



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών:

**“ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ ”**

με κατεύθυνση:

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ

& ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***“ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ MRSA:
ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ
ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ”***

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ
ΤΑΡΑΤΟΡΑ ΔΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

ΛΑΡΙΣΑ 2013



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***“ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ MRSA:
ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ
ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ”***

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιτροπή Αξιολόγησης:

ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΝΤΑΙΛΙΑΝΑ ΖΩΗ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΚΡΙΚΕΛΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ: Καθηγητής ΑΤΕΙ Λάρισας Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων.

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ
ΤΑΡΑΤΟΡΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

ΛΑΡΙΣΑ 2013

*Στους γονείς και
τα αδέρφια μου . . .*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των σταφυλοκόκκων.....	6
Μορφολογία των <i>S. aureus</i>	6
Οικολογία.....	7
Λοιμώξεις που προκαλεί ο <i>S. aureus</i>	7
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).....	10
Επιδημιολογία των MRSA.....	12
Α. Παγκόσμια επιδημιολογία των MRSA.....	12
Β. Επιδημιολογία των MRSA στην Ελλάδα	15
ΣΚΟΠΟΣ.....	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
1. Μικροσκοπική Εξέταση.....	19
2. Καλλιέργεια.....	19
3. Ταυτοποίηση του <i>S. aureus</i>	21
i. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης.....	21
ii. Δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης.....	21
4. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	21
Δοκιμασία ευαισθησίας ή αντοχής στη Μεθικιλίνη.....	22
i. Μέθοδος δίσκων.....	22
ii. Συγκόλληση Latex για μεθικιλίνη.....	22
5. Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA extraction).....	22
6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	24

7. Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων PCR.....	27
8. Καθαρισμός Προϊόντων της PCR.....	30
9. Ταυτοποίηση με ακολουθία multilocus (<i>Multilocus Sequence Typing, MLST</i>).....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) είναι ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα βακτήρια που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα σοβαρών λοιμώξεων σε όλο τον κόσμο και σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα (Grundmann et al. 2006). Ο *S. aureus* παράγει μια ποικιλία από πρωτεΐνες και τοξίνες και έχει την ικανότητα να αποικίζει τον ανθρώπινο οργανισμό και να προκαλεί διάφορες νόσους. Ο *S. aureus* είναι επομένως ο αιτιολογικός παράγοντας για μια ποικιλία από βαριές και τοξικές ασθένειες, καθώς και επιφανειακές λοιμώξεις (Dinges et al. 2000).

Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των σταφυλοκόκκων

Η οικογένεια των *Micrococcaceae* περιλαμβάνει δύο κύρια γένη, το γένος *Micrococcus* και το γένος *Staphylococcus*. Ο διαχωρισμός των γενών γίνεται με βάση την αναερόβια διάσπαση της γλυκόζης. Συγκεκριμένα οι σταφυλόκοκκοι διασπών τη γλυκόζη αερόβια και αναερόβια, ενώ οι μικρόκοκκοι τη διασπών μόνο αερόβια.

Τους σταφυλόκοκκους παρατήρησε για πρώτη φορά ο Robert Koch το 1878. Το 1881 ο Ogston περιέγραψε για πρώτη φορά τη σταφυλοκοκκική σηψαιμία και τα σταφυλοκοκκικά αποστήματα. Κατόπιν ο Rosenbach το 1884 μελέτησε τους σταφυλόκοκκους και ανάλογα με το χρώμα των αποικιών τους διαχώρισε σε χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*Staphylococcus aureus*) και σε λευκό σταφυλόκοκκο (*Staphylococcus albus*).

Μορφολογία των *S. aureus*

Ο *s. aureus* είναι ένας Gram θετικός κόκκος, διαμέτρου περίπου 1μm. Όπως φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο σε χρωματισμένα παρασκευάσματα, διατάσσεται συνηθέστερα άτακτα σε μικρές ομάδες σαν τσαμπιά σταφυλιού είτε σε σειρά που περιλαμβάνει μέχρι τέσσερις κόκκους.

Πρόκειται για μικρόβιο ακίνητο και ασπορογόνο, χωρίς βλεφαρίδες και έλυτρο. Ωστόσο μερικά στελέχη αναπτύσσουν ένα λεπτό αμινογλυκουρονικό περίβλημα, το οποίο προσδίδει αντοχή στη φαγοκυττάρωση. Παράλληλα, ο *S. aureus* διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από πεπτιδογλυκάνη, τειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες (Schleifer 1984).

Οικολογία

Ο *S. aureus* αποικίζει το βλεννογόνο της πρόσθιας ρινικής κοιλότητας και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας της. Επίσης, αποικίζει το φάρυγγα και το παχύ έντερο. Από τα σημεία αυτά διασπείρεται και επιβιώνει στο δέρμα, στο τριχωτό της κεφαλής, στις μασχάλες, στο περίνεο. Λόγω της αντοχής του στην ξήρανση βρίσκεται και διατηρείται ζωντανός στα ρούχα, στα σεντόνια και στις κουβέρτες. Από το σώμα του ανθρώπου και από τον ρουχισμό του διασπείρεται στο φυσικό του περιβάλλον και μολύνει τη σκόνη των δωματίων, τα τρόφιμα ακόμη και (σπανιότατα) το νερό.

Αποικίζει το δέρμα και τη μύτη λίγες ώρες μετά τον τοκετό κάθε νεογνού που γεννιέται σε μαιευτήριο. Στα νεογνικά τμήματα ο αποικισμός αυτός είναι επικίνδυνος γιατί μπορεί να προκαλέσει σταφυλοκοκκική νόσο από κάποιο ανθεκτικό νοσοκομειακό στέλεχος. Αποικίζει επίσης τους νοσηλευόμενους σε νοσοκομεία και ιδίως σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), τέλος αποικίζει τη μύτη του νοσηλευτικού και ιατρικού προσωπικού στα νοσοκομεία. Ο αποικισμός αυτός είναι παροδικός διάρκειας 2-4 εβδομάδων. Το 30-50% των ατόμων αυτών είναι φορείς χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (Murakami et al 1991).

Λοιμώξεις που προκαλεί ο *S. aureus*

Ο *S. aureus* είναι ένα παθογόνο μικρόβιο που προσβάλλει όλα τα όργανα και όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Η κύρια κλινική ένδειξη σταφυλοκοκκικής νόσου είναι η πυώδης φλεγμονή. Σταφυλοκοκκική προσβολή μπορεί να γίνει στο δέρμα ή στους εν τω βάθει ιστούς και τα εσωτερικά όργανα. Τέτοιες νόσοι

είναι οι δερματικές σταφυλοκοκκιάσεις. Περιλαμβάνουν την ακμή, την πυοδερμία, τις διαπυήσεις τυχαίων και εγχειρητικών τραυμάτων (surgical site infection) καθώς και τα εγκαύματα. Όσον αφορά τις εν τω βάθει λοιμώξεις αυτές περιλαμβάνουν τα αποστήματα εσωτερικών οργάνων (αποστήματα εγκεφάλου, ήπατος, πνευμόνων, περιτονίτιδα κ.α.) και πληθώρα άλλων προβλημάτων. Η σταφυλοκοκκική πνευμονία, η οποία στους ενήλικες είναι επιπλοκή της γρίπης ή άλλης ιογενούς νόσου του αναπνευστικού και στα παιδιά επιπλοκής της ιλαράς ή του κοκκύτη. Η σταφυλοκοκκική σηψαιμία, είναι συνήθως σύμπτωμα μιας τοπικής σταφυλοκοκκίασης και μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλή σταφυλοκοκκίαση σε διάφορα όργανα. Η σηπτική ενδοαρτηρίτιδα, συνήθως παρατηρείται μετά από αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις ή καθετηριασμούς. Η σταφυλοκοκκική ενδοκαρδίτιδα, δύσκολα υποχωρεί με τη χημειοθεραπεία γιατί παραμένουν εστίες του μικροβίου στις βαλβίδες. Με αντίστοιχο τρόπο η σηπτική αρθρίτιδα και η οστεομυελίτιδα δύσκολα υποχωρούν μόνο με χημειοθεραπεία (παραμονή μικροβίων στα οστά). Η τροπική πυομυοσίτιδα, αφορά την εντόπιση του *S. aureus* σε μυικές μάζες και παρατηρείται κυρίως σε τροπικές χώρες αλλά ήδη έχουν εντοπιστεί και οι πρώτες περιπτώσεις και στη Βόρεια Αμερική (Pfaller *et al.* 1988)

Επίσης ο *S. aureus* παράγει περίπου τριάντα τοξίνες που οι περισσότερες είναι ένζυμα. Οι τοξικές ουσίες που έχουν σχέση με την παθογόνο δράση του μικροβίου είναι οι εξής:

α) Αιμολυσίνες. Έχουν διαχωριστεί 4 αιμολυσίνες οι α, β, γ και δ. Η α-αιμολυσίνη είναι λεύκωμα θερμοευαίσθητο, που αδρανοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρά στους 100°C. Παράγεται από τα περισσότερα στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου όχι όμως και από όλα. Οι τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες είναι: αιμολυτική για τα ερυθρά αιμοσφαίρια του κουνελιού και του προβάτου και ελαφρά για τα ερυθρά αιμοσφαίρια του άνθρωπου. Η β-αιμολυσίνη παράγεται συνήθως από τα στελέχη που απομονώνονται από ζώα. Αιμολύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια μόνο του προβάτου και δεν αιμολύει τα ερυθρά κουνελιού και ανθρώπου. Η δ-αιμολυσίνη μοιάζει πολύ με την α-αιμολυσίνη από την οποία δύσκολα διαχωρίζεται κατά τις τεχνικές διαχωρισμού.

β) Λευκοκτονίνες. Έχουν διαχωριστεί δύο είδη η F (Fast) και η S (Slow). Ονομάζονται και PVL από τα ονόματα των ερευνητών Panton και Valentin. Παράγονται από το 50% των σταφυλοκόκκων. Σκοτώνουν τα λευκά αιμοσφαίρια του ανθρώπου και του κουνελιού. Είναι αντιγονικές τοξίνες και αντισώματα αυτών

βρίσκονται στο αίμα πασχόντων από ενεργό σταφυλοκοκκική νόσο, εφ' όσον ο σταφυλόκοκκος της νόσου παράγει αυτές τις τοξίνες. Ανιχνεύεται με τη μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης. Τα αντισώματα αυτά είναι προστατευτικά για επαναμολύνσεις.

Επίσης ο παράγοντας Panton-Valentein Leucocidin (PVL) προκαλεί νεκρωτική πνευμονία και έχει συνδεθεί με την εμφάνιση πυώδους και νεκρωτικής δερματικής λοίμωξης. Στην Ελλάδα σε ποσοστό 27% ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος μεταφέρει το PVL γονίδιο: 45% των MRSA και 12% των στελεχών χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου που είναι ευαίσθητος στην μεθικιλίνη (MSSA). Η πλειοψηφία των PVL θετικών MRSA στελεχών ανήκουν σε έναν και μοναδικό κλώνο που ονομάζεται C ή MLST-80 και που είναι επίσης διαδεδομένος στην υπόλοιπη Ευρώπη. Αυτός ο κλώνος βρέθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας να αποτελεί μέρος της χλωρίδας των χεριών και της ρινικής κοιλότητας υγιών ατόμων και χαρακτηρίζεται από την μεγάλη ευκολία με την οποία μεταδίδεται μεταξύ ατόμων με στενή σωματική επαφή προκαλώντας νόσο σε κατά τα άλλα υγιή παιδιά ή νεαρούς ενήλικες. Πρόσφατα παρατηρήθηκε μια έξαρση στην Μονάδα Νεογνών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας όπου καλλιέργειες από το δέρμα των χεριών οδήγησε στην απομόνωση του υπεύθυνου στελέχους από δύο μέλη του νοσηλευτικού προσωπικού. (Petinaki *et al* 2007).

γ) Εντεροτοξίνες. Είναι θερμοανθεκτικές τοξίνες που αντέχουν στους 100°C για 30 λεπτά. Έχουν διαχωριστεί πέντε εντεροτοξίνες βάση της αντιγονικής τους διαφοράς οι A, B, C, D και E.

