



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Μοριακή τυποποίηση στελεχών *Staphylococcus aureus* από
δερματικές λοιμώξεις στην Κεντρική Ελλάδα.**

Στυλιανή Μαστραφτσή

Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- **Ευθυμία Πετεινάκη**, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
- **Αναστάσιος Γερμενής**, Καθηγητής Ανοσολογίας
- **Ματθαίος Σπελέτας**, Αναπλ. Καθηγητής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική.

Λάρισα, Μάρτιος, 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

TITLE: Molecular identification of *Staphylococcus aureus* skin infections in Central Greece.

By

Styliani Mastrafsi

Three-member examining committee:

- **Efthymia Petinaki**, Associate Professor of Microbiology, Supervisor Professor
- **Anastasios Germenis**, Professor of Immunology
- **Matthaios Speletas**, Associate Professor of Immunology

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

Larissa, March, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	6
Περίληψη.....	8
Abstract.....	10
Εισαγωγή.....	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Το γένος των σταφυλόκοκκων (<i>Staphylococcus</i>).....	15
2. <i>Staphylococcus aureus</i> (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)	
2.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	16
2.2. Κυτταρική δομή.....	17
2.3. Γονιδίωμα.....	19
2.3.1. Βασικό γονιδίωμα (core genome).....	19
2.3.2. Βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome).....	20
2.4. Παθογένεια.....	20
2.4.1. Παράγοντες της επιφάνειας του κυττάρου.....	21
2.4.1.1. Δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος.....	21
2.4.1.2. Πρωτεΐνες επιφανείας.....	22
2.4.1.3. Εκκρινόμενες προσκολλητίνες.....	23
2.4.1.4. Πολυσακχαρίτες της επιφάνειας του κυττάρου.....	23
2.4.2. Εξωκυττάριοι λοιμογόνιοι παράγοντες (Τοξίνες και Ένζυμα).....	24
2.4.2.1. Κυτταροτοξίνες.....	24
2.4.2.2. Αποφολιωτικές / Επιδερμολυτικές τοξίνες.....	27
2.4.2.3. Τοξίνες της οικογένειας των υπεραντιγόνων.....	27
2.4.2.4. Εξωκυττάρια ένζυμα.....	30
2.4.3. Σχηματισμός Βιομεμβράνης (Biofilm).....	32
2.5. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των λοιμογόνων παραγόντων του <i>S. aureus</i>	33
2.6. Αποικισμός από <i>S. aureus</i> – Μετάδοση.....	34
2.7. Λοιμώξεις από <i>S. aureus</i>	35
2.7.1. Δερματικές λοιμώξεις	
2.7.1.1. Μολυσματικό κηρίο.....	37
2.7.1.2. Θυλακίτιδα.....	39
2.7.1.3. Δοθιήνας – Ψευδάνθρακας.....	40
2.7.1.4. Σταφυλοκοκκικά αποστήματα.....	41

2.7.1.5. Ερυσίπελας – Κυτταρίτιδα από <i>S. aureus</i>	41
2.7.1.6. Κριθή – Παρωνυχία.....	42
2.7.1.7. Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο.....	42
2.7.2. Εν τω βάθει λοιμώξεις.....	44
2.7.2.1. Ενδοκαρδίτιδα.....	44
2.7.2.2. Πνευμονία.....	44
2.7.2.3. Οστεομυελίτιδα – Σηπτική αρθρίτιδα.....	45
2.8. Αντοχή στα αντιβιοτικά.....	46
2.8.1. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	46
2.8.2. Αντοχή του <i>S. aureus</i> στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	47
2.8.2.1. Αντοχή του <i>S. aureus</i> στην Πενικιλίνη.....	47
2.8.2.2. Αντοχή του <i>S. aureus</i> στη Μεθικιλίνη – Στελέχη MRSA – Σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>).....	48
2.9. Νοσοκομειακός MRSA (HA-MRSA).....	52
2.10. MRSA της κοινότητας (CA-MRSA).....	54
2.11. Μέθοδοι βακτηριακής τυποποίησης του <i>S. aureus</i>	58
2.11.1. PFGE.....	59
2.11.2. MLST (Multi Locus Sequence Typing).....	60
2.11.3. Μέθοδος <i>spa</i>	61
2.11.4. Τυποποίηση με βάση τις κασέτες SCC <i>mec</i>	61

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Σχεδιασμός της μελέτης – Συλλογή των βακτηριακών στελεχών.....	64
3.2. Χαρακτηρισμός Φαινότυπου	
3.2.1. Ταυτοποίηση στελεχών σε επίπεδο Γένους και Είδους.....	65
3.2.1.1. Δοκιμασία χρώσης κατά Gram.....	65
3.2.1.2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης.....	66
3.2.1.3. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης (κοαγκουλάσης).....	67
3.3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με το σύστημα Vitek-2.....	68
3.4. Χαρακτηρισμός Γονότυπου – Μοριακές μέθοδοι	
3.4.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction).....	69
3.4.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	70
3.4.2.1. Βασικές αρχές της μεθόδου.....	70
3.4.2.2. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου PCR.....	73
3.4.2.3. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου PCR.....	74

3.4.3. Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων τοξινών.....	75
3.4.4. Μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο MLST.....	78
3.4.4.1. Γενικά.....	78
3.4.4.2. Ενίσχυση των γονιδίων της MLST με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στα υπό μελέτη στελέχη <i>S. aureus</i>	79
3.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR.....	84
3.6. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	86
3.7. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων της MLST (Sequencing).....	88
4. Αποτελέσματα	
4.1. Συλλογή στελεχών – Πληθυσμός της μελέτης.....	90
4.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά – Χαρακτηρισμός στελεχών.....	90
4.3. Μοριακή τυποποίηση – Γονοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών.....	91
5. Συζήτηση – Συμπεράσματα	96
Πηγές – Βιβλιογραφία	102

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο *S. aureus*, αν και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων, αποτελεί παράλληλα και κύριο παθογόνο μικροοργανισμό για τον άνθρωπο, προκαλώντας, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα, ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (Skin and Soft Tissue Infections, SSTIs). Ο *S. aureus* αποτελεί αντικείμενο εντατικής επιστημονικής μελέτης, καθώς πρόκειται για εξαιρετικά ευέλικτο παθογόνο, το οποίο εξελίσσεται διαρκώς, εμφανίζοντας νέες ιδιότητες που σχετίζονται με την αύξηση της λοιμογόνου ικανότητας και της αντοχής του στα αντιβιοτικά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μοριακή τυποποίηση στελεχών *S. aureus*, που απομονώθηκαν από ασθενείς με δερματικές λοιμώξεις στην Κεντρική Ελλάδα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για την εκπόνηση αυτής της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, τη διαμόρφωση και ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κα Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική της καθοδήγηση, τη μεγάλη υποστήριξη, τις πολύτιμες υποδείξεις, συμβουλές και επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς και για τη συνολικά άψογη και αποδοτική συνεργασία μας, κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, Καθηγητή Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, για τη σπουδαία δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, καθώς και για τις σημαντικές επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου σε αυτό.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ματθαίο Σπελέτα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος με τίμησε με τη συμμετοχή του στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, καθώς και για τις εξίσου πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης του εκπαιδευτικού μου προγράμματος.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω το ερευνητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για το κλίμα σύμπνοιας και αλληλοβοήθειας που επικράτησε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας και

ειδικά την ιατρό Βιοπαθολόγο κα Στυλιανή Σάρρου για τη μεγάλη προθυμία, τις πολύτιμες συμβουλές, τη σημαντική της βοήθεια και την άριστη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *S. aureus* της κοινότητας έχει κατά κύριο λόγο χαρακτηριστεί σε παγκόσμιο επίπεδο ως η πιο κοινή αιτία λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων (SSTIs), επιδεικνύοντας ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες στα περισσότερα μέρη του κόσμου, καθώς και στην Ελλάδα, έχει προκληθεί σημαντική ανησυχία από την αυξανόμενη εμφάνιση και εξάπλωση των CA-MRSA στελεχών, τα οποία σχετίζονται με εξάρσεις ή μικροεπιδημίες, αλλά και με σποραδικά κρούσματα δερματικών λοιμώξεων. Η εμφάνιση και η ραγδαία εξάπλωση παθογόνων κλώνων της κοινότητας, τόσο MRSA όσο και MSSA, οι οποίοι εκφράζουν διάφορους λοιμογόνους παράγοντες, αποτελούν επιπρόσθετη αιτία σοβαρής ανησυχίας για τη δημόσια υγεία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο του πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας DNA (MLST) σε στελέχη *S. aureus*, MRSA και MSSA, προκειμένου να γίνει σύγκριση των κλώνων της περιοχής μας με εκείνους που επικρατούν σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, της Ευρώπης ή παγκόσμια. Όλα τα στελέχη *S. aureus* απομονώθηκαν από ασθενείς με διάφορες μολυσματικές βλάβες του δέρματος συμπεριλαμβανομένων δοθιήνων, ψευδάνθρακα, μολυσματικού κηρίου, θυλακίτιδας και επιφανειακών δευτερογενών επιμολύνσεων δερματικών βλαβών σχετικών με χρόνιες δερματοπάθειες, στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, στην Κεντρική Ελλάδα, κατά τη διάρκεια μίας χρονικής περιόδου 4 μηνών, από τον Οκτώβριο του 2013 έως τον Ιανουάριο του 2014. Η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν την PVL και την TSST-1, οι οποίες είναι δύο εξωτοξίνες που έχει παρατηρηθεί ότι συνδέονται σταθερά με λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, ανιχνεύθηκαν επίσης μέσω της ενίσχυσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Από τα 41 στελέχη *S. aureus* που περιελήφθησαν στην παρούσα μελέτη, 9 (22%) ταξινομήθηκαν ως MRSA και 32 (78%) ως MSSA, μέσω της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά κεφοξιτίνη και οξακιλλίνη. Η συντριπτική πλειοψηφία (92.7%) των στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα πληρούσαν τα επιδημιολογικά κριτήρια του CDC για στελέχη της κοινότητας, με εξαίρεση 3 (7.3%) MRSA στελεχών που απομονώθηκαν, τα οποία ορίστηκαν ως νοσοκομειακά και επιπλέον τυποποιήθηκαν μοριακά ως ST225. Όλα τα CA-MRSA στελέχη αποδόθηκαν στον ST80 και βρέθηκαν όλα να είναι PVL-θετικά. Στην Ευρώπη, όπως και στην Ελλάδα, ο Ευρωπαϊκός ST80 λοιμογόνος κλώνος, που παράγει PVL, κυριαρχεί στα CA-MRSA στελέχη και αναφέρεται ως ένα ολόένα και περισσότερο σύνηθες αίτιο των δερματικών λοιμώξεων στην κοινότητα. Σε αντίθεση με την κλωνική ομαδοποίηση των CA-MRSA στελεχών, τα απομονωθέντα CA-MSSA στελέχη αποδόθηκαν μέσω της μεθόδου MLST σε δώδεκα διαφορετικούς STs (ST1, ST15, ST45, ST72, ST7, ST22, ST728, ST34, ST59, ST10,

ST398 και ST1153), παρουσιάζοντας ευρεία γενετική ποικιλομορφία. Μεταξύ αυτών των στελεχών, 7 (21.9%), τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο διαφορετικούς STs, τους ST72 και ST728, αποδείχθηκε να παράγουν PVL, ενώ 2 (6.3%), τα οποία αποδόθηκαν αμφότερα στον ST34, βρέθηκε να φέρουν το *tst* γονίδιο.

Όπως επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη, οι δερματικές λοιμώξεις από τον CA-MSSA μπορεί να εμφανίζουν παρόμοια επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά με αντίστοιχες λοιμώξεις δέρματος που οφείλονται στον CA-MRSA, γεγονός που έχει σημαντικές επιπτώσεις στην κλινική πράξη ως προς την επιλογή της εμπειρικής θεραπείας που θα εφαρμοστεί για ύποπτες λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων στην κοινότητα, από στελέχη *S. aureus*. Επιπρόσθετα, ορισμένα CA-MSSA στελέχη που απομονώθηκαν στη μελέτη αυτή, αποδόθηκαν, μετά τη μοριακή τους τυποποίηση με MLST, στους ίδιους STs με άλλα ευρέως διαδεδομένα CA-MRSA στελέχη σε παγκόσμιο επίπεδο. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει τη γενετική συσχέτιση μεταξύ των CA-MSSA και των CA-MRSA στελεχών, με τα πρώτα να φαίνεται να αντιπροσωπεύουν γενετικά προγονικά στελέχη για τα δεύτερα.

Συμπερασματικά, μολονότι το ενδιαφέρον και η ανησυχία της ιατρικής κοινότητας έχουν σήμερα στραφεί πρωτίστως στην εξάπλωση των CA-MRSA στελεχών, τα οποία έχουν αναδειχθεί ως σημαντικό αίτιο για τις οξείες βακτηριακές λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, η λοιμογόνος ικανότητα των MSSA στελεχών που προκαλούν δερματικές λοιμώξεις στην κοινότητα και ειδικά εκείνων που παράγουν την PVL ή άλλους βακτηριακούς λοιμογόνους παράγοντες, θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη και να μην υποεκτιμάται.

Λέξεις κλειδιά: CA-MSSA, CA-MRSA, δερματικές λοιμώξεις, MLST, PVL, TSST-1

ABSTRACT

Community-associated *S. aureus* has primarily been worldwide described as the most common cause of skin and soft tissue infections (SSTIs), demonstrating a wide range of clinical presentations. Over the past two decades in most parts of the world, as well as in Greece, there is a major concern about the rise of occurrence and spread of CA-MRSA strains associated with outbreak and sporadic cases of skin infections. The emergence and rapid spread of virulent community-associated clones, both MRSA and MSSA, expressing different virulence factors, constitute an additional cause for serious public health concern.

