg/ml) και 12 έχουν MIC από 0.5-256µg/ml [Πίνακας 3].

7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ PBP2a

Μετά από την ανίχνευση των γονιδίων *mecA*, *mecR1* και *mecI* ακολουθεί η ανίχνευση της πενικιλλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a. Όλα τα στελέχη *S. aureus* (και τα 53) έδωσαν θετική την αντίδραση συγκόλλησης με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PBP2a, συνεπώς και τα 53 στελέχη εξέφραζαν την πρωτεΐνη αυτή [Πίνακας 3].

Πίνακας 3. Περιγραφή γονιδίων, πρωτεΐνης PBP2a και MIC των *S. aureus*.

Αριθμός στελεχών <i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	<i>mecI-mecR1</i>	PBP2a	MIC: $\mu\text{g/ml}$
13	+	-	+	0.5-256
30	+	-	+	>256
10	+	+	+	>256

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα που λάβαμε μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

1. Η αντοχή στη μεθικιλίνη ενδονοσοκομειακών στελεχών *S. aureus* σχετίζεται άμεσα με την παρουσία του γονιδίου *mecA*.
2. Η μελέτη της περιοχής του γονιδίου *mecA* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης έδειξε ορισμένες μικρές αλλαγές σε έναν αριθμό στελεχών οι οποίες δε φαίνεται να σχετίζονται με το επίπεδο αντοχής στην οξακιλλίνη.
3. Επίσης, η ανίχνευση των ρυθμιστικών γονιδίων *mecRI-mecI* σε στελέχη *S.aureus* υψηλής αντοχής (MIC>256μg/ml) επιβεβαιώνει ότι η έκφραση υψηλού ή χαμηλού επιπέδου αντοχής δεν εξαρτάται άμεσα από την παρουσία της ρυθμιστικής περιοχής .
4. Όλα τα στελέχη *S.aureus* εξέφραζαν την PBP2a ανεξάρτητα από την ύπαρξη της ρυθμιστικής περιοχής.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός αντοχής ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus* που έφεραν το γονίδιο *mecA* και απομονώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ο εστιασμός σε ενδονοσοκομειακά στελέχη *S. aureus* είχε ως σκοπό την κατανόηση του μηχανισμού, του τρόπου ρύθμισης και διασποράς της αντοχής. Η κατανόηση του μηχανισμού αντοχής δυνατό να βοηθήσει στον έλεγχο της διασποράς των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ: Η μελέτη του ρόλου της πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a σε κόκκους που εκφράζουν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ: Κατά τη διάρκεια ενός έτους απομονώθηκαν 186 στελέχη *S.aureus* στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας από τα οποία 53 εμφάνισαν αντοχή στην οξακιλλίνη μετά από έλεγχο αντοχής στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων (*Kirby Bauer*). Τα 53 αυτά στελέχη αποτέλεσαν το υλικό της περαιτέρω έρευνας. Ακολούθως έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στην οξακιλλίνη με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των υπεύθυνων για την αντοχή στη μεθικιλίνη γονιδίων απομονώθηκε χρωμοσωμικό DNA από όλα τα στελέχη. Η γονιδιακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Applied Biosystems PCR System 2400) και ηλεκτροφόρηση (Pharmacia Biotech EPS 600) των προϊόντων αυτής. Για την ανίχνευση του γονιδίου *mecA* χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών, P1-P3 και P2-P3, ενώ για την ανίχνευση της ρυθμιστικής περιοχής *mecI-mecR1* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών SA10-SA15. Τέλος έγινε ανίχνευση της πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος (MRSA Slidex Biomerieux).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από τα 53 στελέχη *S.aureus* με αντοχή στην οξακιλλίνη τα 13 είχαν MIC από 0.5-256μg/ml ενώ τα υπόλοιπα 40 είχαν MIC>256μg/ml. Σε όλα τα στελέχη ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mecA* είτε άθικτο είτε με κάποια μεταβολή στις θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ρυθμιστική περιοχή ανιχνεύθηκε σε 10 μόνο στελέχη που εμφάνισαν υψηλή αντοχή. Όλα τα στελέχη έδωσαν θετική την συγκολλητινοαντίδραση με το μονοκλωνικό αντίσωμα της PBP2a οπότε όλα εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η αντοχή στην οξακιλλίνη σχετίζεται σε μεγάλο ποσοστό με την παρουσία του γονιδίου *mecA*. Η PBP2a ανιχνεύθηκε σε όλα τα στελέχη και η έκφρασή της δεν επηρεαζόταν από την ύπαρξη της ρυθμιστικής περιοχής *mecI-mecR1*.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To study the role of penicillin-binding protein PBP2a to cocci that express resistance to beta-lactamic antibiotics.