δ) Αποφολιδωτική τοξίνη. Παράγεται μόνο από ορισμένα στελέχη του λυσιτύπου 71 της βακτηριοφαγικής ομάδας II και είναι η A και η B. Είναι συνήθως από τους σταφυλοκόκκους που αποικίζουν στη μύτη. Ευαίσθητα την τοξίνη αυτή είναι το δέρμα του νεογνού και του ποντικίου. Στον άνθρωπο προκαλεί την τοξική επιδερμική νεκρόλυση (TEN) ή σύνδρομο ζεματισμένου δέρματος (scalded skin syndrome) στα νεογνά.

ε) Τοξίνη του συνδρόμου του τοξικού σοκ ή TSST-1. Είναι μια τοξίνη που παράγεται από τη βακτηριοφαγική ομάδα του λυσιτύπου 29. Η τοξίνη καλείται και TSST-1 από τη νόσο που προκαλεί.

στ) Υαλουρινιδάση. Παράγεται από το 90% των στελεχών *S. aureus*. Είναι ουσία αντιγονική και αντισώματα προς αυτή βρίσκονται στο αίμα των πασχόντων από σταφυλοκοκκική νόσο.

ζ) Ινωδολυσίνη. Παράγεται από το 90% των σταφυλοκόκκων. Λέγεται και σταφυλοκινάση.

η) πυρετογόνος εξωτοξίνη. Παράγεται από πολλούς σταφυλοκόκκους και προκαλεί πυρετό, βλάβη του μυοκαρδίου και θανατηφόρο σοκ.

Οι τοξινικές σταφυλοκοκκικές νόσοι είναι οι εξής:

Η τροφική δηλητηρίαση η οποία εμφανίζεται περίπου 6 – 12 ώρες μετά τη λήψη της τροφής στην οποία είχε αναπτυχθεί *S. aureus* που παράγει εντεροτοξίνες. Τα συμπτώματα της νόσου είναι ναυτία, εμετός, ζάλη, ίλιγγος, υπνηλία ή και συμπτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στη χώρα μας οι συνηθέστερες τοξινικές σταφυλοκοκκικές τροφικές δηλητηριάσεις είναι συνήθως ομαδικές π.χ. από κόλυβα ή από κρέμες, γλυκίσματα, γαλακτερά, τυριά κ.α. κυρίως το καλοκαίρι, με την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών.

Η τοξική επιδερμική νεκρόλυση (TEN), η οποία οφείλεται στη δράση της αποφολιδωτικής τοξίνης που εκκρίνεται από *S. aureus* του λυσιτύπου 71. Από αυτή τη νόσο πάσχουν μόνο τα νεογνά. Είναι γνωστό και ως σύνδρομο ζεματισμένου δέρματος και αυτό γιατί έχει την κλινική εικόνα ως μικρών ή μεγάλων φυσαλίδων γεμάτων από υγρό που οδηγούν σε αποκόλληση της επιδερμίδας και απόπτωσή της σε μεγάλα τεμάχια.

Το σύνδρομο του τοξικού σοκ ή αλλιώς TSS (Toxic shock syndrome) είναι μια οξεία τοξική λοίμωξη που περιγράφηκε πρώτη φορά το 1978 σε επτά παιδιά και αποδόθηκε στη δράση τοξινών που παράγονται από τον *S. aureus*. Ο ενοχοποιημένος αυτός σταφυλόκοκκος δεν αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος ή των βλεννογόνων. Αποδείχθηκε ότι από το σύνδρομο αυτό προσβάλλονται επίσης νεαρές γυναίκες που κατά της περίοδο της έμμηνης ρύσης χρησιμοποιούν ταμπόν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το σύνδρομο αυτό είναι οξύτατο και με υψηλή θνητότητα (Johnson *et al.* 1991).

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη χρυσίζοντες σταφυλόκοκκοι (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) έχουν την ικανότητα να αποκτούν μεγάλη αντοχή σε

πολλαπλά αντιβιοτικά, με κύριο χαρακτηριστικό να αναπτύσσουν αντίσταση στις β-λακτάμες όπως είναι οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και οι πενέμες (Lowy, 1998). Συχνά εμφανίζουν αντοχή στις τετρακυκλίνες, στο φουσιδικό οξύ, στις μακρολίδες, στις λινκοσαμίδες, στις αμινογλυκοσίδες καθώς και μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτιδία. Αυτή η ανάπτυξη αντοχής που εμφανίζουν έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τη χρήση αντιβιοτικών στους ανθρώπους και στα ζώα (Moreillon, 2008, Rybak *et al.* 2001, Rybak, 2005). Έτσι ο MRSA κατατάσσεται στα πιο λοιμογόνα και επικίνδυνα παθογόνα για τον άνθρωπο (Lowy 1998).

Ο *S. aureus* μπορεί να συνδέεται με νοσηλευτικά ιδρύματα (Hospital-acquired MRSA) HA-MRSA ή με την κοινότητα (Community-acquired MRSA) CA-MRSA. Ο HA-MRSA έχει καθιερωθεί ως μία από τις πιο διαδεδομένες αιτίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων σε όλο τον κόσμο. Κατά τη διάρκεια του 1997, δημοσιεύονται οι πρώτες εκθέσεις των MRSA λοιμώξεων σε άτομα χωρίς προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου, και έτσι δημιουργείται η κατηγορία των CA-MRSA (community-associated MRSA). Ο όρος αυτός έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγραφούν στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις σε ασθενείς χωρίς πρόσφατη επαφή με νοσοκομειακή περίθαλψη. Λοιμώξεις και κρούσματα έχουν αναφερθεί σε όλο τον κόσμο (Rybak 2005, Naimi *et al.* 2003).

Οι πτυχές που συνδέονται με αυτές τις λοιμώξεις έχουν σημαντικές επιδημιολογικές, θεραπευτικές και κλινικές επιπτώσεις, τόσο από την προοπτική της παθογένειας της, καθώς και από την εξέλιξη της μικροβιακής αντοχής. Σύμφωνα με διεθνή δεδομένα κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, τα στελέχη MRSA έχουν γενικά περιοριστεί στους χώρους παροχής υγειονομικής περίθαλψης. Κυρίως επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τα άτομα που εμφανίζουν νοσηρότητα ή άλλους ειδικούς παράγοντες κινδύνου, όπως η παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο (Elston *et al.* 2009). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα επιδημιολογικά δεδομένα των MRSA λοιμώξεων έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές. Νέα στελέχη έχουν εμφανιστεί στις λοιμώξεις κοινότητας (Community-acquired MRSA, CA-MRSA) και πιο πρόσφατα τα ζώα κτηνοτροφικών μονάδων έχουν αναφερθεί ως νέα πηγή ανθρώπινου αποικισμού MRSA λοιμώξεων (Livestock-acquired MRSA, LA-MRSA). Επίσης τα στελέχη των CA-MRSA εμφανίζονται και ως νοσοκομειακά παθογόνα με αποτέλεσμα και οι δύο κατηγορίες στελεχών, CA-MRSA και HA-MRSA, να κυκλοφορούν και να εμφανίζονται και στα δύο περιβάλλοντα (Menegotto *et al.* 2012).

Πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι τα CA-MRSA στελέχη είναι όλο και περισσότερο οι αιτίες των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Maree *et al.* 2007)

και συνεπώς οι παραδοσιακοί επιδημιολογικοί ορισμοί και οι παράγοντες κινδύνου δεν μπορούν να διακρίνουν και να διαχωρίσουν αξιόπιστα τους CA-MRSA από τους HA-MRSA (Porovich *et al.* 2008). Μελέτες της μοριακής επιδημιολογίας έχουν αποκαλύψει σημαντικές διαφορές μεταξύ των HA-MRSA και των CA-MRSA, οι οποίες εστιάζουν στους παράγοντες αντοχής αυτών καθώς και στα είδη και στους κλώνους που προσδιορίζονται με την MLST (multilocus sequence typing) (Enright *et al.* 2002). Μέχρι σήμερα οι μελέτες αυτές έχουν αποδείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα, πιθανότατα λόγω διαφορών μεταξύ πληθυσμού των ασθενών, γεωγραφικής περιοχής (π.χ. Ηνωμένες Πολιτείες, Ασία), ανατομικής περιοχής της λοίμωξης ακόμη και της επιλογής των ομάδων αναφοράς και έλλειψης των μεταβλητών ανάλυσης (Chen *et al.* 2010, Han *et al.* 2012).