The objective of the present study was the molecular identification by Multi Locus Sequence Typing (MLST) of *S. aureus* strains, both MRSA and MSSA, in order to compare the clones in our area with those predominating in other parts of Greece, of Europe or globally. All *S. aureus* strains were isolated from patients with various infective skin lesions including furuncles, carbuncles, impetigo, folliculitis and superficial secondary skin infections of chronic dermatoses, in the University Hospital of Larissa, Central Greece, during a 4-month period, from October 2013 to January 2014. The presence of genes encoding for PVL and TSST-1, two exotoxins observed to be consistently associated with skin and soft tissue infections, were also detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification.

Out of 41 *S. aureus* strains included in the present study, 9 (22%) were classified as MRSA and 32 (78%) as MSSA by cefoxitin and oxacillin susceptibility testing. The vast majority (92.7%) of *S. aureus* clinical isolates fulfilled the CDC epidemiologic criteria for community-associated strains, with the exception of 3 (7.3%) MRSA isolates designated as hospital-acquired and further molecularly identified as ST225. All CA-MRSA strains were assigned to ST80 and they were all found to be PVL-positive. In Europe, as well as in Greece, the European ST80 PVL-producing virulent clone has become predominant among CA-MRSA isolates and is reported as an increasingly common cause of skin infections in the community. In contrast to the clonal clustering of CA-MRSA strains, CA-MSSA isolates were assigned by MLST to twelve different STs (ST1, ST15, ST45, ST72, ST7, ST22, ST728, ST34, ST59, ST10, ST398 and ST1153), exhibiting wide genetic diversity. Among these strains, 7 (21.9%), corresponding to two different STs, ST72 and ST728, were verified as PVL-producing, while 2 (6.3%), both assigned to ST34, were found to harbor the *tst* gene.

As confirmed in the present study, CA-MSSA skin infections can present with similar epidemiologic and clinical characteristics to CA-MRSA skin infections, a fact that has important clinical implications for the choice of empirical therapy of suspected community-acquired *S. aureus* skin and soft tissue infections. Moreover, specific CA-MSSA strains isolated in this study were assigned, after their molecular identification by MLST, to the same STs as other

widespread CA-MRSA strains throughout the world. This finding suggests that CA-MSSA strains are genetically related to CA-MRSA ones, with the former appearing to represent the ancestor of the latter.

In conclusion, although clinicians are currently concerned primarily with the spread of CA-MRSA strains, having emerged as a major cause of acute bacterial skin and soft tissue infections, the pathogenic potential of MSSA strains involved in community-associated skin infections, especially of those producing PVL or other bacterial virulence factors, should not be underestimated.

Key words: CA-MSSA, CA-MRSA, skin infections, MLST, PVL, TSST-1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *S. aureus*, εξαιτίας της πρωταρχικής του σημασίας ως παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο, αποτελεί αντικείμενο εκτενούς επιστημονικής έρευνας, η οποία επικεντρώνεται κυρίως στην κατανόηση της παθογένειας, της αντοχής στα αντιβιοτικά και στην άντληση νέων πληροφοριών τόσο για τη δομή του, όσο και για το εξαιρετικά ευέλικτο γονιδιώμα του. Ο *S. aureus* διαθέτει πληθώρα λοιμογόνων παραγόντων, οι οποίοι περιλαμβάνουν παράγοντες της επιφάνειας του κυττάρου, καθώς και εκκρινόμενες τοξίνες και ένζυμα και οι οποίοι συμβάλλουν στη λοιμογόνο ικανότητα του βακτηρίου να προκαλεί ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, μεταξύ των οποίων συχνότερες είναι οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων. Η πλήρης αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του πρώτου στελέχους *S. aureus* το 2001 και η ακόλουθη χαρτογράφηση του γονιδιώματος πολλών άλλων στελεχών, συνέβαλαν στην καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής πορείας του μικροοργανισμού, αλλά και της παθογένειας των λοιμώξεων που προκαλεί.

Τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση και η ταχεία διασπορά πολυανθεκτικών κλώνων, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον (HA-MRSA) όσο και στην κοινότητα (CA-MRSA), σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, αλλά και την πρόοδο της πληροφορικής, οδήγησαν στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση στελεχών *S. aureus*. Μεταξύ των μοριακών μεθόδων τυποποίησης που εφαρμόζονται για τον *S. aureus*, η μέθοδος τυποποίησης πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) κατέχει κεντρική θέση, καθώς βασίζεται σε πολλαπλά γονίδια και εκμεταλλεύεται στο μέγιστο τις δυνατότητες του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA και του διαδικτύου. Η μέθοδος στηρίζεται στη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων, περίπου 450-500 bp, επτά γονιδίων (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes), τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα στελέχη του είδους. Η MLST θεωρείται η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για τη μελέτη της φυλογενετικής εξέλιξης των στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο. Εφαρμόζεται ευρέως τόσο στα πλαίσια ελέγχου των λοιμώξεων σε τοπικές επιδημίες, όσο και σε μελέτες του τρόπου διασποράς των επιδημικών κλώνων σε παγκόσμια κλίμακα, συμβάλλοντας σε μία νέα προσέγγιση στην τυποποίηση και τη μελέτη της επιδημιολογίας των στελεχών του *S. aureus*.

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας αποτέλεσαν στελέχη *S. aureus*, τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων ασθενών με δερματικές λοιμώξεις στην Κεντρική Ελλάδα. Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν αρχικά σε επίπεδο γένους και είδους με τη χρήση φαινοτυπικών τεχνικών και ακολούθησε ο έλεγχος αντοχής ή ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Μετά την απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA τους, τα στελέχη *S. aureus* τυποποιήθηκαν με τη μοριακή μέθοδο της MLST και ελέγχθηκαν για

την έκφραση των γονιδίων των τοξινών της PVL και της TSST-1, με εφαρμογή της μεθόδου της PCR. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα προηγούμενων μελετών που έχουν διεξαχθεί στην Ελλάδα, στην Ευρώπη και παγκόσμια.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟ ΓΕΝΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ (STAPHYLOCOCCUS)

Η ονομασία του γένους *Staphylococcus*, που προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις *σταφυλή* και *κόκκος*, δόθηκε το 1883 από τον Alexander Ogston για να περιγράψει μικροσκοπικά σφαιρικά βακτήρια, τα οποία σχημάτιζαν αθροίσματα που έμοιαζαν με τσαμπιά από σταφύλι. Μετά από μια σειρά κλινικών και εργαστηριακών μελετών περιέγραψε τη σταφυλοκοκκική λοίμωξη [1]. Το 1884 ο Anton Rosenbach απομόνωσε σε καθαρή καλλιέργεια δύο ποικιλίες σταφυλόκοκκων διαχωρίζοντάς τους σύμφωνα με το χρώμα των αποικιών τους σε Σταφυλόκοκκο χρυσίζοντα (*Staphylococcus aureus*), με αποικίες χρυσοκίτρινου χρώματος και Σταφυλόκοκκο λευκό (*Staphylococcus albus*), ο οποίος αργότερα μετονομάστηκε σε *Staphylococcus epidermidis*, με αποικίες χρώματος λευκού, παρέχοντας έτσι την πρώτη μέθοδο ταξινόμησης του νέου γένους [2].

Το γένος των σταφυλόκοκκων περιλαμβάνει Gram θετικούς κόκκους διαμέτρου 0.5 έως 1.5 μm , οι οποίοι διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη, τετράδες, μικρές αλυσίδες ή κατά ομάδες σε σχηματισμούς που μοιάζουν με τσαμπιά από σταφύλι. Είναι ακίνητοι, ασπορογόνοι και δεν έχουν έλκτρο, αν και ορισμένα στελέχη του *S. aureus* αναπτύσσουν ένα λεπτό περίβλημα που τους προσδίδει αντοχή στη φαγοκυττάρωση. Παράγουν καταλάση, ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, χαρακτηριστικό που τους διακρίνει από τους στρεπτόκοκκους και τους εντερόκοκκους. Είναι αερόβια και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, επιβιώνουν και αντέχουν επί μακρόν σε υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος και σε ξηρές επιφάνειες. Διασπούν διάφορα σάκχαρα χωρίς παραγωγή αερίου. Το κυτταρικό τους τοίχωμα είναι ανθεκτικό στη δράση της λυσοζύμης, αλλά λύεται από τη λυσοσταφίνη [3]. Τα περισσότερα στελέχη μπορούν να αναπτύσσονται σε υλικά με υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (7%-15% NaCl), ιδιότητα που εξηγεί την προτίμησή τους να αποικίζουν το δέρμα.

Οι σταφυλόκοκκοι ανευρίσκονται συχνά στο δέρμα, τη ρινική κοιλότητα και τον φάρυγγα των ανθρώπων. Μέχρι σήμερα το γένος των σταφυλόκοκκων περιλαμβάνει 41 είδη και 24 υποείδη, εκ των οποίων ο *S. aureus* αποτελεί το κύριο παθογόνο για τον άνθρωπο [2]. Εξαιτίας της πρωταρχικής του σημασίας ως παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο, ο *S. aureus* μελετήθηκε και συνεχίζει να μελετάται περισσότερο από τα υπόλοιπα είδη. Οι έρευνες για τον *S. aureus* επικεντρώνονται κυρίως στην κατανόηση της παθογένειας, της αντοχής στα αντιβιοτικά και στην άντληση νέων πληροφοριών τόσο για τη δομή του, όσο και για το εξαιρετικά ευέλικτο γονιδίωμά του.

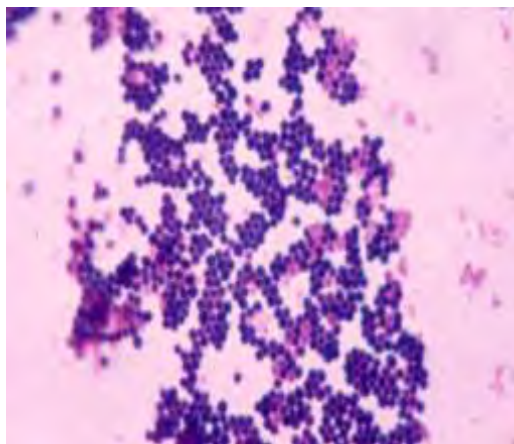
2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS (ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ ΧΡΥΣΙΖΩΝ)

2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο *S. aureus* είναι Gram θετικός κόκκος διαμέτρου περίπου 1μm που, όπως φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο σε χρωματισμένα παρασκευάσματα, διατάσσεται μεμονωμένα, σε ζεύγη, τετράδες, μικρές αλυσίδες ή κατά ομάδες σε σχηματισμούς που μοιάζουν με τσαμπιά από σταφύλι. Είναι μικρόβιο ακίνητο και ασπορογόνο, το οποίο δε φέρει βλεφαρίδες και έλυτρο. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη του αναπτύσσουν ένα λεπτό αμινογλυκουρονικό περίβλημα, το οποίο προσδίδει αντοχή στη φαγοκυττάρωση [4].

Ο *S. aureus* αναπτύσσεται εύκολα στα κοινά θρεπτικά υλικά και σε υλικά που περιέχουν 7.5%-10% χλωριούχου νατρίου (NaCl). Αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες στους 34-37°C, αν και η ανάπτυξή του είναι δυνατή σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15-45°C. Οι αποικίες του *S. aureus* μετά από 24ωρη επώαση είναι στρογγυλές περί τα 1-3mm, λείες, ελαφρώς υπερυψωμένες, γυαλιστερές και με χρώμα από κρεμο-κίτρινο έως πορτοκαλί. Η χρυσίζουσα χρωστική αναπτύσσεται καλύτερα μετά από παρατεταμένη επώαση και ταχύτερα σε υλικά εμπλουτισμένα με γλυκερίνη ή οξικό οξύ. Εμφανίζεται μόνο σε στερεά υλικά και οφείλεται στην παραγωγή καροτινοειδών. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες περιβάλλονται από ζώνη αιμόλυσης (β-αιμόλυση) λόγω της παραγωγής διαφόρων αιμολυσινών (α-δ αιμολυσίνη). Μετά από επώαση 3 ημερών στη θερμοκρασία των 34-37°C οι αποικίες μεγαλώνουν μέχρι 6-8 mm. Στο αλατούχο άγαρ μαννιτόλης (Chapman) ο *S. aureus* αναπτύσσεται καλά και με παρουσία δείκτη παράγονται αποικίες που περιβάλλονται από ζώνες κίτρινου χρώματος. Η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου 7.5% οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων πλην των σταφυλόκοκκων, ενώ η ζύμωση της μαννιτόλης, όπως υποδεικνύεται από τη μεταβολή του δείκτη ερυθρού της φαινόλης, βοηθά στη διαφοροποίηση του *S. aureus* από τους αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους. Στο MacConkey άγαρ αναπτύσσονται μικρές ροζ χρώματος αποικίες λόγω ζύμωσης της λακτόζης. Σε υγρά θρεπτικά υλικά ο *S. aureus* προκαλεί ομοιομερή θολερότητα και δεν παρατηρείται παραγωγή χρωστικής. Η παραγωγή κοαγκουλάσης διαφοροποιεί τον *S. aureus* από τον *S. epidermidis* και τα άλλα είδη σταφυλόκοκκου, τα οποία αναφέρονται ως κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci - CoNS). Ο *S. aureus* διασπά διάφορα σάκχαρα χωρίς την παραγωγή αερίου, ενώ η διάσπαση της μαννιτόλης βοηθά στη διαφοροποίησή του από τον *S. epidermidis*. Είναι μικρόβιο ανθεκτικό στην ξήρανση που υφίσταται στον ατμοσφαιρικό αέρα και στη θέρμανση στους 60°C για 30 λεπτά. Χαρακτηριστική ιδιότητα του *S. aureus* είναι η παραγωγή θερμοανθεκτικής DNAσης, που

αποτελεί βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό του είδους και έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή πηκτάσης για την τυποποίηση του *S. aureus* [3, 5].