MATERIAL-METHOD: In one year study performed in the University Hospital of Larissa, a group of 186 strains *S.aureus* were isolated in the Microbiology Laboratory. Out of this group, 53 strains showed resistance to oxacillin, which was revealed after having checked their resistance to antibiotics using the diffusion of disks method, and these were furthermore studied. The determination of minimum inhibitory concentration (MIC) to oxacillin was performed to all 53 strains by the dilution of antibiotic to agar method. In order to detect the responsible for the resistance to methicillin genes, chromosomal DNA was isolated from all 53 strains. The gene analysis was performed by polymerase chain reaction (Applied Biosystems PCR System 2400) and electrophoresis (Pharmacia Biotech EPS 600) of its products. The distribution of *mecA* gene was investigated by application of 2 pairs of primers, P1-P3 and P2-P3, whereas for the detection of the regulator area, *mecI-mecR1*, was applied a pair of primers SA10-SA15. Finally, the detection of penicillin-binding protein PBP2a was performed by monoclonal antibody (MRSA Slidex Biomerieux).

RESULTS: Among 53 strains *S.aureus* resistant to oxacillin, 13 showed low level resistance (MIC 0.5-256 µg/ml) while the rest 40 high level resistance (MIC >256 µg/ml). In all 53 strains the *mecA* gene was detected either intact or with an alteration or deletion at the linkage positions of the primers that were used. The regulator area was detected only to 10 high level resistant strains. All 53 strains showed a positive agglutination reaction with the monoclonal antibody of PBP2a therefore all of them express this protein.

CONCLUSION: The resistance to oxacillin is correlated to a great percentage with the presence of *mecA* gene. PBP2a was detected to all strains and its expression was not influenced by the existence of the regulator area *mecI-mecR1*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Archer GL, and Niemeyer DM: Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends Microbiol. (1994) 2: 343-347
2. Asheshow EH: The genetics of penicillinase-production in *S. aureus* strain P580. J. Gen. Microb. (1969) 59:289-301.
3. Barber M, and Rozwadowska-Dowzenko M: Infection by penicillin resistant staphylococci. Lancet (1948) ii: 641-644
4. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, and Turck M: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. (1966) 45:493-496
5. Bennett PM, and Chopra I: Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria (mini review). Antimicrob. Agents Chemother. (1993) 37:153-158
6. Berger-Bachi B: Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn551. J. Bacteriol. (1983) 154:479-487
7. Berger-Bachi B: Resistance not mediated by beta-lactamases (methicillin resistance). In: Crossley KB and Archer GL (eds) The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, Inc, New York (1997) pp: 158-167
8. Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, and Kayser FH: *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. Mol.Gen.Genet. (1989) 219: 263-269
9. Brakstad OG, and Maeland JA: Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. APMIS (1997) 105: 264-76
10. Brayshaw DP: Evaluation of techniques for the detection of MRSA. Br. J. Biomed. Sci. (1998) 55: 17-19
11. Brown DF, and Reynolds PE: Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Lett. (1980) 122: 275-278

12. Chambers HF: Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* (1997) 10: 781-791
13. Chambers HF, and Sachdeva M: Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* (1990) 161: 1170-1176
14. Cox RA, Mallaghan C, Conquest C, and King J: Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: controlling the spread outside hospital. *J. Hosp. Infect.* (1995) 29: 107-119
15. Crossley K, Loesch D, Landesman B, Mead K, Chern M, and Strate R: An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* (1979) 139: 273-279
16. Curtis NAC, and Hayes MV: A mutant of *Staphylococcus aureus* H deficient in penicillin-binding protein 1 is viable. *FEMS Microbiol. Lett.* (1981) 10: 227-229
17. Curtis NAC, Hayes MV, Wyke AW, and Ward JB: A mutant of *staphylococcus aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* (1980) 9: 263-266
18. Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: Ιατρική Βακτηριολογία. Αθήνα 1982. Εκδόσεις Πασχαλίδης
19. Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: Εισαγωγή στη Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα. Αθήνα 1982. Εκδόσεις Πασχαλίδης.
20. De Jonge BL, Chang YS, Gage D, and Tomasz A: Peptidoglycan composition in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 11255-1125
21. De Jonge BL, Sidow T, Chang YS, Labischinski H, Berger-Bachi B, Gage DA, and Tomasz A: Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. *J. Bacteriol.* (1993) 175: 2779-2782
22. Doebbeling BN: The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and colonization. *J. Chemother.* (1995) 7 (suppl.3): 99-103