Επιδημιολογία των MRSA

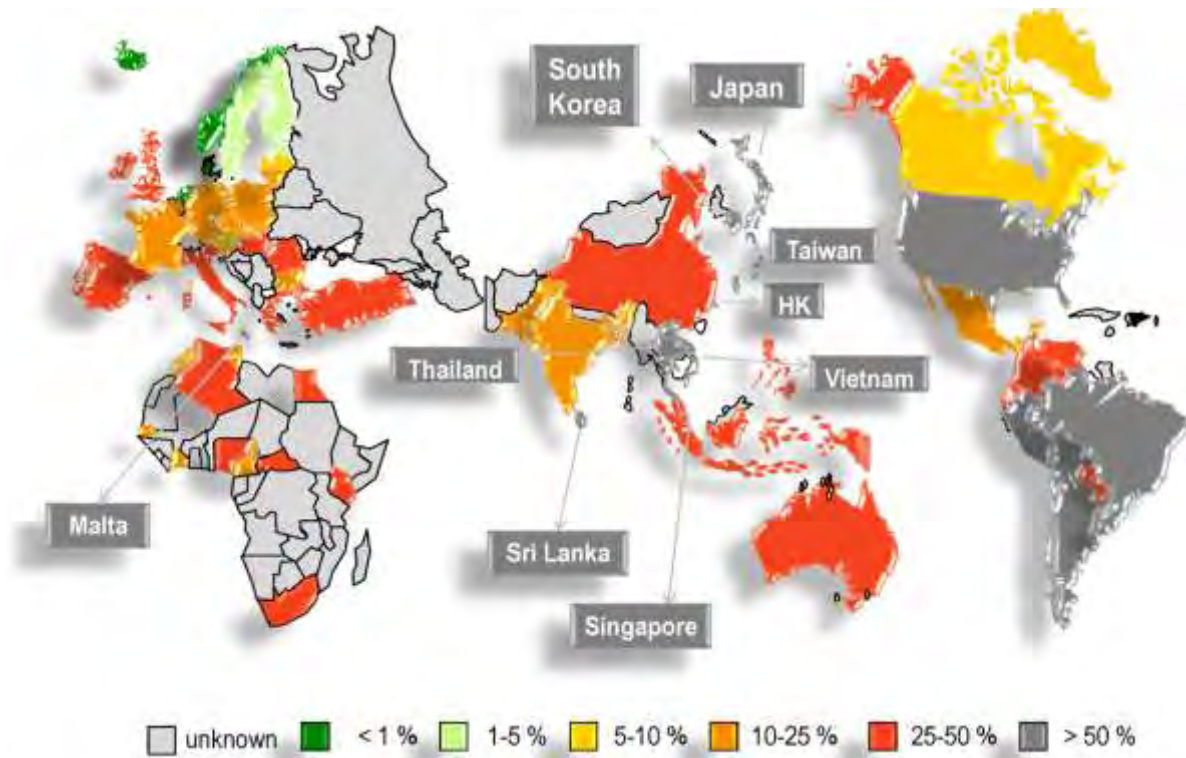
A. Παγκόσμια επιδημιολογία των MRSA

Η εμφάνιση και η εξάπλωση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* ως ένα νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο έχει δημιουργήσει μια κλινική παγκόσμια απειλή (Vandenesch *et al.* 2003). Ο MRSA θεωρείται ως η κύρια αιτία των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ο MRSA εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο, και στη συνέχεια αναγνωρίστηκε ως ένα νοσοκομειακό παθογόνο σε ολόκληρο τον κόσμο (Jevon 1961, Deurenberg *et al.* 2007, Deurenberg *et al.* 2009). Τα στελέχη αυτά αναδύθηκαν το 1960 και παράλληλα με την αντοχή τους στα β-λακταμικά αντιβιοτικά εμφάνιζαν αντοχή σε πολλές άλλες τάξεις αντιμικροβιακών φαρμάκων. Για αρκετές δεκαετίες η αναφορά των MRSA συσχετιζόταν με νοσοκομειακές λοιμώξεις, ενώ από τις αρχές του 1990 εντοπίστηκαν λοιμώξεις και σε υγιή άτομα της κοινότητας. Οι μολύνσεις από MRSA έχουν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό σε παγκόσμια κλίμακα. Το ποσοστό θνητότητας που συνδέεται με τις εν τω βάθει λοιμώξεις από MRSA εκτιμάται σε ποσοστό 20%, αλλά ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελετών, λόγω διαφορετικών παραμέτρων (Stefani *et al.* 2012). Η εξάπλωση των MRSA χαρακτηρίζεται σήμερα ως πανδημία εστιάζοντας στη διάδοση των HA-MRSA (Hospital-associated MRSA) κλώνων από τη δεκαετία του 1960, των CA-MRSA (Community-associated MRSA) κλώνων από τη δεκαετία του 1990 και των LA-MRSA (Livestock-associated MRSA) κλώνων από τη δεκαετία του 2000 (McDonald, 2006).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των MRSA είναι η κλωνική τους διασπορά. Έτσι, από δεκαετίες υπάρχει προσπάθεια καταγραφής των επικρατούντων κλώνων ανά ήπειρο και ανά χώρα. Ωστόσο σήμερα, η δυνατότητα μετακίνησης του πληθυσμού αφενός, και η μεταφορά κλώνων από τα ζώα στους ανθρώπους έχει επιφέρει σημαντικές αλλαγές στους επικρατούντες κλώνους και στην επιδημιολογία των MRSA. Κυρίως έχουν ταυτοποιηθεί δύο κλώνοι ο ST398 και ο ST80. Ο MRSA ST398 ευθύνεται για το 20% του συνόλου των MRSA στην Ολλανδία και έχει περιγραφεί σε όλο τον κόσμο. Αν και η μετάδοση του ST398 έχει αναφερθεί κυρίως μεταξύ ζώων, τα άτομα με επαγγελματική έκθεση σε ζώα βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για την μεταφορά του *S. aureus* από ότι στο γενικό πληθυσμό (Drouga *et al.* 2012).

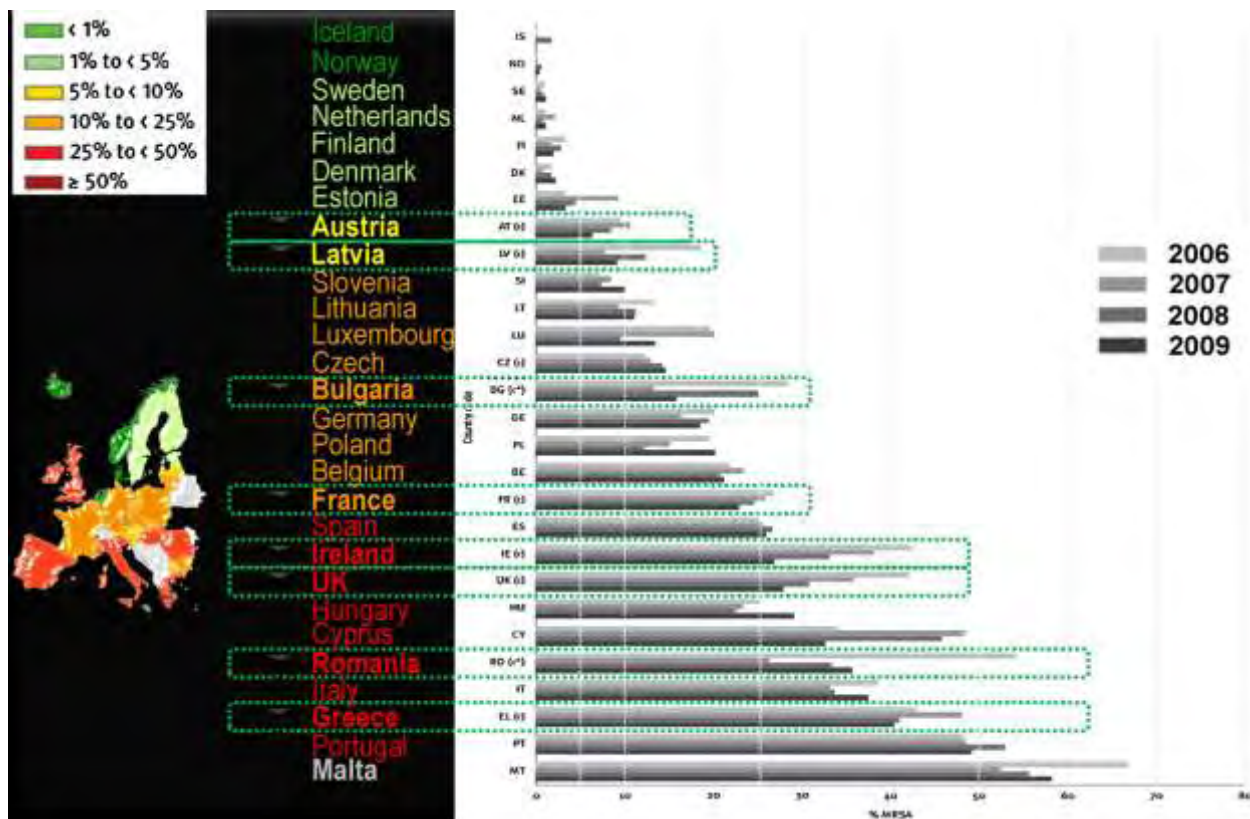
Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, ο MRSA είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος σε νοσοκομεία σε όλο τον κόσμο (Εικόνα 1). Αν και τα επιδημιολογικά δεδομένα από ξεχωριστές μελέτες είναι πολλά, δεν είναι συγκρίσιμα λόγω των διαφορών που υπάρχουν στο σχεδιασμό της μελέτης και στους πληθυσμούς δειγμάτων. Μελέτες αναφέρουν πολύ υψηλά ποσοστά (>50%) στη Βόρεια και στη Νότια Αμερική, στην Ασία αλλά και στη Μάλτα. Ενδιάμεσα ποσοστά (25-50%) αναφέρθηκαν στην Κίνα, στην Αυστραλία, την Αφρική καθώς και σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες [π.χ Πορτογαλία (49%), Ελλάδα (40%), Ιταλία (37%) και Ρουμανία (34%)].

Άλλες ευρωπαϊκές χώρες έχουν γενικά χαμηλά ποσοστά επιπολασμού (π.χ. οι Κάτω Χώρες και η Σκανδιναβία) (McDonald, 2006). Η επικράτηση των HA-MRSA έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Αυστρία, Γαλλία, Ιρλανδία, το Ηνωμένο Βασίλειο αλλά και η Ελλάδα. Σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες όμως, η επικράτηση έχει παραμένει αρκετά σταθερή (Εικόνα 2). Ωστόσο πολύ υψηλά ποσοστά HA-MRSA έχουν αναφερθεί στην Ανατολική Ασία, κυρίως στη Σρι Λάνκα (86,5%), στη Νότια Κορέα (77,6%), στο Βιετνάμ (74,1%), στην Ταϊλάνδη (57%), στην Ταϊβάν (65,0%), στην και στο Χόνγκ Κόνγκ (56,8%), ενώ σε αντίθεση μ'αυτές τις χώρες οι τιμές είναι πολύ χαμηλότερες στην Ινδία (22,6%) και στις Φιλιππίνες (38,1%) (Εικόνα 2) (Song *et al.* 2011).



Εικόνα 1. Παγκόσμια επιδημιολογία των Hospital-Associated MRSA (HA-MRSA)

(Song et al. 2011)



B. Επιδημιολογία των MRSA στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα μέχρι σήμερα οι διάφορες μελέτες αφορούν στην πλειονότητα τους σε MRSA στελέχη που απομονώθηκαν ενδονοσοκομειακά, χωρίς να γίνεται διαχωρισμός αυτών σε νοσοκομειακά (HA-MRSA) και μη. Μια τέτοια μελέτη του τμήματος Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών έδειξε ότι το σύνολο των στελεχών που απομονώθηκαν από επτά ελληνικά νοσοκομεία το έτος 1997, το 41% ήταν MRSA και μάλιστα πολυανθεκτικά στελέχη. Έρευνα στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης που διήρκησε από το 1999 έως το 2000, διαπίστωσε ότι το 50,7% των ενδονοσοκομειακών στελεχών *S. aureus* ήταν MRSA. Άλλη έρευνα στο Λαϊκό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών έδειξε πως το ποσοστό των MRSA στελεχών του συνολικού όγκου *S. aureus* που μελετήθηκε αυξήθηκε από 33% το 1994 στο 50% το 2001. Κατά τη χρονική περίοδο 1999 με 2000 στα πέντε μεγαλύτερα νοσοκομεία της Θεσσαλίας η αντίστοιχη συχνότητα άγγιξε το 14,8%. Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Πάτρας βρέθηκε το 2002 ότι η συχνότητα των νοσοκομειακών MRSA στελεχών στο σύνολο των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από *S. aureus* ήταν κατά μέσο όρο 14,4% (Karapsias 2008).

Η Ελλάδα, όπως διαπιστώνεται και από παραπάνω, είναι μια χώρα με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης MRSA. Η διεύρυνση αυτή συνδέεται κυρίως με την ευρεία εξάπλωση στην κοινότητα ενός ενιαίου λοιμογόνου κλώνου στην Ευρώπη τον ST80. Στην Ελλάδα, ο ST80 είναι ο κυρίαρχος κλώνος μεταξύ των λοιμώξεων από MRSA και μεταδίδεται στην κοινότητα και τα νοσοκομεία. Μεταξύ των λοιμώξεων που προκαλούνται από MRSA, εκτός από τον κυρίαρχο κλώνο ST80, εμφανίζεται συχνά και ο ST239 (Spilioroulou *et al.* 2003).

Ο ST80 βρέθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας να αποτελεί μέρος της χλωρίδας των χεριών και της ρινικής κοιλότητας υγιών ατόμων και χαρακτηρίζεται από την μεγάλη ευκολία με την οποία μεταδίδεται μεταξύ ατόμων με στενή σωματική επαφή προκαλώντας νόσο σε κατά τα άλλα υγιή παιδιά ή νεαρούς ενήλικες. Πρόσφατα παρατηρήθηκε μια έξαρση μολυσματικότητας στην Μονάδα Νεογνών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας όπου καλλιέργειες από το δέρμα των χεριών

οδήγησε στην απομόνωση του υπεύθυνου στελέχους από δύο μέλη του νοσηλευτικού προσωπικού. Μέτρα πρόληψης εναντίον λοιμώξεων από αυτά τα στελέχη αποτελούν η επαναλαμβανόμενη χρήση τοπικού σκευάσματος mupirocin στην ρινική κοιλότητα ακι ταυτόχρονα χρήση αλκοολούχων σκευασμάτων για την υγιεινή των χεριών (Petinaki et al 2007).

Στην περιοχή μας, η αναλογία των σταφυλοκοκκικών παιδιατρικών λοιμώξεων που προκαλούνται από MRSA αυξήθηκε από 51,5% την περίοδο 2003-2006 σε 63,4% κατά την περίοδο 2007-2009. Στην Ελλάδα, οι κλώνοι MRSA οι οποίοι κυριαρχούν είναι κυρίως οι ST30, ST239 και ο ST80. Οι δύο πρώτοι κλώνοι έχουν κυρίως συσχετισθεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις ενώ ο κλώνος ST80 έχει συσχετισθεί με λοιμώξεις της κοινότητας (Tsironi et al. 2012).