Εικόνα 1. *S. aureus* (χρώση Gram +)



Εικόνα 2. *S. aureus*. Αποικίες σε αιματούχο άγαρ

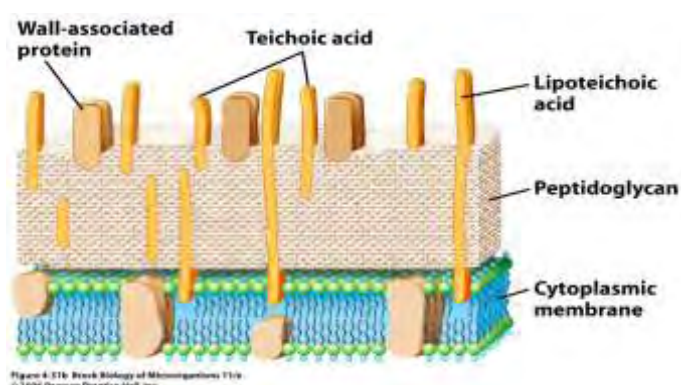
2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Το κυτταρικό περίβλημα του *S. aureus* έχει μια πολύπλοκη δομή, που αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη παρεμβάλλεται μεταξύ του τοιχώματος και του κυτταροπλάσματος. Αποτελείται κυρίως από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, μέσα στην οποία βρίσκονται τυχαία καταναεμημένες οι πρωτεΐνες. Άλλα κύρια συστατικά της σταφυλοκοκκικής μεμβράνης είναι τα καρτενοειδή, η μενακινόνη και τα γλυκολιπίδια. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί φραγμό διαπερατότητας, διαχωρίζοντας το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον, ενώ βασική λειτουργία της αποτελεί η ιδιότητά της να ρυθμίζει τη διέλευση μορίων από και προς το εσωτερικό του βακτηριδίου. Για τη λειτουργία της μεγάλη σημασία έχει η διατήρηση της ρευστότητάς της, η οποία οφείλεται στα φωσφολιπίδια και μεταβάλλεται ανάλογα με τη χημική σύσταση των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων και καρτενοειδών που περιέχει. Τα καρτενοειδή, εκτός από τη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, προστατεύουν το κύτταρο από την υπερϊώδη ακτινοβολία και το οξειδωτικό stress, παρέχουν αντοχή στα απορρυπαντικά και αυξάνουν την αντοχή στη θερμότητα. Επιπρόσθετα, η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί θέση πρόσδεσης για τις πενικιλινδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Bindind Proteins – PBPs), οι οποίες καταλύουν το τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης.

Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* περιέχει πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκά οξέα. Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα, δημιουργώντας ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα που προσδίδει σχήμα και προστασία στο βακτήριο. Αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα

N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ, που εναλλάσσονται μεταξύ τους και συνδέονται με 1,4 β-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Σε κάθε N-ακετυλομουραμικό οξύ είναι συνδεδεμένη μία τετραπεπτιδική αλυσίδα, που αποτελείται από τα αμινοξέα D-γλουταμινικό οξύ, L-λυσίνη, D- και L-αλανίνη. Παρακείμενες πεπτιδικές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με πενταπεπτιδικές γέφυρες γλυκίνης, με τη βοήθεια της DD-τρανσπεπτιδάσης. Η πενταγλυκινική γέφυρα συνδέει την ε-αμινομάδα της λυσίνης μίας τετραπεπτιδικής αλυσίδας με την D-αλανίνη στη θέση 4 μίας γειτονικής αλυσίδας.

Τα τειχοϊκά οξέα είναι πολυμερή της γλυκερόλης και της φωσφορικής ριβιτόλης. Υποδιαιρούνται σε τειχοϊκά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία είναι συνδεδεμένα με την πεπτιδογλυκάνη και σε λιποτειχοϊκά οξέα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με γλυκολιπίδια στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα τειχοϊκά οξέα εκτείνονται πέρα από την επιφάνεια του κυττάρου, μεταβάλλοντας την επιφανειακή υδροφοβικότητα. Επίσης, χρησιμεύουν ως υποδοχείς βακτηριοφάγων και συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης και ανάπτυξης. Η πεπτιδογλυκάνη και τα τειχοϊκά οξέα αντιπροσωπεύουν το 90% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος. Το υπόλοιπο αποτελείται από πρωτεΐνες επιφανείας και υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης (αυτολυσίνες). Οι πρωτεΐνες επιφανείας έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πρωτεΐνες του ξενιστή που υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος και στην εξωκυττάρια ουσία, όπως το ινωδογόνο, την ινωδονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη και το κολλαγόνο. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως προσκολλητίνες και ανήκουν στην ομάδα των MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) [6].



Εικόνα 3. Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* (www.staphylococcus.net)

2.3. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Το 2001 ο Hiramatsu και οι συνεργάτες του αποκωδικοποίησαν το γονιδίωμα του πρώτου στελέχους *S. aureus* και μέσα στα επόμενα χρόνια ακολούθησε η χαρτογράφηση του γονιδιώματος πολλών άλλων στελεχών. Η συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος των διαφόρων στελεχών βοήθησε στην καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής τους πορείας και της παθογένειας των λοιμώξεων που προκαλούν. Το γονιδίωμα του *S. aureus* έχει μέγεθος 2.8 έως 2.9 Mb και κωδικοποιεί 2565-2721 πρωτεΐνες. Αποτελείται από το βασικό (core genome) και το βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome) [7, 8, 9].

2.3.1. ΒΑΣΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (CORE GENOME)

Αποτελεί το 75% του γονιδιώματος και ανευρίσκεται σε όλα τα στελέχη του είδους. Περιλαμβάνει όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν απαραίτητες για το βακτήριο μεταβολικές και ρυθμιστικές λειτουργίες (housekeeping genes), καθώς και πρωτεΐνες επιφανείας που αποτελούν δομικά συστατικά του κυττάρου και συγχρόνως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιστική προσκόλληση του βακτηριδίου. Παρόλο που το βασικό γονιδίωμα χαρακτηρίζεται από γονιδιακή σταθερότητα, περιέχει επίσης μεταβλητές περιοχές (core variable regions), οι οποίες προκύπτουν από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, ανασυνδυασμό γονιδίων, διαφοροποιήσεις στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών και σπάνια από αντικατάσταση μεγάλων τμημάτων του χρωμοσώματος [10,11]. Στις μεταβλητές περιοχές ανευρίσκονται γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του πολυσακχαριδικού ελύτρου και για τη ρύθμιση της έκφρασης των λοιμογόνων παραγόντων (*agr*, *trap*, *sarT*). Επίσης, κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιφανείας και άλλους λοιμογόνους παράγοντες, που εκφράζονται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S. aureus*, όπως είναι η κοαγκουλάση (*coa*), η πρωτεΐνη A (*spsA*), η α-τοξίνη (*hla*) και οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ινωδενεκτίνη (*fmbAB*) και το ινωδογόνο (*CifAB*) [12].

Εντός του βασικού γονιδιώματος ανευρίσκονται δύο ομάδες γονιδίων, που χρησιμοποιούνται σε μεθόδους που εφαρμόζουν την τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, με σκοπό την τυποποίηση και διαφοροποίηση των στελεχών. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει επτά γονίδια μεταβολισμού (housekeeping genes), δηλαδή γονίδια που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία και τα οποία χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Multilocus Sequence Typing (MLST). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των διαφορών που προκύπτουν στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των συγκεκριμένων γονιδίων. Με βάση την κατανομή των διαφορών, ο κάθε κλώνος χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST), επιτρέποντας έτσι την τυποποίηση και το διαχωρισμό των στελεχών [13]. Τη δεύτερη ομάδα αποτελεί το γονίδιο της πρωτεΐνης A (*spsA*). Η μέθοδος τυποποίησης που στηρίζεται σε αυτό το

γονίδιο ονομάζεται *spa typing* και η διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών βασίζεται στον πολυμορφισμό της περιοχής X του εν λόγω γονιδίου [14].

2.3.2. ΒΟΗΘΗΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (ACCESSORY GENOME)

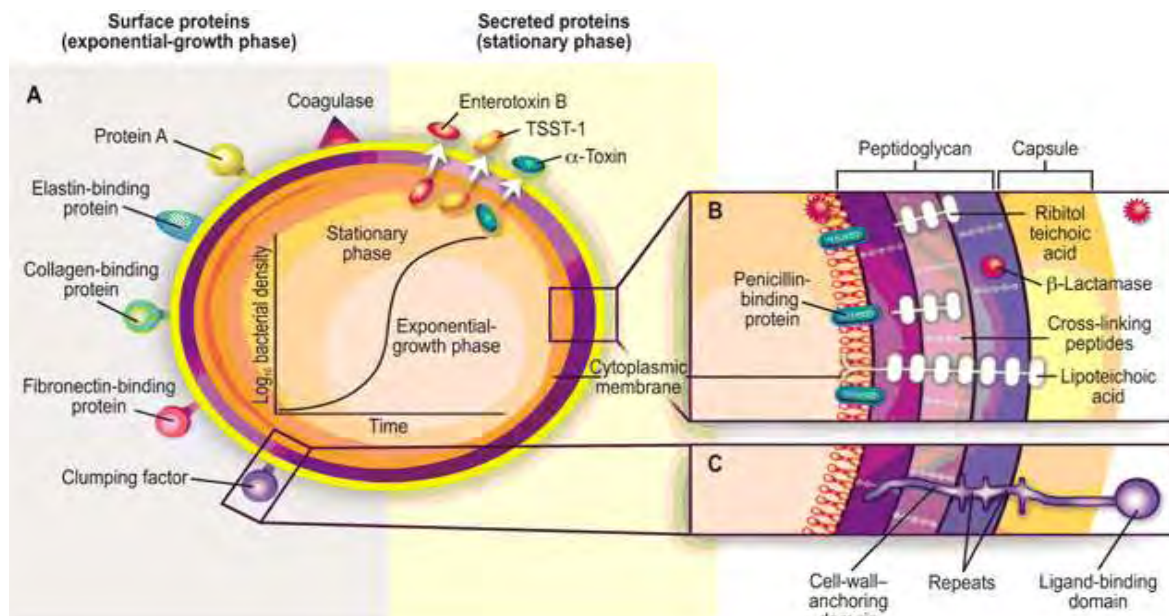
Το υπόλοιπο 25% του γονιδιώματος του *S. aureus* ονομάζεται βοηθητικό γονιδίωμα και απαρτίζεται από μεταθετά γενετικά στοιχεία (Mobile Genetic Elements, MGEs), τα οποία ανευρίσκονται σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος και φέρουν το 50% των λοιμογόνων παραγόντων. Διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ικανότητα προσαρμογής και εξέλιξης των βακτηρίων, αφού μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους, αλλά και μεταξύ ειδών διαφορετικών μεταξύ τους [15]. Τα MGEs περιλαμβάνουν πλασμίδια, τρανσποζόνια (Tn), αλληλουχίες εισδοχής (IS), βακτηριοφάγους, νησίδες παθογονικότητας (SaPI) και σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες (SCC). Μεταφέρονται οριζόντια μεταξύ των στελεχών και μεταβιβάζονται με κάθετη μεταφορά στα θυγατρικά κύτταρα. Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω των μηχανισμών της μεταγωγής, του μετασχηματισμού και της βακτηριακής σύζευξης, αν και ο τελευταίος σπάνια παρατηρείται στον *S. aureus*. Τα MGEs κωδικοποιούν μία ποικιλία λοιμογόνων παραγόντων και μορίων που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Κωδικοποιούν, επίσης, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά και την ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του νέου ξενιστή. Τα γονίδια που απαρτίζουν το βοηθητικό γονιδίωμα διαφέρουν σε σχέση με τα αντίστοιχα γονίδια του βασικού γονιδιώματος στην περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (G+C), αφού συχνά προέρχονται από άλλα είδη βακτηρίων [16].

2.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ο *S. aureus* είναι ένα ευέλικτο παθογόνο, ικανό να προκαλεί ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων. Η ικανότητά του αυτή οφείλεται στην πληθώρα λοιμογόνων παραγόντων που διαθέτει και που του επιτρέπουν να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες εντός του ανθρώπινου ξενιστή. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στη λοιμογόνο ικανότητα του *S. aureus* κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: παράγοντες της επιφάνειας του κυττάρου και εκκρινόμενες πρωτεΐνες (τοξίνες και ένζυμα). Η σύνθεση των ανωτέρω παραγόντων ρυθμίζεται από γονίδια και οπερόνια, που άλλοτε παίζουν ρόλο θετικό ενεργοποιώντας και άλλοτε αρνητικό καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και τη φάση ανάπτυξης του βακτηρίου [17].

Οι παράγοντες επιφανείας παράγονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μικροβίου, ενώ η παραγωγή των περισσότερων τοξινών και των εξωκυττάρων ενζύμων λαμβάνει χώρα κατά την ύστερη εκθετική φάση. Το χρονικό αυτό πρότυπο αντανακλά την ανάγκη για παραγωγή επιφανειακών παραγόντων νωρίς στην πορεία της λοίμωξης, για την

αποφυγή του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος και την προώθηση του αποικισμού. Αντίθετα, η παραγωγή εξωκυττάρων τοξινών και αποικοδομητικών ενζύμων καθίσταται σημαντική αργότερα στην εξέλιξη της λοίμωξης, για τη διευκόλυνση της διείσδυσης και την επιβίωση κάτω από αντίξοες συνθήκες ενόψει μίας εν εξελίξει ανοσολογικής απόκρισης [18].