23. Dubin DT, Matthews PR, Chikramane SG, and Stewart PR: Physical mapping of the *mec* region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1991) 35:1661-1665
24. Dyke K and Gregory P: Resistance mediated by beta-lactamases. In Crossley KB and Archer GL (eds) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, Inc, New York (1997) pp: 139-157
25. French G, Ling J, Hui YW, and Oo HKT: Determination of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* by agar dilution and disc diffusion methods. *J. Antmicrob. Chemother.* (1987) 20: 599-608
26. Georgopapadakou NH, Dix BA, and Mauriz YR: Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1986) 29: 333-336
27. Ghuysen JM: Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol.* (1994) 2: 372-380
28. Gillespie MT, Lyon BR, Loo LS, Matthews PR, Stewart PR, and Skurray RA: Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracyclin, and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* (1987) 43: 165-171
29. Gustafson JE, Berger-Bachi B, Strassle A, and Wilkinson BJ: Autolysis of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1992) 36: 566-572
30. Gustafson JE, Strassle A, Hachler H, Kayser FH, and Berger-Bachi B: The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J. Bacteriol.* (1994) 176: 1460-1467
31. Gustafson JE, and Wilkinson BJ: Lower autolytic activity in a homogeneous methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain compared to a derived heterogeneous -resistant and susceptible strains. *FEMS Microbiol. Lett.* (1989) 50: 107-111

32. Hackbarth, CJ, and Chambers HF: Methicillin-resistant Staphylococci: Genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1989) 33: 991-994.
33. Hackbarth CJ and Chambers HF: *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1993) 37: 1144-1149
34. Hartman BJ, and Tomasz A: Low -affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1984) 158: 513-516
35. Hayes MV, Curtis NAC, Wyke AW, and Ward JB: Decreased affinity of a penicillin-binding protein for beta-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol. Lett.* (1981) 10: 119-122
36. Henze UU, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, and Berger-Bachi B: Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1993) 175: 1612-1620
37. Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, and Yokota T: Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEMS Lett.* (1992) 298: 133-136
38. Hiramatsu K, Konodo N, and Ito T: Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *J. Infect. Chemother.* (1996) 2:117-129
39. Hong T, Ndamukong J, Millett W, Kish A, Win KK, and Choi YJ: Direct application of E-test to Gram-positive cocci from blood cultures: quick and reliable minimum inhibitory concentration data. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (1996) 25: 21-25
40. Hurlimann-Dalel RL, Ryffel C, Kayser FH, and Berger-Bachi B: Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1992) 36: 2617-2621.

41. Kernodle DS, Stratton W, Mc Murray LW, Chipley JR, and Mc Graw PA: Differentiation of beta-lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. *J. Infect. Dis.* (1989) 159: 103-108
42. Kirby WMM: Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* (1944) 99: 452-453
43. Klimek JJ, Marsik FJ, Bartlett RC, Weir B, Shea P, and Quintiliani R: Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. *Am. J. Med.* (1976) 61: 340-345
44. Kloos W: Modern concepts of species. In: Crossley KB, Archer GL (eds). *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone Inc, New York (1997) pp. 114-117
45. Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N, and Watanabe N: Distribution of insertion sequence-like element IS 1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 2780-2
46. Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PS, and Winn WC: *Diagnostic Microbiology*, Lippincott Co, 4th Ed. (1992)
47. Kuhl SA, Pattee PA, and Baldwin JN: Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1978) 135: 460-465
48. Kuwahara-Arai K, Kondo K, Hori S, Tateda-Suzuki E, and Hiramatsu K: Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2680-2685
49. Lacey R: Mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics of *S. aureus*. *Scand. J. Infect. Dis.* (1984) 42: 64-71

50. Lacey R, and Rosdahl VT: An unusual "penicillinase plasmid" in *S.aureus*; evidence for its transfer under natural conditions. *J. Med. Microbiol.* (1974) 7: 1-9
51. Lorian V: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Second edition, (1985) pp. 722-750
52. Low DE: Susceptibility testing for methicillin resistance. In: Crossley KB, Archer GL (eds) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone Inc, New York (1997) pp 238-245
53. Lyon BR, and Skurray R: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol. Rev.* (1987) 51: 88-134
54. Maidhof H, Reinicke B, Blumel P, Berger-Bachi B, and Labischinski H: *femA* which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* (1991) 173: 3507-3513
55. Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook JE: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1982)
56. Matshuhashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubukata K, Yamashita N, and Konno M. 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to b-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1986) 167: 975-980
57. Matthews PR, Reed KC, and Stewart PR: The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* (1987) 133: 1919-1929
58. Matthews PR, and Stewart PR: Amplification of a section of chromosomal DNA in methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* following growth in high concentrations of methicillin. *J. Gen. Microbiol.* (1988) 134: 1455-1464
59. Markowitz N, Quinn EL, and Saravolatz LD: Trimethoprim-sulfamethoxazole compare with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann. Intern. Med.* (1992) 117: 390-39

60. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Menard C, Roy PH, Quellette M, and Bergeron MG: Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44: 231-238
61. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, and Watanabe S: Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* (1991) 29: 2240-2244.
62. Murakami K, and Tomasz A: Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1989) 171: 874-879
63. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M2-A6. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999)
64. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-T. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999)
65. Niemeyer DM, Pucci MP, Thanassi JA, Sharma VK, and Archer GL: Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1996) 178: 5464-5471
66. Ornelas-Soares A, de Lencastre H, de Jonge BL, and Tomasz A: Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 27246-27250
67. Pierre J, Williamson R, Bornet M, and Gutmann L: Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1990) 34: 1691-1694

68. Piriz-Duran S, Kayser FH, and Berger-Bachi B: Impact of *sar* and *agr* on methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. (1996) 141: 255-260
69. Ramotar K, Bobrowska M, Jessamine P, and Toye B: Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci initially reported as methicillin susceptible using automated methods. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (1998) 30: 267-273
70. Reynolds PE: The essential nature of staphylococcal penicillin-binding proteins, p.343-351. In P. Actor, L. Danco-Moore, M.L.Higgins, M.R.Salton, and G.D. Shockman (ed). Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1988)
71. Reynolds PE, and Fuller C: Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. FEMS Microbiol.Lett. (1986) 33: 251-254
72. Rosdahl VT: Naturally occurring constitutive lactamase of novel serotype in *S.aureus*. J. Gen. Microbiol. (1973) 77: 229-231
73. Ryffel C, Kayser FH, and Berger-Bachi B: Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. (1992) 36:25-31
74. Schmitz FJ, Mackenzie CR, Hofmann B, Verhoef J, Finken-Eigen M, Heinz HP, and Kohrer K: Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. J. Med. Microbiol. (1997) 46(9): 773-8
75. Seligman SJ: Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature (London) (1966) 209: 994-996
76. Severin A, Figueiredo AM, and Tomasz A: Separation of abnormal cell wall composition from penicillin resistance through genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. (1996) 178: 1788-92

77. Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, and Archer GL: Interaction of native and mutant *mecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* (1998) 180: 2160-2166
78. Shimaoka M, Yoh M, Segawa A, Takarada Y, Yamamoto K, and Honda T: Development of enzyme-labeled oligonucleotide probe for detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* (1994) 32:1866-1869
79. Skinner S, Inglis B, Matthews PR, and Stewart PR: Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* (1988) 2: 289-292
80. Smith JT, and Amyes SG: Bacterial resistance to antifolate chemotherapeutic agents mediated by plasmids. *Br. Med. Bull.* (1984) 40: 42-46
81. Spiliopoulou I, Petinaki E, Arvaniti A, Roumelioti E, and Dimitrakopoulos G: A study of *mec* genes among coagulase negative staphylococci by PCR. *Acta Microbiologica Hellenica* (1997) 42: 345-353
82. Spratt BG, and Cromie KD: Penicillin-binding proteins of Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* (1988) 10: 699-711.
83. Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, and Poston SM: IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* (1994) 31: 12-20
84. Stranden AM, Ehlert K, Labischinski H, and Berger-Bachi B: Cell wall monoglycine cross -bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1997) 179: 9-16
85. Suzuki E, Kuwahara Arai K, Richardson JF, and Hiramatsu K: Distribution of *mec* operable genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1991) 35: 151-154

86. Tesch W, Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, and Berger-Bachi B: Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1990) 34: 1703-1706
87. Tomasz A: Penicillin -binding proteins in bacteria. *Ann. Intern. Med.* (1982) 96: 502-504
88. Tonin E, and Tomasz A: Beta-lactam-specific resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1986) 27: 577-583
89. Tsakris A, Douboyas J, and Kyriakis K.: Multidrug resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *J. Chemother.* (1996) 8: 251-253
90. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY, Preston DA, and Skatrud PL: Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* (1992) 30: 1685-1691
91. Utsui Y, and Yokota T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1985) 28: 397-403
92. Waxman DJ, and Strominger JL: Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* (1983) 52: 825-86
93. Weller TM: The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* (1999) 43: 15-22
94. Wu CY, Alborn WE Jr, Flokowitsch JE, Hoskins J, Unal S, Blaszczak LC, Preston DA, and Skatrud PL. Site-directed mutagenesis of the *mecA* gene from a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (1994) 176: 443-449
95. Wu CY, Hoskins J, Blaszczak LC, Preston DA, and Skatrud PL: Construction of a water -soluble form of penicillin-binding protein 2a from a methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* isolate. Antimicrob. Agents Chemother. (1992) 36:533-539
96. Zhu YF, Curran IH, Joris B, Ghuysen JM, and Lampen JO: Identification of BlaR, the signal transducer for β -lactamase production in *Bacillus licheniformis*, as a penicillin-binding protein with strong homology to the OXA-2 β -lactamase (class D) of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. (1990) 172: 1137-1141
97. Zscheck KK, and Murray BE: Genes involved in the regulation of β -lactamase production in enterococci and staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. (1993) 37:1966-1970