Στη Θεσσαλία μέχρι το 2006 επικρατούσε η ίδια εικόνα επιδημιολογίας των MRSA. Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%, των *S. aureus* που απομονώθηκαν το 2005 σε παιδιά ήταν MRSA. Αυτά τα στελέχη MRSA παρουσιάζουν αντοχή σε φουσιδικό οξύ, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, και κλινδαμυκίνη. Η αντοχή αυτή φαίνεται να είναι ένα παρατεταμένο φαινόμενο παρά μια παροδική κατάσταση. Στην Θεσσαλία, το 85% των στελεχών MRSA που εξετάστηκαν ανήκε στο ST80 (Katorpodis et al. 2010). Ωστόσο, η ανάδυση του κλώνου MRSA-ST398 στην Ευρώπη σε φάρμες εκτροφής χοίρων όπως και η πρώτη απομόνωση στελέχους ST398 στην Πάτρα επιβάλλουν το σχεδιασμό μελέτης των νέων επιδημιολογικών δεδομένων της περιοχής μας (Petinaki et al. 2009).

Το 5%-15% επί του συνόλου των λοιμώξεων στη χώρα μας οφείλονται στον *S. aureus* ενώ ποσοστό περίπου στο 45% των λοιμώξεων με *S. aureus* είναι MRSA (το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 10% ως 50%, καθώς σε κάποια μικρά νοσοκομεία τα ποσοστά εμφάνισης του MRSA είναι χαμηλά ενώ σε κάποια μεγάλα νοσοκομεία πολύ υψηλότερα). Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό ότι από το σύνολο των κρουσμάτων MRSA που εμφανίζονται στην Ελλάδα περισσότερες από επτά στις δέκα περιπτώσεις αφορούν την κοινότητα ενώ περίπου τρεις στις δέκα τα νοσοκομεία.

Η επιδημία αυτή που έχει επίσης πλήξει και άλλες χώρες του ευρωπαϊκού Νότου όπως η Ισπανία και η Ιταλία, φαίνεται να παίρνει διαστάσεις αντίστοιχες με εκείνες στις ΗΠΑ. Βέβαια διαφορετικοί κλώνοι του MRSA έχουν «πλήξει» ΗΠΑ και Ευρώπη: στη

χώρα μας αλλά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες όπως η Γαλλία ο κυρίαρχος κλώνος αυτή τη στιγμή είναι ο ST80 ο οποίος διαφέρει από τον USA300 που «τρομοκρατεί» τα τελευταία χρόνια τις ΗΠΑ. Ωστόσο ο κίνδυνος είναι αντίστοιχος για τον πληθυσμό.

Και αυτό διότι ο MRSA της κοινότητας προκαλεί λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, μολύνσεις στο αίμα αλλά και εν δυνάμει θανατηφόρες πνευμονίες, κυρίως σε άτομα των οποίων το σύστημα έχει εξασθενήσει λόγω κάποιας νόσου όπως η γρίπη. Στην πανδημία του 2009 παρουσιάστηκαν αρκετά περιστατικά πνευμονίας που οφειλόταν σε MRSA σε ασθενείς με γρίπη.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να τυποποιηθούν τα στελέχη MRSA τα οποία θα απομονωθούν από την περιοχή της Θεσσαλίας κατά το έτος 2012 και να συγκριθούν με τα παλαιότερα δεδομένα της περιοχής, ώστε να:

- Χαρακτηριστούν οι ST τύποι που επικρατούν.
- Συσχετιστούν οι ST τύποι ανάλογα με το είδος της λοίμωξης (ενδονοσοκομειακή ή λοίμωξη κοινότητας).
- Συγκριθούν οι ST τύποι του 2012 με εκείνους των παρελθόντων ετών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μικροσκοπική Εξέταση

Τα συνηθέστερα δείγματα που έρχονται στο εργαστήριο για διάγνωση σταφυλοκοκκικών νόσων είναι: πύο, ωτικό έκκριμα, οφθαλμικό έκκριμα, τραύμα, ιστός, φλεβικό αίμα, βρογχικές εκκρίσεις, δερματική βλάβη, ούρα, κόπρανα, πτύελα, αρθρικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Η μικροσκοπική εξέταση είναι η πρώτη και απαραίτητη εξέταση όταν το δείγμα είναι πύο ή άλλο φλεγμονώδες υλικό, ή υγρό παρακεντήσεως κλειστών κοιλοτήτων. Η τεχνική γίνεται με τη χρώση κατά Gram. Παρουσία Gram-θετικών κόκκων ενδο- και εξωκυτταρίων σε ένα υλικό με πολλά ή με λίγα πυοσφαίρια είναι μια πρώτη ένδειξη ότι πιθανόν το παθογόνο αίτιο της φλεγμονής είναι κάποιος σταφυλόκοκκος. Με τη μικροσκοπική μέθοδο δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε αν ο κόκκος είναι χρυσίζων σταφυλόκοκκος. Η μικροσκοπική εξέταση είναι βοηθητική και πολλές φορές δεσμευτική για το αποτέλεσμα της καλλιέργειας.

2. Καλλιέργεια

Ο *S. aureus* είναι μικρόβιο αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο. Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά. Οι αποικίες του στο άγαρ είναι κυκλικές, σχετικά μεγάλες, με διάμετρο περί τα 1-3 mm μετά από 24ωρη επώαση στους 37° C. Αν η επώαση παραταθεί μέχρι 5 ημέρες οι αποικίες μεγαλώνουν μέχρι 3-10 mm. Οι διαφορές στο μέγεθος των αποικιών χαρακτηρίζουν ορισμένα στελέχη του *S. aureus* και περιλαμβάνονται στους διαχωριστικούς χαρακτήρες των διαφόρων ειδών του γένους των σταφυλοκόκκων. Μετά από παραμονή 3-5 ημερών σε θερμοκρασία 34° – 35° C και παραμονή επί 2 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου έχουν διάμετρο 6-8 mm και χρώμα από κρεμ-κίτρινο μέχρι πορτοκαλί.

Σε αιματούχο άγαρ οι αποικίες περιβάλλονται συνήθως από ζώνη β- αιμόλυσης.

Στο θρεπτικό υλικό McConkey ο *S. aureus* αναπτύσσεται αργά και κάνει λεπτότερες, συμπαγέστερες και φουσκωτές αποικίες με ελαφρύ ροζ χρώμα από τη διάσπαση της λακτόζης.

Στο αλατούχο άγαρ Chapman ο *S. aureus* αναπτύσσεται καλά και κάνει αποικίες μικρές αλλά συμπαγείς και φουσκωτές μετά από 24 ώρες. Αν στο υλικό υπάρχει μαννιτόλη και δείκτης τότε οι αποικίες είναι κίτρινες, επίσης ο *S. aureus* αναπτύσσεται σε ζωμό με χλωριούχο νάτριο 7% - 10% και προκαλεί ομοιομερή θολερότητα ενώ η ανάπτυξή του είναι ταχεία και άφθονη (Εικόνα 3).

Η χρυσίζουσα χρωστική εμφανίζεται μόνο στα στερεά θρεπτικά υλικά και επιτείνεται καθώς το 24ωρο καλλιέργημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης το χρώμα αναπτύσσεται αφθονότερο και ταχύτερα αν στο υλικό υπάρχουν ειδικοί προαγωγοί της χρωστικής ουσίας όπως η λακτόζη, η γλυκερίνη κ.α. Χρωστική δεν παράγεται σε αναερόβια ανάπτυξη.

Ευνοϊκή θερμοκρασία αναπτύξεώς του *S. aureus* είναι οι 35° – 37° C και ακραία όρια 10° – 42°C. Σε κάθε καλλιέργημα εμφανίζονται μεταλλάκτες με διαφορετικούς μορφολογικούς, καλλιεργητικούς και μεταβολικούς χαρακτήρες όπως το μέγεθος και ο τύπος αποικιών, η παραγωγή ή μη χρωστικής, η έκταση και η μορφή αιμόλυσεως, η παραγωγή ή μη ορισμένων ενζύμων, η αντοχή ή ευπάθεια προς αντιμικροβιακούς παράγοντες ή τέλος, η μικρή ή μεγάλη παθογονικότητα.



Εικόνα 3. Καλλιέργεια *S. aureus* σε αιματούχο θρεπτικό υλικό και Chapman.

3. Ταυτοποίηση του *S. aureus*

i. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Είναι η πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή προκειμένου να προσδιορίσουμε Gram-θετικούς κόκκους. Είναι θετική για όλους τους σταφυλοκόκκους και μικροκόκκους και αρνητική για όλους τους στρεπτοκόκκους.

Πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε μία σταγόνα οξυζενέ. Με κρίκο αποσπούμε μία αποικία ή μέρος της ύποπτης αποικίας και τη μεταφέρουμε μέσα στη σταγόνα του οξυζενέ. Αν το μικρόβιο-δείγμα μας παράγει καταλάση θα σχηματιστούν γρήγορα άφθονες μικρές και μεγάλες φυσαλίδες.

ii. Δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης

Δοκιμή πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε μία σταγόνα νερό και σ' αυτήν ομοιογενοποιούμε 1-2 αποικίες του δείγματός μας. Αν το μικρόβιο-δείγμα δεν ομοιογενοποιείται η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη. Στο πυκνό αυτό εναιώρημα μεταφέρουμε με ένα κρίκο ελάχιστη ποσότητα από πλάσμα ανθρώπου και ανακατεύουμε. Αν ο σταφυλόκοκκος παράγει κοαγκουλάση το εναιώρημα θα "κόψει", δηλαδή θα σχηματιστούν αμέσως μικρά και μεγάλα πήγματα καθώς θα συνεχίσουμε να ανακατεύουμε με τον κρίκο. Δεν αξιολογείται συγκόλληση που θα εμφανισθεί μετά.

4. Δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Στην επιλογή των αντιβιοτικών θα περιληφθούν όλα τα β-λακταμικά αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων και αντιβιοτικά όπως η βανκομυκίνη, η ιμιπενέμη, η οξακιλλίνη, η γενταμικίνη, η ερυθρομυκίνη, οι τετρακυκλίνες και η πενικιλίνη.

Δοκιμή ευαισθησίας ή αντοχής στη Μεθικιλίνη

i. Μέθοδος δίσκων

Από την καλλιέργεια παίρνουμε με τον κρίκο μια αποικία και την προσθέτουμε σε ζωμό θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarlan το οποίο θα επιστρώσουμε με

βαμβακοφόρο στυλεό στην επιφάνεια τρυβλίου με άγαρ Muller-Hinton. Στη συνέχεια θα τοποθετηθεί δισκίο με 1 mg οξακιλλίνης. Η οξακιλλίνη είναι προτιμότερη από τη μεθικιλίνη γιατί είναι σταθερότερη και τα δισκία διατηρούνται για περισσότερο χρόνο αλλά και γιατί είναι πιο ευαίσθητη στην αναγνώριση των ανθεκτικών στελεχών.

Η επώαση γίνεται στους 35° C για 24 ώρες. Η ανάγνωση του τρυβλίου θα γίνει με πλάγιο διερχόμενο φωτισμό γιατί μπορεί να υπάρχει λεπτή άλως στη ζώνη αναστολής.