Εικόνα 4. Λοιμογόνοι παράγοντες του *S. aureus* (www.staphylococcus.net)

2.4.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Οι λοιμογόνοι παράγοντες της επιφάνειας του *S. aureus* περιλαμβάνουν δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, επιφανειακές πρωτεΐνες, εκκρινόμενες προσκολλητίνες και εξωκυττάρους πολυσακχαρίτες. Οι παράγοντες αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και στην προώθηση του αποικισμού.

2.4.1.1. Δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος

Η πεπτιδογλυκάνη και τα λιποτειχοϊκά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος, η δομή και η λειτουργία των οποίων περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω, σχηματίζουν αντιγόνα ισχυρά και εξαιρετικά ειδικά για το είδος [5], καθώς επάγουν μία ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) των Gram αρνητικών βακτηρίων και η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση συστηματικής σταφυλοκοκκικής νόσου και σηπτικής καταπληξίας. Έτσι, η πεπτιδογλυκάνη έχει δράση παρόμοια με αυτή της ενδοτοξίνης, διεγείροντας την παραγωγή ενδογενών πυρετογόνων, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, την παραγωγή ιντερλευκίνης-1 από τα μονοκύτταρα και τη συσσώρευση των

πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, μία διαδικασία που είναι υπεύθυνη και για τον σχηματισμό αποστημάτων. Επιπλέον, τα τειχοϊκά οξέα μεσολαβούν στην προσκόλληση του *S. aureus* στις βλεννογονικές επιφάνειες, μέσω της ειδικής τους σύνδεσης με τη φμπρονεκτίνη, λαμβανοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικό ρόλο και στον αποικισμό της ρινικής κοιλότητας. Παρόλο που τα τειχοϊκά οξέα είναι ασθενή ανοσογόνα, η σύνδεσή τους με την πεπτιδογλυκάνη διεγείρει μία ισχυρή, ειδική αντισωματική απάντηση [19,20].

2.4.1.2. Πρωτεΐνες επιφανείας

Η επιφάνεια του *S. aureus* επικαλύπτεται από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, που ανήκουν στην ομάδα των MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Αυτές οι προσκολλητίνες είναι συνδεδεμένες με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος και αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας του ξενιστή, συντελώντας στην παθογένεια των λοιμώξεων. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 28 διαφορετικές πρωτεΐνες επιφανείας, οι οποίες δεσμεύουν τουλάχιστον 18 διαφορετικές πρωτεΐνες του ξενιστή [21]. Σημαντικές MSCRAMMs για τον *S. aureus* είναι η πρωτεΐνη A και οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το ινωδογόνο, την ινωδονεκτίνη και το κολλαγόνο.

Η πρωτεΐνη A καλύπτει εξωτερικά το σύμπλεγμα της πεπτιδογλυκάνης και των τειχοϊκών οξέων και έχει μία μοναδική συγγένεια σύνδεσης με το Fc τμήμα της ανοσοσφαιρίνης IgG, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εξαρτώμενης από τα αντισώματα οψωνινοποίησης και της φαγοκυττάρωσης των σταφυλόκοκκων [22]. Συνδέεται, επίσης, με τον παράγοντα Von Willebrand, μία γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο που έχει υποστεί τραυματική βλάβη, καθώς και με τον TNFR1, έναν υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της φυσικής ανοσίας [23]. Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη A παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της σταφυλοκοκκικής πνευμονίας και της σηπτικής αρθρίτιδας [24,25].

Ο *S. aureus* παράγει δύο πρωτεΐνες (FnbA και FnbB) που δεσμεύουν την ινωδονεκτίνη, την ελαστίνη και το ινωδογόνο, συμβάλλοντας στην πρόκληση διεισδυτικών λοιμώξεων. Παρόλο που ο *S. aureus* θεωρείται εξωκυττάριο παθογόνο, έχει την ικανότητα να αναπαράγεται ενδοκυττάρια και αυτό οφείλεται στην έκφραση των FnbA και FnbB, που συμβάλλουν στην ενσωμάτωση (internalization) του βακτηρίου μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Η παραμονή του μέσα στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, του επιτρέπει να διαφεύγει της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος [26].

Ο *S. aureus* κωδικοποιεί δύο προσκολλητίνες, οι οποίες δεσμεύουν το ινωδογόνο και ορίζονται ως ClfA και ClfB. Οι πρωτεΐνες αυτές επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας [27]. Η ClfB συνδέεται με την

κυτοκερατίνη 10, προωθώντας την προσκόλληση του μικροβίου στα πλακώδη ρινικά επιθηλιακά κύτταρα και παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στον *S. aureus* να αποικίζει τη ρινική κοιλότητα [28]. Η ClfA με τη σειρά της παίζει ρόλο στην παθογένεια της σήψης και της σηπτικής αρθρίτιδας.

Η ικανότητα του *S. aureus* να δεσμεύει το κολλαγόνο οφείλεται στην παραγωγή της πρωτεΐνης cna. Η cna ανευρίσκεται συχνά σε στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων [29].

Στην ομάδα των MSCRAMMs συγκαταλέγονται, επίσης, οι πρωτεΐνες επιφανείας Sdr και Sas. Οι πρωτεΐνες Sdr δρουν δεσμεύοντας το ινωδογόνο και επάγοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [30]. Αντίθετα, μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης των περισσότερων πρωτεϊνών Sas, αν και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην εκδήλωση διεισδυτικών λοιμώξεων. Μία από αυτές, η πρωτεΐνη SasG εμφανίζει αντικρουόμενες ιδιότητες, βοηθώντας από τη μία στο σχηματισμό της βιομεμβράνης και προωθώντας την προσκόλληση στα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ από την άλλη, με το σχηματισμό περίτριχων επιφανειακών ινιδίων, επικαλύπτει και αναστέλλει τη δράση άλλων επιφανειακών πρωτεϊνών [31].

Οι αυτολυσίνες αντιπροσωπεύουν μία ξεχωριστή οικογένεια σταφυλοκοκκικών προσκολλητίνων. Έχουν περιγραφεί δύο πρωτεΐνες (Atl και Aaa), που έχουν τόσο ενζυματικές όσο και προσκολλητικές ιδιότητες. Εμπλέκονται στη διαδικασία διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος και προσκόλλησης στις πρωτεΐνες του ξενιστή [32].

2.4.1.3. Εκκρινόμενες προσκολλητίνες

Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ινωδονεκτίνη και το ινωδογόνο, όπως είναι η Eap (Extracellular adhesive protein) και η Emp (Extracellular matrix-binding protein), όπως επίσης και πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την προθρομβίνη (Coagulase, Coa) και δεσμεύουν τον παράγοντα Von Willebrand (vWbp) [33].

2.4.1.4. Πολυσακχαρίτες της επιφάνειας του κυττάρου

Η εξωκυττάρια πολυσακχαριδική στιβάδα (έλυτρο), που παράγεται από πολλά στελέχη *S. aureus*, συμβάλλει σημαντικά στην παθογένεια των λοιμώξεων. Περιορίζει την οψωνινοποίηση και τη φαγοκυττάρωση του βακτηρίου από τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Το έλυτρο καλύπτει τα μόρια C3b στην επιφάνεια του κυττάρου, περιορίζοντας έτσι την αναγνώρισή τους από τους υποδοχείς C3b των φαγοκυττάρων [34]. Στον *S. aureus* έχουν ταυτοποιηθεί έντεκα ελυτρικοί ορότυποι, με τους ορότυπους 5 και 7 να σχετίζονται με την πλειοψηφία των λοιμώξεων και τους ορότυπους 1 και 2 να σχετίζονται με πολύ πυκνά έλυτρα και βλεννώδεις

αποικίες [19]. Τα στελέχη που εκφράζουν τους ορότυπους 5 και 8 του πολυσακχαριδικού ελύτρου μπορεί να προκαλέσουν εμμένουσα βακτηριαίμια και σχετίζονται με τον σχηματισμό ενδοκοιλιακών και υποδόριων αποστημάτων [35].

Ο PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) είναι ένας δεύτερος εξωκυττάριος πολυσακχαρίτης που παράγεται από ορισμένα στελέχη *S. aureus*. Είναι ένα πολυμερές της β-1,6-N-ακετυλογλυκοζαμίνης και συντίθεται από τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *icaABCD*. Ο PIA ενέχεται στο σχηματισμό της βιομεμβράνης και στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος [36].

2.4.2. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΙ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ENZYMA)

Ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να παράγει μία μεγάλη ποικιλία εξωκυττάρια πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες είναι τοξίνες. Αυτές είναι οι κυτταροτοξίνες, οι αποφολιδωτικές/επιδερμολυτικές τοξίνες και οι τοξίνες που ανήκουν στην οικογένεια των υπεραντιγόνων. Οι κυτταροτοξίνες περιλαμβάνουν τις αιμολυσίνες και τις λευκοκτονίνες. Η οικογένεια των υπεραντιγόνων περιλαμβάνει την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1), τις εντεροτοξίνες και τις πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις εντεροτοξίνες (enterotoxin-like proteins). Μεταξύ αυτών, στην παρούσα εργασία αντικείμενο μελέτης αποτέλεσαν η λευκοκτονίνη Pantone-Valentine (PVL) και η TSST-1.

2.4.2.1. Κυτταροτοξίνες

Ο *S. aureus* παράγει διάφορες κυτταρολυτικές τοξίνες. Αυτές είναι οι: α-, β-, γ- και δ-αιμολυσίνες και οι λευκοκτονίνες Luk και Pantone-Valentine (PVL). Οι αιμολυσίνες διαφέρουν μεταξύ τους στην αντιγονική δομή και στη δράση τους έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η γ-αιμολυσίνη και οι λευκοκτονίνες κατατάσσονται στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών, με βάση την πρωτοταγή και τρισδιάστατη δομή τους. Οι τοξίνες αυτές αποτελούνται από δύο ξεχωριστές πρωτεϊνικές υπομονάδες (S “slow” και F “fast” eluting proteins). Οι υπομονάδες S και F συναθροίζονται στην κυτταρική μεμβράνη σχηματίζοντας επταμερή ή οκταμερή συμπλέγματα, προκαλώντας τη λύση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των μακροφάγων του ξενιστή [37].

Η α-αιμολυσίνη (α-τοξίνη), η οποία μπορεί να κωδικογραφείται τόσο στο βακτηριακό χρωμόσωμα όσο και σε ένα πλασμίδιο, είναι ένα θερμοευαίσθητο πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 33.000 daltons, το οποίο παράγεται από ένα μεγάλο ποσοστό στελεχών. Προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του κουνελιού και έχει δράση δερμονεκρωτική και νευροτοξική. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *hla* και παράγεται κατά την ύστερη εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροβίου. Η α-αιμολυσίνη ενσωματώνεται στις υδρόφοβες περιοχές της κυτταρικής

μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αλλά και των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Δρα επί των λείων μυϊκών ινών ιστών και αγγείων στα πειραματόζωα, με αποτέλεσμα σύσπαση των μικρών αγγείων, στάση αίματος και ισχαιμική νέκρωση. Παράγεται ως μονομερές, αλλά στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή σχηματίζει κυλινδρικά επταμερή σύμπλοκα, οι πόροι των οποίων επιτρέπουν την απώλεια καλίου και άλλων μικρομοριακών ουσιών και την είσοδο νατρίου και ασβεστίου. Η διαφορά της συγκέντρωσης των ιόντων οδηγεί σε ωσμωτική διόγκωση και λύση του κυττάρου-στόχου, καθώς και στην απελευθέρωση παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη διαδικασία [5, 19, 38].

Η β-αιμολυσίνη (β-τοξίνη ή σφιγγομυελινάση) είναι μία θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 35.000 daltons, η οποία παράγεται, επίσης, σε μεγάλες συγκεντρώσεις από πολλά στελέχη *S. aureus* και κωδικοποιείται από το γονίδιο *hlyB*. Εμφανίζει ειδικότητα για τη σφιγγομυελίνη και τη φωσφατιδυλοχολίνη και είναι τοξική για μία ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροκυττάρων, λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών, λευκοκυττάρων και μακροφάγων. Καταλύει την υδρόλυση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων στα ευαίσθητα κύτταρα, των οποίων η λύση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της σφιγγομυελίνης που εκτίθεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Έτσι, η δράση της είναι μεγαλύτερη έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων του προβάτου, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε σφιγγομυελίνη. Μαζί με την α-αιμολυσίνη θεωρείται υπεύθυνη για την ιστική καταστροφή και τον σχηματισμό αποστημάτων, που χαρακτηρίζουν τις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις [19, 39].

Η γ-αιμολυσίνη (γ-τοξίνη) παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S. aureus* και κωδικοποιείται από το γονίδιο *hlyG*, που περιλαμβάνει τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (*hlyGA*, *hlyGB*, *hlyGC*). Οι υπομονάδες S της γ-αιμολυσίνης κωδικοποιούνται από τα *hlyGA* και *hlyGC*, ενώ η υπομονάδα F από το *hlyGB*. Ο πολυμερισμός των πρωτεϊνικών κλασμάτων στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων οδηγεί στο σχηματισμό πόρων, με επακόλουθη αυξημένη διαπερατότητα για τα κατιόντα, ωσμωτική αστάθεια και λύση των κυττάρων. Η γ-αιμολυσίνη καταστρέφει τα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών [19, 37, 40].