Ευαίσθητος θεωρείται ο σταφυλόκοκκος ο οποίος έχει ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο της οξακιλλίνης διαμέτρου 16-30 mm. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο διαχωρισμός των στελεχών του *S. aureus* που δεν είναι γονιδιακά ανθεκτικά στη μεθικιλίνη αλλά εμφανίζονται γιατί παράγουν β-λακταμάσες. Αυτά θα αναγνωρισθούν με την τοποθέτηση και ενός δισκίου κλαβουλανικού οξέος.

ii. Συγκόλληση Latex για μεθικιλίνη

Είναι μια ταχεία μέθοδος και προσφέρεται έτοιμη στο εμπόριο με την ονομασία Staphaurex. Το στέλεχος του *S. aureus* που θα δοκιμασθεί με τη μέθοδο αυτή θα είναι 18 ωρών καλλιέργεια σε TSA άγαρ χωρίς οξακιλλίνη ή μεθικιλίνη

5. Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA extraction)

Το DNA είναι το βασικό υλικό των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής μικροβιολογίας. Έτσι για κάθε περαιτέρω διαδικασία απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απελευθέρωση αυτού (DNA) σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες. Για την εκχύλιση του DNA των στελεχών που μελετήθηκαν για την εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Αντιδραστήρια:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Πρωτεΐνάση K (Invitrogen)
- Tris-HCl pH 7.0 (Ambion)
- Triton-X-100 (Research Organics)
- EDTA pH 8.0 (Ambion)

Μηχανήματα:

- Φυγόκεντρος Mini Spin (Eppendorf)
- Υδατόλουτρο (BIOLine scientific)
- Vortex (BICASA)

Πειραματική διαδικασία:

1. Παρασκευάζεται το λυτικό διάλυμα προσθέτοντας 5 ml Tris-HCl pH 7.5, 1ml Triton-X-100, 0,5 ml EDTA pH 8.0 και αραιώνεται με WFI μέχρι τελικού όγκου 100 ml.
2. Λαμβάνεται με βαμβακοφόρο στειλεό ικανοποιητική ποσότητα μικροοργανισμού από το τρυβλίο αμιγούς καλλιέργειας και δημιουργείται εναιώρημα 200 μl WFI.
3. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 13.400 rpm για 10 λεπτά
4. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
5. Προστίθενται σε κάθε ίζημα 2 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K και 100 μl λυτικού διαλύματος.
6. Γίνεται ανάδευση με χρήση vortex.
7. Επώαση δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 1 ώρα και κατόπιν στους 100°C για 10 λεπτά.
8. Φυγοκέντρωση του διαλύματος στις 13.400 rpm για 1 λεπτό.
9. Λήψη του υπερκείμενου και απόρριψη του ίζηματος.

6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

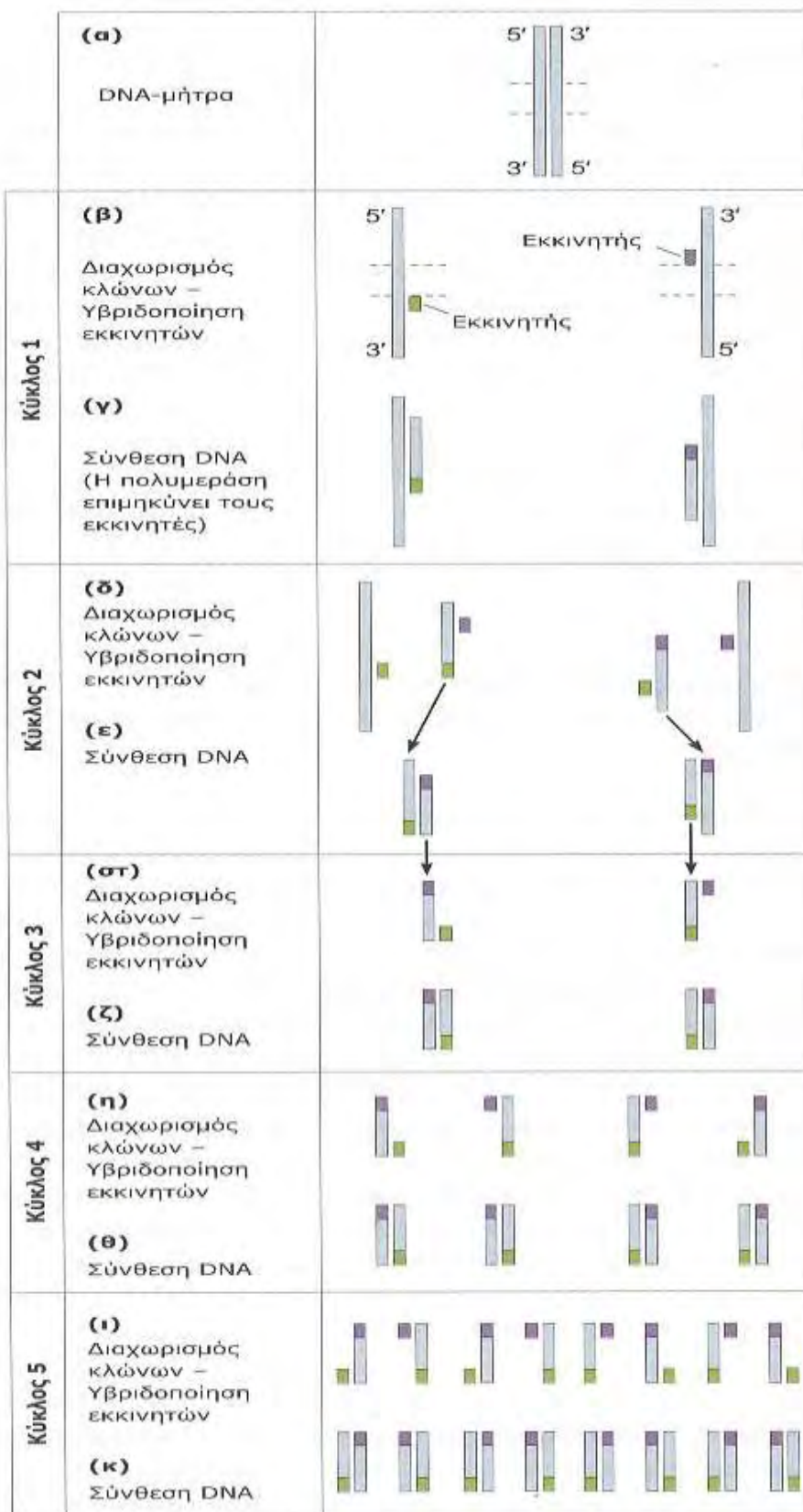
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στη κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA και παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικού *in vitro* πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA, η οποία ορίζεται από ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) για το 5' και το 3' άκρο, με τη δράση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράσης) (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988). Στο ρυθμιστικό διάλυμα για την τέλεση της PCR επιπλέον του DNA-στόχου, του ζεύγους των εκκινητών και της

θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης απαιτείται η παρουσία ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων καθώς και δισθενών ιόντων μαγνησίου για την βέλτιστη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης.

Στη στοιχειώδη μορφή της PCR κάθε κύκλος επιτελείται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου (denaturation), κατά την οποία επιτυγχάνεται μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95°C. Το δεύτερο στάδιο είναι ο υβριδισμός των εκκινητικών μορίων (annealing), όπου σε θερμοκρασία 50-65°C (ανάλογα με τη σύσταση σε γουανίνη και κυτοσίνη) επιτυγχάνεται η εναπόθεση τους στις συμπληρωματικές για αυτούς περιοχές του DNA-στόχου. Τέλος, το τρίτο στάδιο είναι η επέκταση (extension) των εκκινητών με τη προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο ιχνάριο του DNA (με κατεύθυνση 5' - 3') μέσω της ενζυμικής δράσης της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης σε θερμοκρασία 70-78 °C.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25 έως 40 κύκλους. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων να αυξάνεται εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο (Εικόνα 4). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια γεωμετρική συσσώρευση πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών-στόχων (2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων) αυξάνοντας κατά πολύ την ευαισθησία της τεχνικής

αυτής.



Εικόνα 4. Εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (Watson et al, 2007)

Υλικά:

Αντιδραστήρια:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Taq DNA πολυμεράση 5u/μl (Bioline)
- 10X Taq Buffer με KCl (Bioline)
- MgCl₂ 50mM (Bioline)
- Primer 1 100pmol/μl (Ανάδραση)
- Primer 2 100pmol/μl (Ανάδραση)
- dNTP Set 100mM (Invitrogen)

Μηχανήματα:

- Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler
- Vortex
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II

Πειραματική διαδικασία:

1. Η διαδικασία ξεκινάει με την παρασκευή του master mix. Σε φιαλίδια erppendorf αναμειγνύονται πολλαπλάσιες ποσότητες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες των αντιδραστηρίων: Taq DNA πολυμεράση, 10X Taq Buffer με KCl, MgCl₂ 25mM, Primer 1, Primer 2, μίγματος dNTPs και WFI (πίνακας 1).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
10X Taq Buffer (με KCl)	5 μl
MgCl ₂ 50mM	1,5 μl
dNTPs (20mM)	1 μl
Primer 1 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Primer 2 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,4 μl
WFI	36,1 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο ποσοτήτων αντιδραστηρίων για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

2. Αναμιγνύεται ήπια το master mix με τη χρήση vortex.
3. Μοιράζεται 45 μl από το master mix σε eppendorf.
4. Προστίθενται σε κάθε eppendorf 5 μl DNA από κάθε δείγμα.
5. Τα eppendorf τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή στο ακόλουθο πρόγραμμα (πίνακας 2).

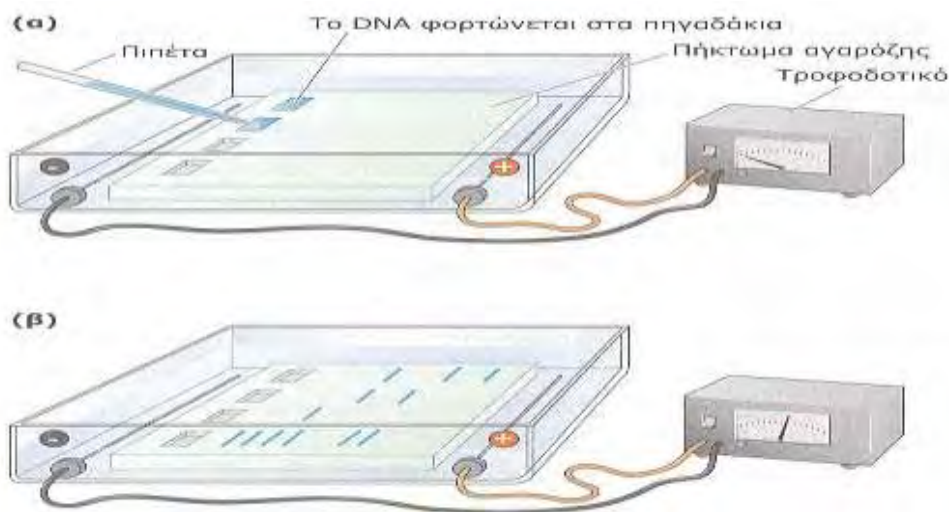
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	1 min	30
Υβριδισμός	55°C	1 min	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	1

Πίνακας 2. Πρόγραμμα MLST *s. aureus*.

7. Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση, η οποία γίνεται με τη χρήση τζελ αγαρόζης, είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για το διαχωρισμό και την αναγνώριση τμημάτων DNA. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Η τεχνική αυτή έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τα τμήματα DNA και να τα αναγκάζει να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (Εικόνα 5). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται υπό υπεριώδες φως με τη χρήση μικρής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.



Εικόνα 5. Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους μέσω ηλεκτροφόρησης

(Watson et al, 2007).

Στην εργασία μας χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR.

Υλικά:

Αντιδραστήρια:

- WFI (στείρο H₂O)
- TBE Buffer 10X
- SeaKem LE Agarose
- Ethidium bromide soln, 10 mg/ml

- 6X DNA Loading Dye Solution
- GeneRuler 100bp DNA Ladder

Μηχανήματα:

- Λάμπα UV
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάση
- Φούρνος μικροκυμάτων

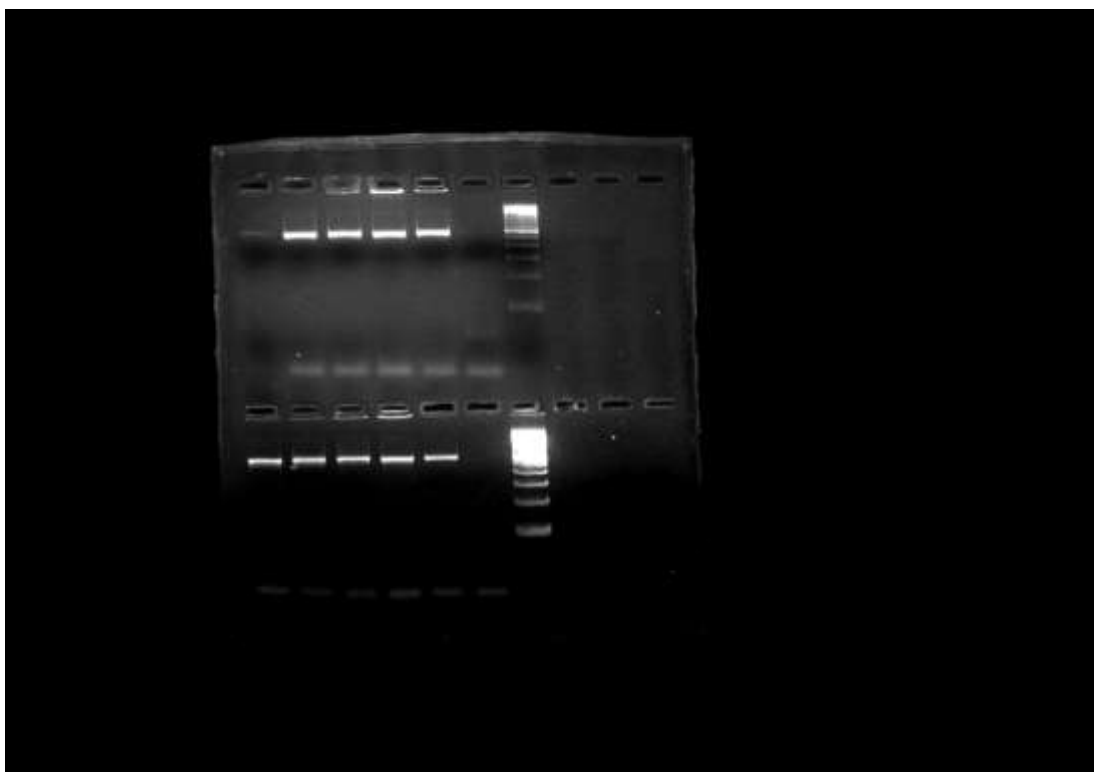
Άλλα υλικά:

- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Παραφίλμ

Πειραματική διαδικασία:

1. Για την παρασκευή TBE 1X, προστίθενται σε κωνική φιάλη 10 ml TBE 10X σε 90 ml WFI και αναμιγνύονται.
2. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 2g αγαρόζης και αναμιγνύεται.
3. Σε φούρνο μικροκυμάτων θερμαίνεται έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη (περίπου 4-5 λεπτά).
4. Σε τρεχούμενο νερό βρύσης βρέχουμε την κωνική φιάλη για να κατέβει η θερμοκρασία ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
5. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 5μL στο διάλυμα.
6. Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο και στη συνέχεια χύνεται σε αυτό προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
7. Αφού στερεοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια».
8. Εμβαπτίζεται το πήκτωμα αγαρόζης στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.

9. Αναμειγνύεται το δείγμα με μικρή ποσότητα χρωστικής και τοποθετείται στα πηγαδάκια του πήκτωματος. Ομοίως και ο μάρτυρας
10. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε σταθερή τάση 100V για 20 λεπτά.
11. Τοποθετείται το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (συσκευή UV λάμπας) και λαμβάνεται η απεικόνιση των ζωνώσεων μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ηλεκτοφόρηση (γονίδιο yqil).

8. Καθαρισμός Προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχησης τους έγινε με το PureLink PCR Purification Kit της Invitrogen, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Αντιδραστήρια:

- Binding Buffer (B2)
- Wash Buffer (W1)
- Elution Buffer : 10mM Tris-HCl, pH 8,5 (E1)
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 96-100%
- PureLink PCR στήλες φυγοκέντρωσης με σωλήνες συλλογής
- PureLink σωλήνες έκλουσης (1,7ml)

Μηχάνημα:

- Φυγόκεντρος Mini Spin (eppendorf)

Πειραματική διαδικασία:

1. Προστίθενται 10 ml ισοπροπανόλης 100% στα 15 ml Binding Buffer και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.
2. Προστίθενται 32 ml αιθανόλης 96-100% στα 8 ml Wash Buffer και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.
3. Προστίθενται τετραπλάσιος όγκος ανασυσταμένου με ισοπροπανόλη Binding Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR σε καθένα από τα δείγματα και αναμειγνύεται καλά.
4. Τοποθετείται έναστο από τα παραπάνω διαλύματα Binding Buffer-προϊόντος της PCR σε PureLink στήλη φυγοκέντρωσης.
5. Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 13.000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

6. Προστίθενται σε έκαστη στήλη 650 µl ανασυσταμένου με αιθανόλη Wash Buffer.
7. Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτά στις 13.000 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα.
8. Επαναφυγοκεντρείται έκαστη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις 13.500 rpm και απορρίπτεται το διήθημα ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer.
9. Απορρίπτονται οι σωλήνες συλλογής και έκαστη στήλη τοποθετείται σε σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7 ml).
10. Προσθέτονται 50 µl Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης.
11. Επωάζονται οι στήλες για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 14.500 rpm.
12. Το διήθημα (~50 µl) περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR, οπότε απορρίπτεται η στήλη.

9. Μοριακή ταυτοποίηση με ακολουθία *multilocus*

(*Multilocus Sequence Typing, MLST*)

Η MLST, που είναι η εξέλιξη της Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), χρησιμοποιεί μεγαλύτερο, και άρα πιο αντιπροσωπευτικό, τμήμα γενετικού υλικού από την MLEE. Ειδικότερα, η MLST συγκρίνει αλληλουχίες τμημάτων επτά ή περισσότερων γονιδίων του βασικού μεταβολισμού, που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη ενός είδους (Εικόνα 7). Στη συγκεκριμένη μελέτη τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *arc*, *arg*, *glp*, *gmk*, *pta*, *trp*, *ycjI* (Πίνακας 3). Τα γονίδια που παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά αλλήλια. ο συνδυασμός των αλληλίων που διαθέτει κάθε στέλεχος (απομονωμένο τμήμα-κομμάτι που μελετάμε) συνιστά το προφίλ αλληλίων του και το κατατάσσει σε ένα τύπο (sequence

type). Επειδή υπάρχουν πολλά πιθανά αλληλία για κάθε γενετικό τόπο, είναι απίθανο πανομοιότυπα προφίλ αλληλίων να έχουν προκύψει τυχαία. Έτσι, στελέχη με τα ίδια αλληλία θεωρούνται μέλη του ίδιου κλώνου. Ήδη υπάρχουν εκτεταμένες διεθνείς βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες από το διαδίκτυο για πολλούς μικροοργανισμούς (π.χ. <http://www.mlst.net>).

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα γονίδια των ενζύμων του βασικού μεταβολισμού που μελετά η MLST, απαρτίζουν το σταθερό τμήμα του γενετικού υλικού και παίζουν ταξινομητικό ρόλο, αλλά και ρόλο στην παρακολούθηση της μακροχρόνιας εξελικτικής πορείας των διαφόρων κλώνων των μικροοργανισμών στο χώρο και τον χρόνο. Έτσι τα όρια μεταξύ της επιδημιολογικής διερεύνησης της μελέτης της πληθυσμιακής δομής και της φυλογενετικής εξέλιξης του μικροβιακού είδους συγχέονται. Τονίζεται πάντως ξανά ότι επειδή οι μεταλλαγές στα ένζυμα του βασικού μεταβολισμού εμφανίζονται με σχετικά αργά χρονικά διαστήματα και δεν υφίστανται εξωτερικές πιέσεις επιλογής, η MLST παρακολουθεί την μακρόχρονη πορεία του μικροβιακού κλώνου, είναι συνεπώς κατάλληλη για μακροχρόνιες παρατηρήσεις ενώ γενικά δεν είναι κατάλληλη για την παρακολούθηση βραχύχρονων πχ ενδονοσοκομειακών επιδημικών επεισοδίων (http://www.nsph.gr/files/011_Ygeias_Paidiou/Epidimiologiki_epitirisi_mathimata/1_Rolos_Ergastiriu.pdf).

ΓΟΝΙΔΙΟ	ENZYMΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (aa)
arcC	carbamate kinase	456	942	313
aroE	Shikimate-5- dehydrogenase	456	807	268
glp	Glycerol kinase	465	1497	498
gmk	Guanylate kinase	429	624	207
pta	Phosphate acetyltransferase	474	987	328
tpi	Triosephosphate isomerase	402	762	252
yqiL	Acetyl-CoA acetyltransferase	516	1185	394

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ENZYMOY	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
arcC	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών, αμινοξέων (αργινίνης, προλίνης) και αζώτου
aroE	Αφυδρογονάση-οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός αμινοξέων κυρίως φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης
glp	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός λιπιδίων
gmk	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών
pta	Τρανσφεράση ακετυλομάδων	Μεταβολισμός υδατανθράκων και πυροσταφυλικού οξέος
tpi	Ισομεράση	Γλυκόλυση και γλυκοωεογένεση (μεταβολισμός φρουκτόζης και μαννόζης)
yqiL	Τρανσφεράση ακετυλομάδων	Μεταβολισμός λιπιδίων, αμινοξέων

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για *S. aureus*.

- arcC: το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της καρβαμικής κινάσης. Πρόκειται για μια ATP καρβαμική φωσφοτρανσφεράση η οποία καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδος, με χρήση ενέργειας από την μετατροπή ATP σε ADP, σύμφωνα με την αντίδραση: $ATP + (NH_3 + CO_2)$ (καρβαμικό οξύ) \Leftrightarrow ADP + φωσφορικό καρβαμώλιο. Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιείται στον μεταβολισμό των πουρινών, της αργινίνης, της προλίνης καθώς και στο μεταβολισμό του αζώτου.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου arc

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχτηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

arc up: 5' - TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC – 3'

arcC dn: 5' - AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται παρακάτω

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5	1
Μετουσίωση	94	1	30
Υβριδισμός	55	1	30
Επιμήκυνση	72	1	30
Τελική επιμήκυνση	72	10	1

- *asoE*: γονίδιο που κωδικοποιεί για μια αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του NADP⁺ ως δείκτη πρωτονίων.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *aroE*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχτηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

aroE up: 5' - ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC – 3'

aroE dn: 5' - GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC – 3'

- *glp*: γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφοτρανσφεράση ή κινάση της γλυκερόλης. Πρόκειται για ένζυμο μεταβολισμού των λιπιδίων και η αντίδραση που καταλύει πραγματοποιείται με προσφορά ενέργειας από τη διάσπαση του ATP.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *glp*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχτηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Glp up: 5' - CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C – 3'

Glp dn: 5' - TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC – 3'

- gmk: ή ATP-φωσφοτρανσφεράση, γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο κινάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης και καταλυεί την μεταφορά φωσφορικών ομάδων της μεταβολικής οδού των πουρινών και ειδικά των νουκλεοτιδίων. Με προσφορά ενέργειας από το ATP.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου gmk

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχτηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Gmk up: 5' - ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC – 3'

Gmk dn: 5' - TCA TTA ACT ACA TAA TCG TA – 3'

- pta: το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφο-τρανσακετυλάση που καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων και ακετυλομάδων κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αμφίδρομη αντίδραση καταλύεται πάνω σε υπόστρωμα ακετυλο-CoA.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου pta

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχτηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Pta up: 5' - GTT AAA ATC GTA CCT GAA GG – 3'

Pta dn: 5' - GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA – 3'

- triA: πρόκειται για γονίδιο που κωδικοποιεί για ένζυμο με δράση αναγωγάσης του υποστρώματος της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης και προϊόν την φωσφογλυκερόνη. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει το ένζυμο είναι οι οδοί της γλυκόλυσης και νεογλυκογένεσης. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη: 3-φωσφο-D-γλυκεραλδεύδη ⇌ φωσφογλυκερόνη.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου triA

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Tri up: 5'- TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA – 3'

Tri dn: 5'- TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC – 3'