Η δ-αιμολυσίνη (δ-τοξίνη) είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 3.000 daltons, που συντίθεται από το 97% των στελεχών *S. aureus*. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *hlyD* και ανήκει στις φαινολ- διαλυτές- μοντουλίνες (Phenol- Soluble- Modulins, PSMs). Έχει ένα ευρύ φάσμα κυτταρολυτικής δράσης, καθώς λύνει ερυθρά αιμοσφαίρια, οργανίδια, πρωτοπλάστες, σφαιροπλάστες και άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ έχει παρατηρηθεί και δερμονεκρωτική δράση. Αυτή η σχετικά μη ειδική μεμβρανική τοξικότητα είναι συμβατή με την άποψη ότι η δ-αιμολυσίνη δρα ως επιφανειοδραστικός παράγοντας, καταστρέφοντας ταχέως τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, μέσω μίας δράσης όμοιας με αυτή των απορρυπαντικών [19,37].

Ο Van de Velde, το 1894, ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο «λευκοκτονίνη» για να περιγράψει τη λύση των λευκοκυττάρων από μία ουσία που εκκρίνεται από στελέχη *S. aureus*. Το 1936 ο Wright την ονόμασε Panton-Valentine προς τιμή των ερευνητών Philip Panton και Francis Valentine. Σήμερα, στην οικογένεια των λευκοκτονινών ανήκουν, επίσης, η LukE/D, η LukM/F'-PV και η LukGH/AB. Όπως και η γ-αιμολυσίνη, οι τοξίνες αυτές είναι συνεργο-υμενοτροπικές, που σημαίνει ότι αποτελούνται από δύο πρωτεΐνες (LukS και LukF), οι οποίες παράγονται μεμονωμένα και ενώνονται στην επιφάνεια των κυττάρων σχηματίζοντας οκταμερή (αναλογία υπομονάδων 4:4), για να ασκήσουν την τοξική τους δράση. Τα στελέχη *S. aureus* που παράγουν τόσο λευκοκτονίνες όσο και τη γ-αιμολυσίνη έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν λειτουργικά ετερόλογα ζεύγη αποτελούμενα από τα κλάσματα S και F, ο συνδυασμός των οποίων επιτρέπει το σχηματισμό έως και 20 λειτουργικών τοξινών, συμβάλλοντας στη λοιμογονικότητα των στελεχών μέσω της κυτταρολυτικής τους δράσης [41].

Η Panton-Valentine λευκοκτονίνη (PVL) αποτελείται από τις πρωτεΐνες LukS-PV (32kDa) και LukF-PV (34kDa). Αυτές οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *LukS-PV* και *LukF-PV*, τα οποία ανευρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις εντός του βακτηριακού χρωμοσώματος και προέρχονται από υπολοιμογόνους βακτηριοφάγους, υπογραμμίζοντας τη δυνατότητα οριζόντιας διασποράς αυτών των λοιμογόνων παραγόντων [42]. Η PVL στοχεύει τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα) και ειδικότερα τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, τα οποία αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των λοιμώξεων από *S. aureus*, αλλά δεν έχει αιμολυτική δράση (σε αντίθεση με τη γ-αιμολυσίνη). Στην κυτταρική μεμβράνη η PVL σχηματίζει πόρους και ανάλογα με τη συγκέντρωσή της προκαλεί είτε ωσμωτική λύση είτε απόπτωση των κυττάρων-στόχων. Η λύση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λυτικών ενζύμων (β-γλουκουρονιδάση, λυσοζύμη), χημειοτακτικών παραγόντων (IL-8 και λευκοτριένης-B4) και δραστικών μεταβολιτών του οξυγόνου, που προκαλούν ιστική βλάβη (νέκρωση) και επάγουν τη συσσώρευση των λευκοκυττάρων στην εστία της φλεγμονής. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η PVL επάγει την απόπτωση των πολυμορφοπύρρηνων, δημιουργώντας πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αναστέλλοντας έτσι τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Επάγει, επίσης, την απόπτωση πολλών άλλων κυττάρων του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων [43]. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι η PVL έχει δράση δερμονεκρωτική, εξηγώντας ίσως έτσι την παθοβιολογία των χαρακτηριστικών δερματικών βλαβών που παρατηρούνται στις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων που οφείλονται σε στελέχη CA-MRSA.

Στο παρελθόν τα γονίδια της PVL ανευρίσκονταν σε λιγότερο από 5% των στελεχών *S. aureus* [44]. Μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1990, η παρουσία αυτών των γονιδίων συσχετίστηκε με λοιμώξεις που προκαλούνται από τα CA-MRSA στελέχη. Το ποσοστό των

PVL-θετικών CA-MRSA στελεχών ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τη χώρα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής περίπου το 60-100% των CA-MRSA στελεχών φέρει αυτά τα γονίδια, ενώ αντίθετα ανευρίσκονται σπάνια σε στελέχη που σχετίζονται με το νοσοκομειακό περιβάλλον [45]. Τα γονίδια της PVL ανευρίσκονται κυρίως σε στελέχη CA-MRSA που προκαλούν λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (Skin and Soft Tissue Infections, SSTIs), αλλά και νεκρωτική πνευμονία, σοβαρή σήψη και άλλες απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις. Αν και κανένας άλλος λοιμογόνος παράγοντας δεν έχει συσχετισθεί τόσο πολύ με τα CA-MRSA στελέχη όσο η PVL, πρόσφατες μελέτες αμφισβητούν τη σημασία της στην παθογένεια των λοιμώξεων, επισημαίνοντας ότι η PVL δεν είναι ο σημαντικότερος λοιμογόνος παράγοντας. Έτσι, ο ρόλος της PVL στην επιδημιολογία και την παθογένεια των λοιμώξεων από CA-MRSA στελέχη καθίσταται ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα [46, 47, 48].

2.4.2.2. Αποφολιδωτικές / επιδερμολυτικές τοξίνες

Οι επιδερμολυτικές τοξίνες (ETs) που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο ανήκουν σε τρεις ορότυπους: ETA, ETB και ETD. Η ETA και η ETB παράγονται από το 5% των στελεχών και είναι υπεύθυνες για το σύνδρομο της σταφυλοκοκκικής επιδερμικής νεκρόλυσης (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS) και για το φυσαλιδώδες μολυσματικό κηρίο (bullous impetigo), λοιμώξεις που εκδηλώνονται συχνότερα στα νεογνά και χαρακτηρίζονται από την αποφολίδωση των εξωτερικών στιβάδων της επιδερμίδας, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικών δερματικών βλαβών. Η ETA είναι θερμοανθεκτική και κωδικοποιείται από το γονίδιο *eta*, το οποίο ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα, ενώ η ETB είναι θερμοευαίσθητη και το γονίδιο που την κωδικογραφεί (*etb*) ανευρίσκεται σε μεταφερόμενα πλασμίδια. Οι ETs είναι πρωτεάσες της σερίνης. Διασπούν εκλεκτικά τη δεσμογλεΐνη-1 (DSg1), μία δεσμοσωμική προσκολλητική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στις ανώτερες στιβάδες της επιδερμίδας και συνδέει παρακείμενα επιδερμικά κύτταρα. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των δεσμοσωμάτων και τον χαρακτηριστικό διαχωρισμό της επιδερμίδας στην κοκκιώδη στιβάδα. Η ETD αναγνωρίστηκε πρόσφατα και παράγεται από στελέχη που απομονώνονται από δοθήνες και δερματικά αποστήματα [37, 49, 50].

2.4.2.3. Τοξίνες της οικογένειας των υπεραντιγόνων

Η οικογένεια των υπεραντιγόνων (Pyrogenic Toxin Superantigens, PTSAs) περιλαμβάνει την τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1), τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (ορότυποι SEA, SEB, SEcN, SED, SEE, SEG και SEI) και τις πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις εντεροτοξίνες (ορότυποι SEI-H και SEI-J έως SEI-V). Οι τοξίνες αυτές χαρακτηρίζονται από την κοινή ικανότητά τους να προκαλούν υψηλό πυρετό, να

αυξάνουν την ευαισθησία του ξενιστή στη θανατηφόρο δράση της ενδοτοξίνης και να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων ως υπεραντιγόνα. Τα υπεραντιγόνα συνδέονται στις αμετάβλητες περιοχές των μορίων τάξεως ΙΙ του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και στις μεταβλητές περιοχές των β-αλυσίδων (Vβ) των υποδοχέων των Τ-λεμφοκυττάρων (TCR). Αυτή η σύνδεση οδηγεί στη μαζική ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και στην απελευθέρωση υψηλών επιπέδων μίας ποικιλίας κυτταροκινών (TNF- α - β , IL-1 β , IL-2, IFN- γ) από τα μακροφάγα και τα Th1 λεμφοκύτταρα. Οι κυτταροκίνες είναι υπεύθυνες για πολλές από τις κύριες συστηματικές εκδηλώσεις του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας, συμπεριλαμβανομένων του πυρετού, της υπότασης, της απολέπισης και της πολυοργανικής ανεπάρκειας. Η δεύτερη σημαντική ιδιότητα των υπεραντιγόνων, που συμβάλλει στην παθογένεια του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας, είναι η ικανότητά τους να ενισχύουν την ευαισθησία στη θανατηφόρο δράση της ενδοτοξίνης μέχρι και ένα εκατομμύριο φορές. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ανεπαρκή ηπατική απομάκρυνση της ενδοτοξίνης, λόγω της διαταραχής της ηπατικής λειτουργίας που προκαλείται από τα υπεραντιγόνα και στη συνεργική δράση του υπεραντιγόνου και της ενδοτοξίνης στην παραγωγή TNF- α από τα μακροφάγα [37, 51].

Το **σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας (TSS)** χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό οξείας έναρξης, διάχυτο ερυθματώδες εξάνθημα, απολέπιση μεγάλων επιφανειών του δέρματος (1 - 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της νόσου), υπόταση και πολυοργανική ανεπάρκεια συχνά με θανατηφόρο κατάληξη. Το σύνδρομο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Todd, το 1978, ως μία συστηματική νόσος που σχετίζεται με τον αποικισμό των βλεννογόνων από στελέχη *S. aureus*, ενώ τη δεκαετία του 1980, μετά από μία επιδημία σε νεαρές γυναίκες στις Η.Π.Α., το σύνδρομο συνδέθηκε με τη χρήση ταμπόν υψηλής απορροφητικότητας κατά τη διάρκεια της έμμηνου ρύσης. Για την παραγωγή TSST-1 από τον *S. aureus* απαιτείται, εκτός των άλλων (ζωικές πρωτεΐνες, χαμηλά επίπεδα γλυκόζης, θερμοκρασία 37-40°C, pH 6.5-8) και υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, συνθήκες οι οποίες, εκτός από το οξυγόνο, υπάρχουν στη μήτρα κατά τη διάρκεια της εμμηνορροϊκής απουσίας ταμπόν. Ο ρόλος του ταμπόν στην παθογένεια του συνδρόμου έγκειται στην εισαγωγή οξυγόνου στο φυσιολογικά αναερόβιο περιβάλλον της μήτρας, επιτρέποντας την παραγωγή TSST-1 μέσω της απενεργοποίησης του ρυθμιστικού συστήματος *Srr*. Η TSST-1 ήταν η πρώτη τοξίνη που σχετίστηκε με το σύνδρομο και μέχρι σήμερα ενοχοποιείται για το 75% όλων των περιπτώσεων. Παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S. aureus* που απομονώνονται από καλλιέργειες κολποτραχηλικού επιχρίσματος και αφορούν περιπτώσεις του συνδρόμου που σχετίζεται με την έμμηνο ρύση (menstruation-associated toxic shock syndrome), αλλά και από περίπου 50% των στελεχών που απομονώνονται από άλλα σημεία του σώματος, σε περιπτώσεις που το σύνδρομο δεν σχετίζεται με την έμμηνο

ρύση, καθώς το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας μπορεί να εμφανιστεί σε κάθε ασθενή με εστιακή σταφυλοκοκκική λοίμωξη, όπως οστεομυελίτιδα, πνευμονία, λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων ή μετεγχειρητικές λοιμώξεις. Η TSST-1 είναι εξωτοξίνη μοριακού βάρους 22.000 daltons, θερμοανθεκτική και ανθεκτική στην πρωτεόλυση, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *tst* που εδράζεται σε νησίδα παθογονικότητας με δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς σε άλλα στελέχη. Εκτός από την TSST-1, οι εντεροτοξίνες SEA, SEB και SEC έχουν, επίσης, ενοχοποιηθεί για την πρόκληση του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας [37,51,52]. Ωστόσο, η TSST-1 είναι το μόνο υπεραντιγόνο που διέρχεται τον βλεννογόνο της μήτρας και ως εκ τούτου είναι η μοναδική τοξίνη που προκαλεί το σχετιζόμενο με την έμμηνο ρύση σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας. Η απομάκρυνση των ταμπόν υψηλής απορροφητικότητας από το εμπόριο είχε ως αποτέλεσμα στις μέρες μας να επικρατεί η μορφή του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας που σχετίζεται με λοιμώξεις του χειρουργικού τραύματος [53].