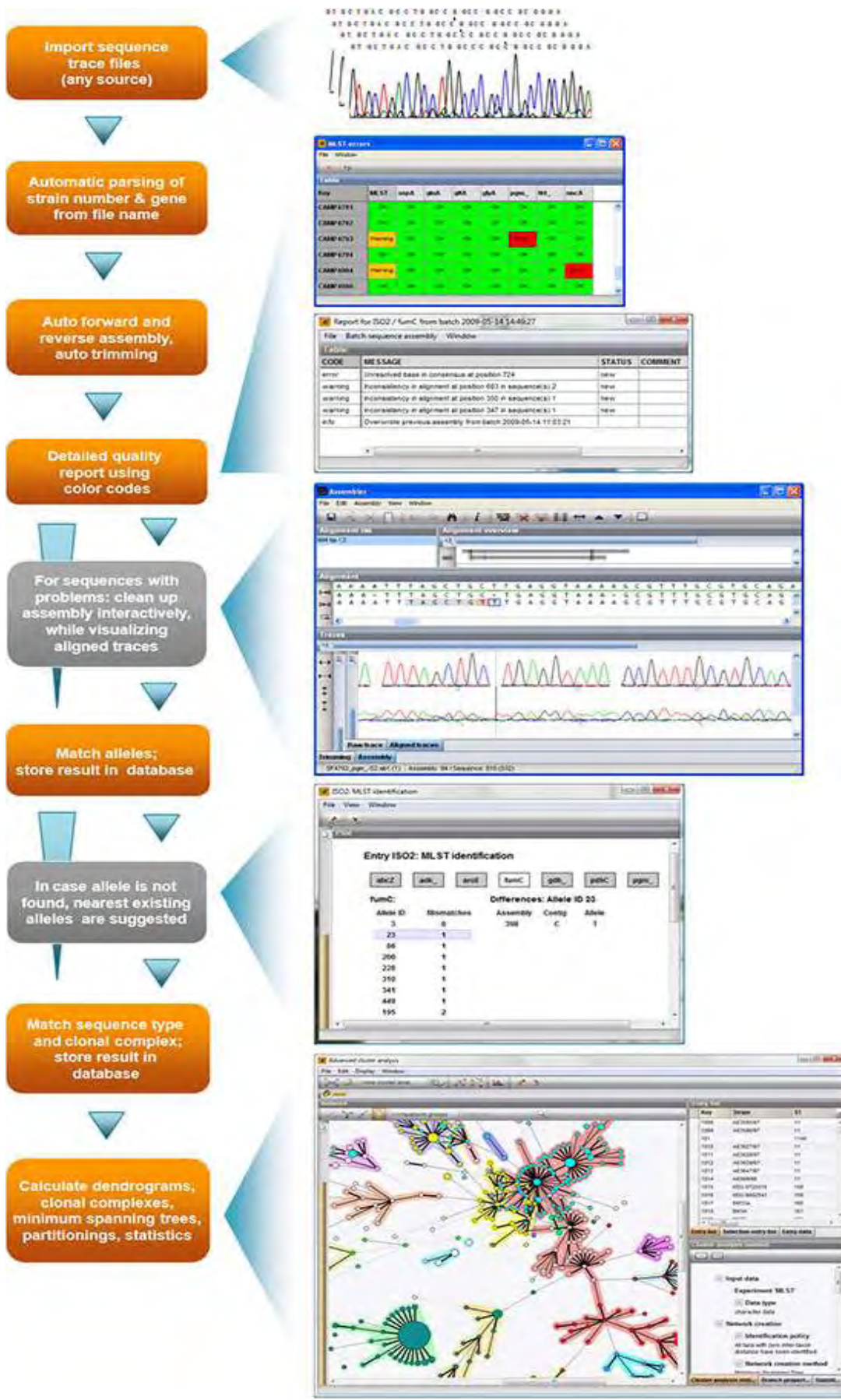
- yqiL: το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένζυμο μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμο A. οι μεταβολικές οδοί στις οποίες δρα το συγκεκριμένο ένζυμο είναι κατά τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κατά την σύνθεση και αποδόμηση των κετονικών σωμάτων καθώς και αμινοξέων όπως βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης κ.α.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου yqiL

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

yqiL up: 5'- CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC – 3'

yqiL: 5'- CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC – 3'



Εικόνα 7. Στάδια τεχνικής MLST

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη αποτελείται από 120 στελέχη *S. aureus* ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη (MRSA) που απομονώθηκαν από τα πρώτα δέκα κλινικά δείγματα κάθε μήνα κατά το έτος 2012, στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα στελέχη που αναλύθηκαν προέρχονταν από κλινικά δείγματα όπως ωτικό έκκριμα, οφθαλμικό έκκριμα, πύο, δερματική βλάβη, αίμα, ιστός, τραύμα, βρογχικές εκκρίσεις, ούρα καθώς και ρινικό επίχρισμα, που συλλέχθηκαν από ασθενείς του νοσοκομείου από τις διάφορες κλινικές (ογκολογική, δερματολογική, ορθοπαιδική, παιδιατρική, αγγειοχειρουργική, μονάδα εντατικής θεραπείας, οφθαλμολογική, ωτορινολαρυγγολογική).

Αρχικά τα στελέχη που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά και ακολούθησε μικροσκοπική εξέταση με τη βοήθεια της χρώσης Gram, για να προσδιορίσουμε αν τα στελέχη μας είναι Gram θετικά (αναλυτικότερα οι τεχνικές-δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρθηκαν παραπάνω στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι). Αφού έγινε αυτή η αξιολόγηση συνεχίσαμε με τη δοκιμή παραγωγής καταλάσης και κοαγκουλάσης για να γίνει ο διαχωρισμός από του αρνητικούς στην καταλάση και στην κοαγκουλάση σταφυλοκόκκους.

Αφού έγινε η ταυτοποίηση με τη βοήθεια της δοκιμής της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και της δοκιμής της ευαισθησίας στη μεθικιλίνη, επιλέχθηκαν τα πρώτα δέκα στελέχη MRSA ανά μήνα.

Το επόμενο βήμα στη μελέτη μας ήταν η απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA extraction) των στελεχών που συλλέξαμε και προχωρήσαμε στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), σε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και τέλος ακολούθησε η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών με τη μέθοδο της MLST (Multilocus Sequence Typing).

Με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών καταλήξαμε στα εξής αποτελέσματα:

Οι ST κλώνοι που εντοπίστηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- **ST80**
- **ST225**
- **ST239**

Φαινότυπος:

ST225:

AM^R,AZ^R,PG^R,CF^R,CT^R,CR^R,XM^R,CH^R,CM^R,EM^R,FU^R,IP^R,LE^R,OX^R,TM^R,TX^R

ST80:

AM^R,PG^R,CT^R,CF^R,TX^R,XM^R,IP^R,OX^R,TC^R

ST239:

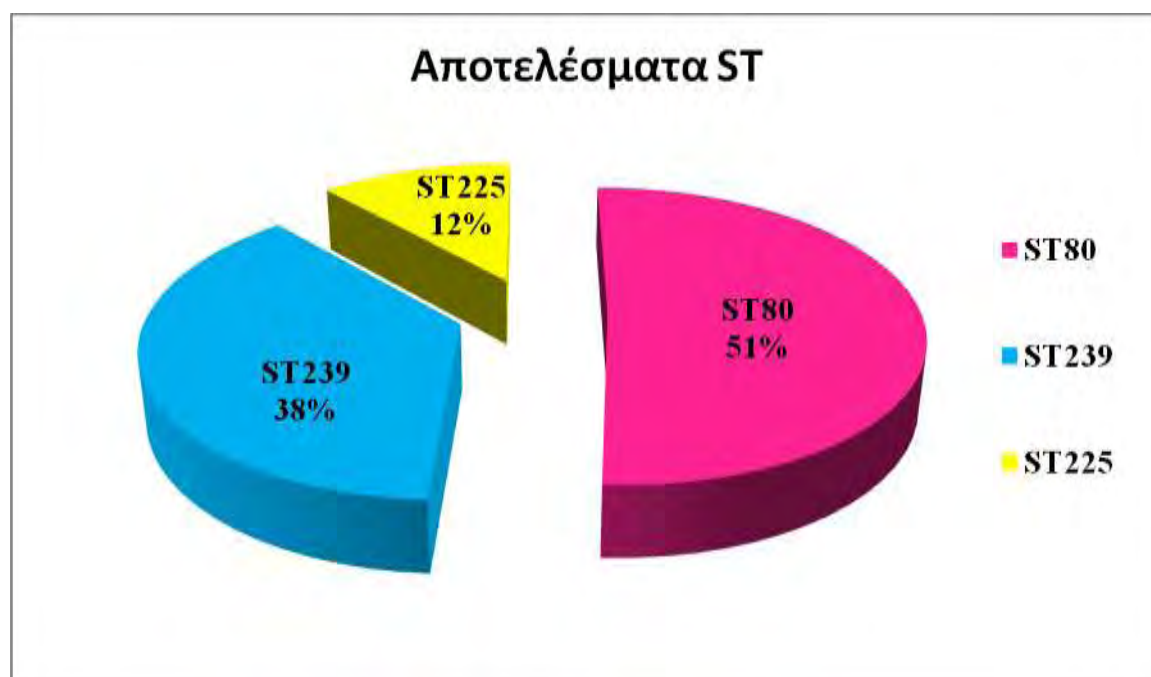
AM^R,AZ^R,PG^R,CF^R,CT^R,CR^R,XM^R,CH^R,CM^R,EM^R,FU^R,IP^R,OX^R,TM^R

Από τα 120 στελέχη του 2012 που απομονώθηκαν για τη μελέτη μας τα 61 στελέχη ανήκουν στον ST80, τα 45 στον ST239 και τέλος τα 14 μόνο στον ST225.

Κάθε στέλεχος, ανεξάρτητα από τον ST τύπο του, μπορεί να προέρχεται από οποιαδήποτε κλινική του νοσοκομείου.

Ο ST80 όμως, παρουσιάζει αρκετά μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στην ορθοπαιδική κλινική καθώς και στη δερματολογική κλινική (κυρίως ιστός, τραύμα, πύο). Τους άλλους δύο τύπους, ST225 και ST239, μπορούμε να τους συναντήσουμε σε περισσότερες κλινικές αλλά με πολύ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης όπως δείχνουν και τα ακόλουθα αποτελέσματα της μελέτης μας (Εικόνα 8).

Με βάση το αντιβιογράμμα φαίνεται ότι και οι τρεις τύποι είναι ευαίσθητοι (sensitive) στη βανκομυκίνη, στη λινεζολίδη, στη μουπιροσίνη, στην τιγκεκυκλίνη, στην τεικοπλανίνη καθώς και στη ριφαμπικίνη.



Εικόνα 8. Αποτελέσματα ST.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συχνότητα εμφάνισης MRSA όπως έχει ήδη προαναφερθεί στην Ελλάδα είναι αυξημένη. Στην Ελλάδα οι κυρίαρχοι κλώνοι είναι οι ST80, ο ST30 (ο οποίος θεωρείται πλέον ως MSSA) και ο ST239. Ο ST239 έχει χαρακτηριστεί ως HA-MRSA λόγω του ότι σχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις ενώ ο ST80 σχετίζεται με λοιμώξεις κοινότητας. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι από το 1999 άρχισε να αναζητείται το ποσοστό των MRSA στελεχών στην περιοχή της Θεσσαλίας από στελέχη που καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο Βιοπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας αλλά και στα υπόλοιπα Νομαρχιακά Γενικά Νοσοκομεία της περιοχής και συσχετίστηκε η ποσοστιαία παρουσία του ειδικού γονιδίου *mecA* με την ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά (Petinaki et al 2001). Διαπιστώθηκε ότι από τα στελέχη του χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου που καλλιεργήθηκαν το 45% αυτών ήταν MRSA και μόνο το 12% MSSA. Η ταυτοποίηση των στελεχών έδειξε ότι η μεγάλη πλειοψηφία των στελεχών ανήκε στον κλώνο ST80 που ευρύτερα συναντάται στην Ελλάδα και την υπόλοιπη Ευρώπη (Petinaki et al 2003).