Οι εντεροτοξίνες (SEs) διακρίνονται από τις άλλες τοξίνες της οικογένειας των υπεραντιγόνων από την ικανότητά τους να προκαλούν έμετο όταν λαμβάνονται από το στόμα [54]. Έτσι, είναι υπεύθυνες για τη σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση (Staphylococcal Food Poisoning, SFP), μία μορφή αυτοπεριοριζόμενης γαστρεντερίτιδας, που χαρακτηρίζεται από ναυτία, έμετο, κοιλιακά άλγη και διάρροια, χωρίς πυρετό ή άλλες συστηματικές εκδηλώσεις. Η λοίμωξη εκδηλώνεται 2-8 ώρες μετά την κατανάλωση μολυσμένης τροφής που περιέχει προσχηματισμένη τοξίνη και τα συμπτώματα υποχωρούν μέσα σε 24 ώρες. Οι εντεροτοξίνες που παράγει ο *S. aureus* επηρεάζουν το γαστρεντερικό σύστημα με πολλούς τρόπους. Ενεργοποιούν το συμπαθητικό νευρικό σύστημα διεγείροντας το πνευμονογαστρικό νεύρο, δρουν απευθείας στο εντερικό επιθήλιο και επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος του εντέρου. Οι SEA, SEB και SED είναι θερμοανθεκτικές τοξίνες και υπεύθυνες για τις περισσότερες επιδημίες σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης, ενώ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάποιες εντεροτοξίνες χαρακτηρίζονται, επίσης, από την ικανότητά τους να προκαλούν το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας. Οι διαφορές στις εκδηλώσεις της τροφικής δηλητηρίασης και του τοξικού συνδρόμου οφείλονται στις διαφορετικές οδούς έκθεσης στην εντεροτοξίνη. Οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις εντεροτοξίνες έχουν την ίδια πρωτοταγή και τριτοδιάστατη δομή με τις εντεροτοξίνες, αλλά δεν προκαλούν ή δεν έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν έμετο [37, 55].

Πίνακας 1. Τοξίνες που συνθέτει ο *S. aureus* και λοιμώξεις με τις οποίες σχετίζονται.

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	ΤΟΞΙΝΕΣ
Πυοδερματίτιδα	+/- PVL, Luk
Θυλακίτιδα	+/- PVL, Luk
Δοθιήνας	+/- PVL, Luk
Ψευδάνθρακας	+/- PVL, Luk
Κριθή	+/- PVL, Luk
Παρωνυχία	+/- PVL, Luk
Πνευμονία	+/- PVL, Luk
Οστεομυελίτιδα	-/+ PVL, Luk
Μικροβιακή αρθρίτιδα	-/+ PVL, Luk
Σύνδρομο τοξικής καταπληξίας	TSST-1, ETs, SEs
Τροφική δηλητηρίαση	SEs
Επιδερμολυτική νόσος	ETs
Μολυσματικό κηρίο	ETs, PVL, Luk
Μηνιγγίτιδα	-
Ενδοκαρδίτιδα	-
Βακτηριαμία	-
Εντεροκολίτιδα	-

2.4.2.4. Εξωκυττάρια ένζυμα

Εκτός από τις τοξίνες, ο *S. aureus* παράγει έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων που δεν παρουσιάζουν τοξινογόνο ή κυτταρολυτική δράση και τα οποία συμβάλλουν στην παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλεί. Αυτά περιλαμβάνουν διάφορες πρωτεΐνάσες, λιπάσες, υαλουρονιδάσες, νουκλεάσες και μεταλλοπρωτεΐνάσες, καθώς επίσης την κοαγκουλάση και την σταφυλοκινάση.

Η πηκτάση ή κοαγκουλάση (Coa) είναι μία εξωκυττάρια πρωτεΐνη που παράγεται από το 95% και πλέον των στελεχών *S. aureus* που απομονώνονται από τον άνθρωπο. Η παραγωγή της βοηθάει στο διαχωρισμό του *S. aureus* από την ομάδα των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλόκοκκων (CoNS). Προκαλεί πήξη του πλάσματος του κουνελιού και του ανθρώπου, όχι όμως του προβάτου. Συναντάται σε δύο μορφές: την ελεύθερη και τη συνδεδεμένη. Η ελεύθερη κοαγκουλάση είναι εξωτοξίνη που εκκρίνεται από τον *S. aureus* όταν αναπτύσσεται σε ζωμό, ενώ η συνδεδεμένη είναι προσκολλημένη στην επιφάνεια των σταφυλοκοκκικών κυττάρων που αναπτύσσονται σε στερεά θρεπτικά υλικά. Η ελεύθερη κοαγκουλάση προκαλεί πήξη του

πλάσματος συνδεδεμένη με έναν σφαιρινικό παράγοντα που βρίσκεται στο πλάσμα (coagulase reacting factor). Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιείται με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της ενεργοποίησης της προθρομβίνης σε θρομβίνη, μετατρέποντας το ινωδογόνο σε ινώδες. Αντίθετα, η συνδεδεμένη κοαγκουλάση προκαλεί συγκόλληση πυκνού εναιωρήματος σταφυλόκοκκου χωρίς τη μεσολάβηση του παράγοντα του πλάσματος. Η παραγωγή της συνδεδεμένης κοαγκουλάσης είναι ανεξάρτητη από την παραγωγή της ελεύθερης. Η κοαγκουλάση προφυλάσσει τον *S. aureus* από τη φαγοκυττάρωση, δημιουργώντας μία κάψα από ινική γύρω από το σημείο προσβολής του ιστού [5].

Η σταφυλοκινάση (SAK) ή ινωδολυσίνη είναι μία πρωτεΐνη που παράγεται από πολλά λοιμογόνα στελέχη *S. aureus* και δυνητικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, καθώς και δυνητικός θρομβολυτικός παράγοντας. Ο ρόλος της στην παθογένεια των λοιμώξεων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή της με το πλασμινογόνο και τις α-ντιφενσίνες (α-difensin) του ξενιστή. Οι α-ντιφενσίνες είναι βακτηριοκτόνα πεπτίδια, τα οποία παράγονται από τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Το σύμπλεγμα που δημιουργείται ανάμεσα στη σταφυλοκινάση και το πλασμινογόνο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πλασμίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που προκαλεί λύση του ινώδους, διευκολύνοντας τη διείσδυση του μικροβίου στους ιστούς του ξενιστή. Επίσης, η πλασμίνη προκαλεί την ενεργοποίηση μίας πρωτεΐνης της σερίνης στην επιφάνεια του μικροβιακού κυττάρου, η οποία οδηγεί στην αποδόμηση και απομάκρυνση της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G (IgG) και της C3b, προστατεύοντας έτσι τον *S. aureus* από τη φαγοκυττάρωση μέσω οψωνινοποίησης. Η σύνδεση της σταφυλοκινάσης με τις α-ντιφενσίνες εξουδετερώνει τη βακτηριοκτόνο δράση τους, συνεισφέροντας στην αντοχή του μικροβίου έναντι της φυσικής ανοσίας [5, 56].

Η υαλουρονιδάση, η οποία παράγεται από περισσότερο από 90% των στελεχών *S. aureus*, είναι ένζυμο που υδρολύει τα υαλουρονικά οξέα, δηλαδή τους όξινους βλεννοπολυσακχαρίτες που βρίσκονται στο μη ακυτταρικό στρώμα του συνδετικού ιστού. Προσδίδει διεισδυτικότητα στο μικρόβιο και διευκολύνει την εξάπλωσή του στους ιστούς [5, 19].

Οι λιπάσες παράγονται από όλα τα στελέχη *S. aureus*. Είναι ένζυμο που υδρολύουν τα λιπίδια, εξασφαλίζοντας με τη σημαντική αυτή λειτουργία την επιβίωση των σταφυλόκοκκων στις σηπματογόνες περιοχές του ανθρώπινου σώματος. Η παρουσία αυτών των ενζύμων θεωρείται απαραίτητη προκειμένου ο *S. aureus* να διεισδύσει στους δερματικούς και υποδόριους ιστούς και να αναπτυχθούν επιφανειακές δερματικές λοιμώξεις, όπως δοθιήνες, ψευδάνθρακας, ακμή [19].

Θερμοανθεκτική νουκλεάση παράγεται από 99% των στελεχών *S. aureus* και για τον λόγο αυτό θεωρείται αξιόπιστος δείκτης ταυτοποίησης του είδους. Η παραγωγή της συνδέεται με την

παραγωγή εντεροτοξινών, ωστόσο ο ακριβής ρόλος του ενζύμου στην παθογένεια της λοίμωξης παραμένει αδιευκρίνιστος [5, 19].

Οι πρωτεΐνες του *S. aureus* πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην κατάλυση της αντίστασης του ξενιστή μέσω της αποδόμησης των πρωτεϊνών του, στην ενίσχυση της διεισδυτικής ικανότητας του μικροβίου με την αποδόμηση των συστατικών του στρώματος (matrix) του ξενιστή, καθώς και στη διατροφή του βακτηριακού κυττάρου με την παραγωγή αμινοξέων που προκύπτουν από την αποδόμηση των πρωτεϊνών [57].

2.4.3. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ BIOMEMBRANΗΣ (BIOFILM)

Κάτω από ορισμένες συνθήκες ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να προσκολλάται σε διάφορες έμβιες επιφάνειες και βιοϊατρικά υλικά, σχηματίζοντας βιομεμβράνες (biofilms). Η βιομεμβράνη αποτελεί μία εναλλακτική μορφή ανάπτυξης του μικροβίου, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Η βιομεμβράνη είναι μία κοινότητα βακτηρίων με οργανωμένη δομή και λειτουργία, που περιβάλλεται από μία εξωκυττάρια πολυμερή ουσία και η οποία προσκολλάται σε διάφορες επιφάνειες. Η διαδικασία δημιουργίας της βιομεμβράνης περιλαμβάνει πέντε στάδια. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στη φάση της αρχικής αναστρέψιμης προσκόλλησης, όπου τα βακτήρια προσκολλούνται μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων στη στερεή επιφάνεια. Ακολουθεί το στάδιο της μη-αναστρέψιμης προσκόλλησης, το οποίο συντελείται με τη μεσολάβηση μίας μεγάλης ποικιλίας επιφανειακών προσκολλητίνων (MSCRAMMs). Το τρίτο στάδιο χαρακτηρίζεται από την κυτταρο-κυτταρική προσκόλληση και τη συνάθροιση των βακτηρίων με σχηματισμό μικροαποικιών. Στο στάδιο της ωρίμανσης η βιομεμβράνη αποκτά τη χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή της. Κατά το πέμπτο και τελικό στάδιο παρατηρείται αποκόλληση και διασπορά των βακτηρίων από τη βιομεμβράνη, επιτρέποντας στα βακτήρια είτε να αποκτήσουν την πλαγκτονική μορφή (ελεύθερα κινούμενα βακτήρια), είτε να δημιουργήσουν νέα βιομεμβράνη σε άλλη περιοχή. Τα βακτήρια μέσα στη βιομεμβράνη δεν δρουν ατομικά, αλλά συμπεριφέρονται ως ενιαίος πολυκύτταρος οργανισμός. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των συστημάτων διακυτταρικής επικοινωνίας (quorum sensing), τα οποία επιτρέπουν στα βακτήρια να επικοινωνούν και να ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση. Τα βακτήρια που ανευρίσκονται σε μορφή βιομεμβράνης είναι ανθεκτικά στη δράση των αντιβιοτικών και των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή [58, 59].

2.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΛΟΙΜΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ *S. AUREUS*

Ο έλεγχος της παραγωγής των περισσότερων λοιμογόνων παραγόντων του *S. aureus* επιτυγχάνεται μέσω ενός μεγάλου αριθμού ρυθμιστικών συστημάτων, μεταξύ των οποίων το καλύτερα χαρακτηρισμένο είναι το σύστημα *agr*. Το ρυθμιστικό σύστημα *agr* (accessory gene regulator) αποτελείται από δύο διαφορετικά οπερόνια που εκφράζονται από τους υποκινητές P2 και P3. Αυτοί οι δύο υποκινητές κατευθύνουν τη σύνθεση των RNAII και RNAIII, αντίστοιχα. Το RNAII κωδικοποιεί τέσσερις πρωτεΐνες, τις AgrA, AgrB, AgrC και AgrD. Το γονίδιο *AgrD* παράγει το αυτοεπαγόμενο πεπτίδιο AIP (autoinducing peptide, AIP), το οποίο τροποποιείται από την πρωτεΐνη AgrB και στη συνέχεια εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Όταν η συγκέντρωσή του ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο, τότε το πεπτίδιο AIP δεσμεύεται στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη AgrC, η οποία ενεργοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη AgrA, η οποία με τη σειρά της επάγει τη μεταγραφή των υποκινητών P2 και P3, με αποτέλεσμα την αυτορρύθμιση της σύνθεσης των RNAII και RNAIII. Το RNAIII είναι ο κύριος παράγοντας της ρύθμισης, καθώς ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τους λοιμογόνους παράγοντες. Όταν η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή, το σύστημα *agr* είναι ανενεργό με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών προσκόλλησης. Αντίθετα, όταν η πυκνότητα του βακτηρίου αυξηθεί, το πεπτίδιο AIP συγκεντρώνεται σε μεγάλες ποσότητες στον εξωκυττάριο χώρο των μικροβίων, ενεργοποιώντας το σύστημα *agr*, αναστέλλοντας την έκφραση των παραγόντων προσκόλλησης και προάγοντας την έκφραση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών [60].

Το σύστημα *agr* έχει μία υπερμεταβλητή περιοχή που περιλαμβάνει το γονίδιο *AgrD* και τμήματα των γονιδίων *AgrB* και *AgrC*. Σύμφωνα με τους πολυμορφισμούς αυτής της περιοχής, τα στελέχη *S. aureus* διαιρούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες (*agr*1-4), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να προκαλούν συγκεκριμένες λοιμώξεις. Ειδικότερα, τα στελέχη που προκαλούν ενδοκαρδίτιδα ανήκουν στις ομάδες 1 και 2, ενώ τα στελέχη που παράγουν την τοξίνη TSST-1 και τα στελέχη που παράγουν τις επιδερμολυτικές τοξίνες ανήκουν στις ομάδες *agr*3 και *agr*4, αντίστοιχα [17].

Η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του *S. aureus* βοήθησε στην αναγνώριση και πολλών άλλων ρυθμιστικών γονιδίων και συστημάτων, τα οποία επιτρέπουν στο βακτήριο να ελέγχει την έκφραση των διαφόρων λοιμογόνων παραγόντων, τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και τη λειτουργία των μεταβολικών οδών. Πολλά από τα ρυθμιστικά αυτά συστήματα δρουν μέσω του *agr* και άλλα ανεξάρτητα από αυτό, χρησιμοποιώντας πολύπλοκους μηχανισμούς σηματοδότησης.

2.6. ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΑΠΟ *S. AUREUS* - ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Ο άνθρωπος αποτελεί την κύρια φυσική δεξαμενή του *S. aureus* και παρά το γεγονός ότι πολλές περιοχές του ανθρώπινου σώματος μπορούν να αποικιστούν, η πλέον συχνή θέση ανάπτυξης του *S. aureus* είναι οι πρόσθιες ρινικές κοιλότητες (ρώθωνες) [61]. Άλλες σημαντικές θέσεις αποικισμού είναι ο φάρυγγας, το περίνεο και το δέρμα, ενώ ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο κόλπος και οι μασχάλες αποτελούν λιγότερο συχνές θέσεις [62]. Οι καλλιέργειες που λαμβάνονται από το δέρμα των χεριών των φορέων σταφυλόκοκκου είναι συνήθως θετικές για *S. aureus*. Το δέρμα θεωρείται ότι αποικίζεται δευτερογενώς από τους ρώθωνες και πιστεύεται ότι στις θέσεις αυτές τα στελέχη δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα [63]. Η εκρίζωση της ρινικής φορείας με τη χρήση τοπικών αντιβιοτικών οδηγεί κατά κανόνα σε εξάλειψη της φορείας και στις υπόλοιπες θέσεις αποικισμού, αποδεικνύοντας ότι οι πρόσθιες ρινικές κοιλότητες αντιπροσωπεύουν την κύρια οικολογική θέση του *S. aureus* [64]. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι σε κάποιες περιπτώσεις το δέρμα, ο φάρυγγας ή το περίνεο μπορεί να αποτελούν τις μοναδικές θέσεις αποικισμού χωρίς τη συνύπαρξη ρινικής φορείας [65]. Επιπλέον, δυνητικά ευνοϊκές θέσεις αποικισμού από *S. aureus* του ανθρώπινου σώματος αποτελούν και οι διάφορες δερματικές βλάβες, τα χρόνια έλκη, τα χειρουργικά τραύματα, καθώς και τα σημεία εισόδου ενδαγγειακών καθετήρων ή άλλων επεμβατικών συσκευών [61]. Παράλληλα, ο *S. aureus* αποικίζει και πολλά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων των κατοικίδιων και των κτηνοτροφικών ζώων, τα οποία πιθανόν να παίζουν ρόλο στον αποικισμό των ανθρώπων από στελέχη *S. aureus*. Τα στελέχη που απομονώνονται από ζώα ανήκουν συνήθως σε διαφορετικούς κλώνους σε σχέση με αυτά που ανευρίσκονται στους ανθρώπους [66].

Σύμφωνα με μελέτες όπου τα άτομα μελετούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα με επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες, μόλις το 20% του πληθυσμού παρουσιάζει εμμένουσα φορεία *S. aureus* (persistent carriers), ποσοστό 60% εμφανίζει διαλείπουσα φορεία (intermittent carriers), ενώ μόνο το 20% του πληθυσμού δεν αποικίζεται ποτέ από στελέχη *S. aureus* (persistent non-carriers) [62,67]. Συνεπώς, τα άτομα που κατατάσσονται ως φορείς *S. aureus* εμφανίζουν εμμένουσα ή διαλείπουσα φορεία. Η διάκριση των δύο αυτών καταστάσεων είναι σημαντική γιατί τα άτομα με εμμένουσα φορεία έχουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο, με αποτέλεσμα την αυξημένη διασπορά του *S. aureus* στον περιβάλλον, ενώ εμφανίζουν και υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης ενδογενών λοιμώξεων [63,67]. Επομένως, τα άτομα με εμμένουσα φορεία αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης του *S. aureus*, με συνέπεια τον παροδικό αποικισμό άλλων ατόμων. Παράλληλα, τα άτομα με εμμένουσα φορεία είναι συνήθως αποικισμένα με το ίδιο στέλεχος *S. aureus* για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ τα άτομα που χαρακτηρίζονται από διαλείπουσα φορεία φέρουν ανά διαστήματα διαφορετικά στελέχη [68].

Τα ποσοστά της φορείας ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με την ηλικία, με τα παιδιά να παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά εμμένουσας φορείας σε σχέση με τους ενήλικες. Τα νεογνά είναι πολύ ευπαθή, με το 50-70% να αποικίζεται εντός λίγων ημερών μετά τη γέννηση και με τη μητέρα να αποτελεί την κύρια πηγή αποικισμού. Εντούτοις, μετά από 6 μήνες περίπου τα ποσοστά πέφτουν στο 20% και στον πρώτο χρόνο στο 10-15% [69]. Αν και οι παράγοντες που οδηγούν στη μείωση των ποσοστών φορείας δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, γενετικοί παράγοντες του ξενιστή, ανοσολογικές αποκρίσεις, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων φαίνεται να ευθύνονται. Από την ηλικία του ενός έτους και έπειτα, το ποσοστό της ρινοφαρυγγικής φορείας αυξάνει και πάλι φτάνοντας στο μέγιστο επίπεδο στην ηλικία των 10 ετών περίπου. Κατά τη διάρκεια της εφηβείας πραγματοποιείται η μετάβαση από την εμμένουσα φορεία στη διαλείπουσα ή στην κατάσταση της μη-φορείας. Το ποσοστό της φορείας κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής παραμένει μάλλον σταθερό, με τους άντρες να παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τις γυναίκες. Μεταξύ των ηλικιωμένων τα ποσοστά της φορείας μειώνονται αργά προοίους της ηλικίας [61,62].

Ο *S. aureus* μεταδίδεται συνήθως μέσω της στενής σωματικής επαφής και πιο σπάνια μέσω περιβαλλοντικών πηγών, όπως είναι τα άψυχα αντικείμενα και ο αέρας, τόσο στην κοινότητα όσο και στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας. Η αερογενής διασπορά του *S. aureus* φαίνεται ότι είναι λιγότερο σημαντική από τη μετάδοση με άμεση επαφή. Τα στελέχη *S. aureus* εισάγονται στα νοσηλευτικά ιδρύματα μέσω αποικισμένων ή νοσούντων ασθενών, οι οποίοι αποτελούν την κύρια δεξαμενή διασποράς του μικροβίου και σπάνια από τους επαγγελματίες υγείας, τα ποσοστά φορείας των οποίων είναι παρόμοια με εκείνα που ανευρίσκονται μεταξύ των ενηλίκων στο γενικό πληθυσμό. Τα αντικείμενα που συχνά επιμολύνονται περιλαμβάνουν κλινοσκεπάσματα, ρούχα, συσκευές, καθώς και τον ιατρικό εξοπλισμό. Στην κοινότητα συνήθεις παράγοντες που ευνοούν τη μετάδοση του *S. aureus* είναι ο συνωστισμός, η συχνή σωματική επαφή, η συμμετοχή σε δραστηριότητες που έχουν ως αποτέλεσμα εκδορές ή παραβίαση του φραγμού του δέρματος, η κοινή χρήση δυνητικά μολυσμένων προσωπικών αντικειμένων και οι κακές συνθήκες ατομικής υγιεινής [61,62,63,70].

2.7. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ *S. AUREUS*

Η συσχέτιση μεταξύ της ρινικής φορείας και της ανάπτυξης λοίμωξης από *S. aureus* αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1931 από τον Danbolt, ο οποίος μελέτησε τη δοθιήνωση. Έκτοτε αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώθηκε από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι απέδειξαν ότι το στέλεχος *S. aureus* που ανευρίσκεται στους ρώθωνες και το στέλεχος που προκαλεί τη λοίμωξη εμφανίζουν τα ίδια γονοτυπικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι λοιμώξεις αναφέρονται ως «ενδογενείς», αφού οφείλονται σε στελέχη *S. aureus* που προέρχονται από τη βακτηριακή

χλωρίδα του ίδιου του ασθενούς, σε αντίθεση με τις «εξωγενείς λοιμώξεις», οι οποίες οφείλονται στη μεταφορά των παθογόνων στελεχών από άλλα άτομα, το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό ή το άψυχο περιβάλλον [71,72].

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα πιο κοινά παθογόνα που προκαλούν λοιμώξεις τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα. Τα δεδομένα από το πρόγραμμα αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY έδειξαν ότι ο *S. aureus* ευθύνεται κυρίως για λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (Skin and Soft Tissue Infections, SSTIs) με ποσοστό 39.2%, αλλά και για λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (23.2%), βακτηριαιμία (22%), λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα και άλλες λοιμώξεις (15.6%), που περιλαμβάνουν λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, του ουροποιητικού συστήματος και της κοιλίας [73]. Εντός του νοσοκομείου ο *S. aureus* ευθύνεται για ένα μεγάλο ποσοστό των λοιμώξεων του χειρουργικού πεδίου (19.5% - 30%), για βακτηριαιμίες που σχετίζονται με ενδαγγειακούς καθετήρες και για πολλές περιπτώσεις πνευμονίας συνδεδεμένης με την ύπαρξη αναπνευστήρα (20.5% - 28%) [74]. Στην κοινότητα ο *S. aureus* αποτελεί το κύριο αίτιο λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων (50% - 70%), οστεομυελίτιδας, βακτηριαιμίας (15% - 23.5%) και ενδοκαρδίτιδας τόσο φυσικών (31.6%) όσο και προσθετικών βαλβίδων (23%) [75].

Διάφορα υποκείμενα νοσήματα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης λοιμώξεων που οφείλονται στον *S. aureus*, όπως η κίρρωση του ήπατος, η HIV λοίμωξη, η τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι κακοήθειες, αλλά και οι χρόνιες δερματοπάθειες. Άλλοι παράγοντες που φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λοιμώξεις από *S. aureus* είναι η παρατεταμένη νοσηλεία, η συχνή λήψη αντιβιοτικών, η εισαγωγή σε μονάδες εντατικής θεραπείας ή μονάδες εγκαυμάτων, οι χειρουργικές επεμβάσεις, η ύπαρξη ιατρικών προθέσεων, η χρήση ενδοφλέβιων εξαρτησιογόνων ουσιών και η κατάχρηση αλκοόλ. Ωστόσο, οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου είναι ο αποικισμός από *S. aureus*, καθώς και η ύπαρξη ενδαγγειακών καθετήρων. Σπάνιοι αλλά κλασικοί παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν σε σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις είναι οι συγγενείς ή επίκτητες διαταραχές της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης. Στις συγγενείς διαταραχές της χημειοταξίας περιλαμβάνονται το σύνδρομο Job-Buckley, το σύνδρομο Chediak-Higashi, το σύνδρομο Wiskott-Aldrich και το σύνδρομο Down, ενώ οι επίκτητες διαταραχές της χημειοταξίας, που είναι συχνότερες, περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τη διαβητική κετοξέωση. Οι διαταραχές της οψωνινοποίησης και της φαγοκυττάρωσης, οι οποίες περιλαμβάνουν εκλεκτικές και συνδυασμένες ανεπάρκειες των ανοσοσφαιρινών και διαταραχές του συμπληρώματος, είτε είναι συγγενείς είτε επίκτητες, αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για όλους τους τύπους των πυογόνων λοιμώξεων [19,76,77,78,79].

Η εκδήλωση της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης είναι συνάρτηση της αντίστασης του ξενιστή και της λοιμογόνου δύναμης του μικροοργανισμού. Η προστασία του οργανισμού εναντίον του σταφυλόκοκκου βασίζεται κυρίως στην ακεραιότητα του δέρματος και των βλεννογόνων, που αποτελούν τους φραγμούς εισόδου του *S. aureus* στον οργανισμό, όπως επίσης και στον αριθμό και τη λειτουργικότητα των πολυμορφοπύρηνων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν το μικρόβιο. Η σταφυλοκοκκική λοίμωξη, της οποίας συνήθως προηγείται ο αποικισμός, χαρακτηρίζεται από έντονη διαπυητική φλεγμονή των ιστών και συμβαίνει όταν το μικρόβιο εισέρχεται σε φυσιολογικά στείρες περιοχές, μέσω σημείων όπου έχει επέλθει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων, όπως συμβαίνει σε τραυματισμούς, εξελκώσεις, χειρουργικές επεμβάσεις, εγκαύματα ή χρόνιες δερματοπάθειες. Ο πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού τοπικά στο σημείο της βλάβης, υπό την επίδραση των ενζύμων και τοξινών που εκκρίνει, οδηγεί σε περαιτέρω καταστροφή του ιστού, συρροή πολυμορφοπύρηνων, ιστική νέκρωση και σχηματισμό αποστήματος, που χαρακτηρίζει τις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις [19, 80,81]. Με το μηχανισμό αυτό και σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του μικροβίου εκδηλώνονται τοπικές λοιμώξεις στο σημείο εισόδου, όπως οι πυώδεις φλεγμονές του δέρματος και των μαλακών μορίων (μολυσματικό κηρίο, θυλακίτιδα, δοθιήνας, ψευδάνθρακας, κριθή, παρωνυχία, επιμολύνσεις τραυμάτων, εγκαυμάτων, ψωριασικών, εκζεματοειδών ή άλλων βλαβών που σχετίζονται με χρόνιες δερματοπάθειες), αλλά και σοβαρότερες εν τω βάθει λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία, εμπύημα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, βακτηριαιμία), που οφείλονται στη διασπορά του *S. aureus*, είτε κατά συνέχεια ιστού είτε με την αιματογενή οδό σε άλλες περιοχές του σώματος. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να προκαλεί λοιμώξεις και μέσω της παραγωγής τοξινών, όπως είναι το σύνδρομο της σταφυλοκοκκικής επιδερμικής νεκρόλυσης, το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας και η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση.