Ο κλώνος ST80 εμφανίζεται με ποσοστό 51%, ο οποίος όπως αναφέρθηκε και παραπάνω χαρακτηρίζεται ως κλώνος ο οποίος συσχετίζεται με λοιμώξεις της κοινότητας. Ακολουθεί ο ST239 με ποσοστό εμφάνισης 37%, είναι ένας κλώνος επίσης γνωστός στην περιοχή της Θεσσαλίας από το παρελθόν. Τέλος, το ενδιαφέρον εστιάζεται στον κλώνο ST225 με ποσοστό εμφάνισης μόλις 12%. Μόνο δεκατέσσερα στελέχη από αυτά που μελετήθηκαν ανήκουν στο ST225. Νέα αντιβιοτικά στα οποία δεν έχει ακόμη αναπτύξει ανοχή ο MRSA είναι: Linezolid, Daptomycin, Tigecycline.

Οι ειδικοί έχουν προ πολλού κρούσει τον κώδωνα του κινδύνου: Η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών πιθανόν να οδηγήσει σε θανάτους χιλιάδων ανθρώπων από μολύνσεις με μικρόβια που δεν θα είναι πλέον ευάλωτα στις θεραπείες που διαθέτουμε σήμερα. Μάλιστα ορισμένοι προχωρούν στο να πουν ότι σε 12 περίπου χρόνια τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που έχουμε σήμερα θα είναι άχρηστα διότι τα βακτηρίδια θα αναπτύξουν μηχανισμούς αντίστασης σε αυτά. Παρομοιάζουν μάλιστα το επερχόμενο σοβαρό πρόβλημα με αυτό της επιδημίας του AIDS. Η περίπτωση του MRSA είναι ένα παράδειγμα που δείχνει την έκταση του επερχόμενου κινδύνου. Ο σταφυλόκοκκος αυτός είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος λόγω της ανθεκτικότητας που αναπτύσσει στα αντιβιοτικά.

Μέσα σε νοσοκομεία παντού στον κόσμο, έχουν αναπτυχθεί MRSA. Τα στελέχη που απόκτησαν την ανθεκτικότητα φαίνεται ότι έχουν δημιουργήσει γονίδια που τους επιτρέπουν να αντιστέκονται σε ισχυρά αντιβιοτικά. Τα γονίδια αυτά μεταφέρονται μεταξύ των βακτηριδίων και παράλληλα με μεταλλάξεις ορισμένα στελέχη αποκτούν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τα αντιβιοτικά. Εκείνο που ανησυχεί ιδιαίτερα γιατρούς και επιστήμονες είναι ότι έχουν εμφανιστεί και πληθύνονται τα στελέχη του MRSA που εμφανίζουν αντοχή όχι μόνο στη μεθικιλίνη αλλά και στη βανκομυκίνη που μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι μπορούσε να εξουδετερώνει όλους τύπους του σταφυλόκοκκου. Πρέπει να τονίσουμε ότι το μικρόβιο του σταφυλόκοκκου περιλαμβάνει το λευκό σταφυλόκοκκο και το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Πρόκειται για κοινά βακτηρίδια που μπορεί φυσιολογικά να βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα. Έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν μολύνσεις σε υγιείς ανθρώπους οι οποίες αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά εάν δεν υπάρχουν προβλήματα αντίστασης. Όμως οι μολύνσεις με το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο αποκτούν ιδιαίτερη σοβαρότητα όταν αυτός έχει ανθεκτικό χαρακτήρα (MRSA). Το πρόβλημα των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (HA-MRSA) απειλεί ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία, κλινικές και ακόμη σε γηροκομεία. Οι ασθενείς με μειωμένη άμυνα του οργανισμού όπως οι καρκινοπαθείς, οι λευχαιμικοί, οι ηλικιωμένοι οι ασθενείς με AIDS, τα παιδιά, οι ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Αλτσχάιμερ, οι χειρουργημένοι, κινδυνεύουν περισσότερο από τον MRSA όταν νοσηλεύονται σε νοσοκομειακά ιδρύματα. Οι συνθήκες που επικρατούν μέσα στα νοσοκομεία ευνοούν την ανάπτυξη και μετάδοση του MRSA.

Οι λοιμώξεις ασθενών από MRSA είναι δύσκολες να θεραπευτούν. Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δυστυχώς πεθαίνει. Παράλληλα τα περιστατικά μόλυνσης ασθενών μέσα στα νοσοκομεία με MRSA αυξάνονται.

Τα μέτρα πρόληψης είναι κυρίως το πλύσιμο των χεριών πριν και μετά από την εξέταση ή οποιαδήποτε επαφή με ένα ασθενή. Η χορήγηση των αντιβιοτικών πρέπει να γίνεται με αυστηρά κριτήρια και μόνο όταν ο ασθενής έχει λοίμωξη με βακτηριακό παράγοντα. Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη βακτηριακών πολυανθεκτικών στελεχών. Μέσα στα νοσοκομεία πρέπει να λειτουργούν επιτροπές ελέγχου των λοιμώξεων για να εντοπίζονται έγκαιρα περιπτώσεις ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Επίσης μπορούν να παρακολουθούν και να καθοδηγούν το προσωπικό για θέματα καθαριότητας, αντισηψίας και αντιβίωσης.

Το προσωπικό του νοσοκομείου που έρχεται σε επαφή με τους ασθενείς θα πρέπει να διατηρεί πολύ υψηλά πρότυπα υγιεινής και να προσέχει ιδιαίτερα κατά τη θεραπεία ασθενών με MRSA. Το προσωπικό θα πρέπει να πλένει καλά τα χέρια του και να τα στεγνώνει πριν και μετά την φροντίδα κάθε ασθενούς, καθώς και πριν και μετά την επαφή με οποιαδήποτε δυνητικά μολυσμένο εξοπλισμό όπως κρεβάτια κ.α.

Τα χέρια μπορούν να πλυθούν με σαπούνι και νερό ή αν δεν είναι εμφανώς λερωμένα, με ένα ταχείας δράσης αντισηπτικό διάλυμα ή με τζελ χεριών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γάντια μιας χρήσεως από το προσωπικό σε κάθε του επαφή με ασθενή όπως για παράδειγμα κατά την αλλαγή επιδέσμων, κ.α.

Το νοσοκομειακό περιβάλλον, όπως πατώματα, τουαλέτες και κρεβάτια, θα πρέπει να διατηρούνται καθαρά. Οι ασθενείς με MRSA ή αν υπάρχουν υπόνοιες ότι έχουν προσβληθεί από MRSA θα πρέπει να απομονώνονται. Εκτός νοσοκομείου ως μέτρα πρόληψης είναι το τακτικό πλύσιμο των χεριών, καθαρά και κοντά νύχια, να μην μοιραζόμαστε όλα τα προϊόντα που έρχονται σε επαφή με το δέρμα, όπως σαπούνια, λοσιόν, κρέμες και καλλυντικά. Δεν θα πρέπει να μοιραζόμαστε άπλυτες πετσέτες ή άλλα προσωπικά αντικείμενα όπως ξυραφάκια, λίμες, χτένες ή βούρτσες (<http://www.nhs.uk/Conditions/MRSA/Pages/Prevention.aspx>)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderegg T., Sader H., Fritsche T., Ross J., Jones R. (2005) “Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program” *Int J Antimicrob Agents*.

Chen S., Wang J., Chen T., Lai M., Chie W., Chien K. (2010) “Impact of traditional hospital strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and community strain of MRSA on mortality in patients with community-onset *S. aureus* bacteremia” *Medicine (Baltimore)*.

Deurenberg R., Vink C., Kalenic S., Friedrich A., Bruggeman C., Stobberingh E. (2007) “The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” *Clin Microbiol Infect*.

Deurenberg R., Stobberingh E. (2009) “The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” *Curr Mol Med*.

Dinges M., Orwin P., Schlievert P. (2000) “Exotoxins of *Staphylococcus aureus*” *Clin Microbiol Reviews*.

Drougka E., Foka A., Marangos M., Liakopoulos A., Makatsoris T., Anastassiou E., Petinaki E., Spiliopoulou I. (2012) “The first case of *Staphylococcus aureus* ST398 causing bacteremia in an immunocompromised patient in Greece” *Indian Journal of Medical Microbiology*.

Elston J., Barlow G. (2009) “Community-associated MRSA in the United Kingdom” *J. Infect*.

Enright M., Robinson D., Randle G., Feil E., Grundmann H., Spratt B. (2002) “The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)” *Proc Natl Acad USA*.

Grundmann H., Aires-de-Sousa M., boyce J., Tiemersma E. (2006) “Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat” *Lancet*.

Han J., Edelstein P., Warren B., Lautenbach E. (2012) “The effect of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type on clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia” *Journal of Infection*.

Jevon M. (1961) “Celbenin-resistant staphylococci” *Br Med*.

Johnson W., Tyler., Ewan E., Ashton F., Pollard D., Rozee K. (1991) “Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction” *J Clin Microbiol*.

Jones R., Ross J., Fritsche T., Sader H. (2006) “Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nation” *J Antimicrob Chemother*.

Katopodis G., Grivea I., Tsantsaridou A., Pournaras S., Petinaki E., Syrogiannopoulos S. (2010) “Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece” *BMC Infectious Diseases*.

Lowy F. (1998) “*Staphylococcus aureus*” *N Engl J Med*.

Maree C., Daum R., Boyle-Vavra S., Matayoshi K., Miller L. (2008) “Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections” *Emerg Infect Dis*.

McDonald L. (2006) “Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment” *Clin Infetct Dis*.

Menegotto F., Gonzalez-Cabrero S., Cudero A., Cuervo W., Munoz M., Gutierrez M., Simarro M., Bratos A., Orduna A. (2012) “Clonal nature and diversity of resistance, toxins and adhesions genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* collected in a Spanish hospital” *Infection, Genetics and Evolution*.

Moreillon P. (2008) “New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting” *Clin Microbiol Infect*.

Mullis k., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) “Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction” *Department of Human Genetics*.

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*.

Naimi T., LeDell K., Como-Sabetti K., Borchardt S., Boxrud D., Etienne J. (2003) “Comparision of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection” *JAMA*.

Petinaki E., Kontos F., Miriagou V., Maniati M., Hatzi F., Maniatis A. (2001) “Survey of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the hospitals of central Greece” *Int J Antimicrob Agents*.

Petinaki E., Kontos F., Pratti A., Skulakis C., Maniatis A. (2003) “Clinical isolates of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece” *Int J Antimicrob Agents*.

Petinaki E., Kanellopoulou M., Damani A., Foka A., Spiliopoulou I., Skalmoutsou N., Raitsiou B., Valakis K., Papafragas E. (2009) “Linezolid-Resistant *Staphylococcus cohnii*, Greece” *Emerging Infectious Diseases*.

Petinaki E., Malizos K. (2007) “The Bacterial Ecosystem of the Upper Extremity” *Infections of the Hand and Upper Limp*.

Pfaller M., Herwaldt L. (1988) “Laboratory, Clinical and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci” *Clin Microbiol Rev.*

Popovich K., Weinstein R., Hota B. (2008) “Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains?” *Clin Infect Dis.*

Rybak M., Akins R. (2001) “Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptides resistance: clinical significance and treatment options” *Drugs.*

Saiki R., Mullis K., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Erlich H. (1988) “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase” *Department of Human Genetics.*

Schleifer K. (1984) “Family I. Micrococcaceae” *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2, Williams and Wilkins.*

Song J., Hsueh P., Chung D., Ko K., Kang C., Peck K. (2011) “Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asia countries: an ANSOROP study” *J Antimicrob Chemother.*

Stefani S., Chung D., Lindsay J., Friedrich A., Kearns M., Westh H., MacKenzie F. (2012) “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods” *International Journal of Antimicrobial Agents.*

Tsironi E., Zacharaki F., Grivea I., Tachmitzi S., Michoula A., Vlychou M., Petinaki E., Syrogiannopoulos G. (2012) “European ST80 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orbital cellulitis in a neonate” *BMC Ophthalmology.*

Vandenesch F., Naimi T., Enright M., Lina G., Nimmo G., Heffernan H., Liassine N., Bes M. (2003) “Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: world-wide emergence” *Emerg Infect Dis.*

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

http://www.nsph.gr/files/011_Ygeias_Paidiou/Epidimiologiki_epitirisi_mathimata/1_Rolos_Ergastiriu.pdf

<http://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/25887> (Karapsias 2008)

<http://www.nhs.uk/Conditions/MRSA/Pages/Prevention.aspx>