2.7.1. ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

2.7.1.1. Μολυσματικό κηρίο

Το μολυσματικό κηρίο είναι μία πολύ συχνή, ιδιαίτερα μεταδοτική λοίμωξη της επιδερμίδας που παρουσιάζεται σε όλες τις ηλικίες, με μεγαλύτερη συχνότητα όμως στα παιδιά. Η λοίμωξη εμφανίζεται με δύο κλινικές μορφές: το μη πομφολυγώδες και το πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο.

Στο μη πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο η χαρακτηριστική βλάβη είναι μία εύθραυστη μικρή φυσαλίδα ή φλύκταινα πάνω σε ερυθρηματώδη βάση, η οποία ρήγνυται γρήγορα, αποξηραίνεται και δημιουργείται μία χαρακτηριστική υποκίτρινη εφελκίδα, κάτω από την οποία

υπάρχει ρόδινη διάβρωση, χωρίς όμως έλκωση ή διήθηση, αφού το μολυσματικό κηρίο είναι πάθηση αποκλειστικά της επιδερμίδας. Σ' αυτό συμβάλλει το ένζυμο πηκτάση που παράγει ο *S. aureus*, το οποίο, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, προκαλεί καθίζηση ινικής στην επιφάνεια του βακτηρίου και γύρω από αυτό, με αποτέλεσμα ο σταφυλόκοκκος να παραμένει περιορισμένος στο άνω τμήμα της επιδερμίδας. Το πρόσωπο και κυρίως η περιοχή γύρω από τη μύτη και το στόμα, το τριχωτό της κεφαλής και τα άκρα αποτελούν τις συνηθέστερες εντοπίσεις της νόσου. Αν οι βλάβες παραμείνουν χωρίς θεραπεία, επεκτείνονται προοδευτικά προς την περιφέρεια, ενώ συγχρόνως εμφανίζονται και νέες, γιατί η νόσος είναι μεταδοτική και αυτοενοφθαλμίσιμη.

Το πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στον *S. aureus* ομάδας II (80%) και κυρίως στον τύπο 71 βακτηριοφάγο (60%), ο οποίος παράγει τις εξωκυττάρειες αποφολιδωτικές τοξίνες A και B, οι οποίες, όπως έχει ήδη περιγραφεί, προκαλούν διαχωρισμό της επιδερμίδας στο ύψος της κοκκώδους στιβάδας, λόγω καταστροφής της φιλαγκρίνης των δεσμοσωματίων. Έτσι, η ακανθόλυση των κερατινοκυττάρων και ο διαχωρισμός της κερατίνης στιβάδας που προκαλούνται, οδηγούν στην εμφάνιση φυσαλίδων και πομφολύγων. Από τις επιδερμολυτικές τοξίνες, με το πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο συνδέεται κυρίως η A. Κλινικά στο πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο η μικρή φυσαλίδα δεν ρήγνυται, αλλά εξελίσσεται σε πομφόλυγα χωρίς ερυθρηματώδη άλω. Η πομφόλυγα αρχικά περιέχει διαυγές υγρό, το οποίο σταδιακά γίνεται θολερό, οροπυώδες ή πυώδες. Στη συνέχεια η πομφόλυγα ρήγνυται και εμφανίζεται διάβρωση που καλύπτεται από μελιτόχροη εφελκίδα. Το εξάνθημα συνήθως εντοπίζεται στο πρόσωπο, στις παρατριμματικές περιοχές και στα χέρια, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και σε οποιοδήποτε άλλο σημείο του σώματος. Η ίαση των βλαβών και στις δύο κλινικές μορφές επέρχεται χωρίς να παραμείνει ουλή [82,83,84].



Εικόνα 5. Μη πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο.

(www.dermnet.com)



Εικόνα 6. Πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο.

(www.dermnet.com)

2.7.1.2. Θυλακίτιδα

Θυλακίτιδα ονομάζεται η φλεγμονή του τριχικού θυλάκου, η οποία χαρακτηρίζεται από θυλακικές βλατίδες και φλυκταινίδια. Ανάλογα με την ανατομική θέση της φλεγμονής, διακρίνεται σε επιπολής και εν τω βάθει θυλακίτιδα.

Η επιπολής θυλακίτιδα εντοπίζεται στην είσοδο του τριχικού θυλάκου, από τον πόρο του δέρματος μέχρι το σημείο εκβολής του σμηγματογόνου αδένα. Η βλάβη αρχίζει ως μία ερυθρή βλατίδα γύρω από μία τρίχα, στην κορυφή της οποίας γρήγορα εμφανίζεται ένα φλυκταινίδιο που περιέχει λευκοκίτρινο υγρό και περιβάλλεται από ερυθριματώδη άλω. Στη συνέχεια το φλυκταινίδιο ρήγνυται και σχηματίζεται εφελκίδα, ενώ η βλάβη ιάται χωρίς ουλή.

Αντίθετα, στην εν τω βάθει θυλακίτιδα η λοίμωξη επεκτείνεται και στο βάθος του τριχικού θυλάκου, κάτω από την εκβολή του πόρου του σμηγματογόνου αδένα. Έτσι, σχηματίζεται σκληρή και επώδυνη φλεγμονώδης διόγκωση, ενώ η επούλωση των βλαβών είναι αργή και μπορεί να παραμείνουν ουλές ή χηλοειδή με μόνιμη απόπτωση των τριχών. Επιπλέον, η εν τω βάθει θυλακίτιδα μπορεί να εξελιχθεί σε δοθιήνα ή απόστημα.

Οι βλάβες της θυλακίτιδας εντοπίζονται σε οποιοδήποτε έντριχο σημείο του σώματος, κυρίως όμως στο πρόσωπο, στο τριχωτό της κεφαλής, στον αυχένα, στους βραχίονες, στον κορμό, στους γλουτούς και στους μηρούς. Ιδιαίτερη κλινική μορφή της εν τω βάθει θυλακίτιδας αποτελεί η σταφυλοκοκκική σύκωση, όρος με τον οποίο περιγράφεται η χρόνια εν τω βάθει θυλακίτιδα από *S. aureus*. Η λοίμωξη αφορά όλο το μήκος του τριχικού θυλάκου και προσβάλλει κυρίως τους ενήλικες άνδρες. Εντοπίζεται στις παρειές και στο άνω χείλος, δηλαδή στην περιοχή του γενείου και χαρακτηρίζεται κλινικά από φλεγμονώδεις θυλακικές βλάβες, οι οποίες συρρέουν και σχηματίζουν πλάκες με επιφάνεια ερυθρή, υγρή και με λευκά στίγματα. Η εικόνα αυτή θυμίζει το εσωτερικό ώριμου σύκου, γι' αυτό και δόθηκε η ονομασία σύκωση. Οι τρίχες διατηρούνται, η νόσος μετά από θεραπεία ιάται χωρίς ουλές, αλλά οι υποτροπές είναι συχνές [82,85].



Εικόνα 7. Θυλακίτιδα. (www.dermnet.com)

2.7.1.3. Δοθίνας - Ψευδάνθρακας

Ο δοθίνας είναι μία οξεία νεκρωτική εν τω βάθει θυλακίτιδα και περιθυλακίτιδα που οφείλεται στον *S. aureus*. Ορισμένα βακτηριακά ένζυμα με κυριότερη την κυτταροτοξίνη PVL, όπως αναλυτικά περιγράφηκε παραπάνω, προάγουν τη δημιουργία φλεγμονής γύρω από τον θύλακα της τρίχας και ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του μικροβίου. Η παρουσία της φλεγμονής προάγει τη συσσώρευση των λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περιθυλακικού αποστήματος και τελικά τη νέκρωση και καταστροφή του τριχοθυλακίου. Πρόκειται για μία πολύ συχνή δερματική λοίμωξη που εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες. Η συχνή υποτροπή πολλών δοθίνων ονομάζεται δοθίνωση.

Ο δοθίνας αρχίζει ως ένα ερυθρό, σκληρό και επώδυνο θυλακικό οζίδιο που περιβάλλεται από οίδημα. Στο κέντρο του οζιδίου, γύρω από την έκφυση της τρίχας, σχηματίζεται φλυκταινίδιο με λευκοκίτρινο πυώδες περιεχόμενο. Καθώς η φλεγμονή και η νέκρωση επεκτείνονται, το φλυκταινίδιο αντικαθίσταται από εφελκίδα καφεκίτρινης χροιάς. Στη συνέχεια το κεντρικό τμήμα του οζιδίου γίνεται πιο μαλακό, διαπυείται και μικρή ποσότητα πύου παροχετεύεται. Στον πόρο που δημιουργείται (κρατήρας) εμφανίζεται το χαρακτηριστικό έμβολο του δοθίνα, το οποίο δημιουργείται από τη νέκρωση του τοιχώματος του τριχικού θυλάκου και του χορίου και αποτελείται από νεκρωμένους ιστούς, λευκοκύτταρα και σταφυλόκοκκους. Μετά την αποβολή του εμβόλου, αυτόματα ή με λαβίδα, η κοιλότητα που απομένει επουλώνεται από κοκκιωματοώδη ιστό και ο δοθίνας ιάται αφήνοντας ουλή. Ο δοθίνας συνοδεύεται από πόνο και ευαισθησία στην πίεση, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί πυρετός, κακουχία και διόγκωση των σύστοιχων λεμφογαγγλίων. Εμφανίζεται σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος που υπάρχουν τριχοσηγματικοί θύλακοι, αλλά συνήθως εντοπίζεται στον αυχένα, στη ράχη, στις μασχάλες, στους γλουτούς, στους μηρούς και στο πρόσωπο, κυρίως στον έξω ακουστικό πόρο και στο άνω χείλος του στόματος.

Ο ψευδάνθρακας εμφανίζεται από τη συρροή πολλών δοθίνων που επεκτείνονται στον βαθύτερο υποδόριο ιστό και εξελίσσεται παρόμοια με τον δοθίνα. Χαρακτηρίζεται από πολλαπλά εντοπισμένα αποστήματα του χορίου ή του υποδορίου, επιπολής φλύκταινες, νεκρωτικά βύσματα και στόμια που παροχετεύουν πύο. Ο ψευδάνθρακας συχνά συνοδεύεται από συστηματικά συμπτώματα όπως ρίγος, πυρετό και κακουχία, εκδηλώσεις που υποδηλώνουν τη συστηματική διασπορά του *S. aureus* σε άλλους ιστούς μέσω βακτηραιμίας [19,82,85,86,87].



Εικόνα 8. Λοθιήνας. (www.dermnet.com)



Εικόνα 9. Ψευδάνθρακας. (www.dermnet.com)

2.7.1.4. Σταφυλοκοκκικά αποστήματα

Τα αποστήματα που εμφανίζονται στο δέρμα αναπτύσσονται στο χόριο, στο υποδόριο λίπος, στους μύες ή σε διάφορες εν τω βάθει δομές και χαρακτηρίζονται από οίδημα, ερύθημα, άλγος, συσσώρευση πυώδους υλικού και ιστική καταστροφή. Αρχικά σχηματίζεται ένα ευαίσθητο, ερυθρό οζίδιο, εντός του κεντρικού χώρου του οποίου σταδιακά συλλέγεται πύο. Ένα πλήρως σχηματισμένο απόστημα χαρακτηρίζεται από κλυδασμό του κεντρικού τμήματος της βλάβης. Τα δερματικά αποστήματα εντοπίζονται σε οποιαδήποτε περιοχή του δέρματος, καθώς και σε θέσεις τραυμάτων και εγκαυμάτων [85]. Εκτός από τα δερματικά, στα αποστήματα που προκαλεί ο *S. aureus* περιλαμβάνονται αποστήματα εσωτερικών οργάνων και εμπυήματα κοιλοτήτων. Δημιουργούνται σε ανατομικές ή επίκτητες κλειστές κοιλότητες των ιστών όπου έγινε εγκατάσταση και ανάπτυξη του μικροβίου, με μηχανισμό παρόμοιο με εκείνον του σχηματισμού του δοθιήνα. Τα συνηθέστερα είναι αποστήματα εγκεφάλου, ήπατος, πνευμόνων και νεφρών [5].

2.7.1.5. Ερυσίπελας - Κυτταρίτιδα από *S. aureus*

Το ερυσίπελας και η κυτταρίτιδα είναι επεκτεινόμενες λοιμώξεις του χορίου και του υποδόριου ιστού, που αν και συνήθως προκαλούνται από τον β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο ομάδας Α, συχνός αιτιολογικός παράγοντας είναι και ο *S. aureus*. Χαρακτηρίζονται από μία οξεία, διάχυτη, εξαπλούμενη, οίδηματώδη, διαπυητική φλεγμονή του χορίου και του υποδόριου ιστού, που συχνά συνοδεύεται από συστηματικά συμπτώματα κακουχίας, πυρετού και ρίγους και μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία. Βασική πύλη εισόδου του μικροβίου αποτελεί η λύση της συνέχειας του δέρματος μέσω τραυματισμών, εξελκώσεων, εγκαυμάτων, δερματομυκητιάσεων, επιπολής πυοδερματίτιδων, ψωριασικών, εκζεματοειδών ή άλλων υποκείμενων δερματικών βλαβών, που διευκολύνουν την είσοδο του *S. aureus*.

Το ερυσίπελας είναι ένας διακριτός τύπος επιπολής δερματικής κυτταρίτιδας, με εκσεσημασμένη προσβολή των λεμφαγγείων του χορίου, που εμφανίζεται ως επώδυνη, εξέρυθρη, θερμή, επηρμένη, οίδηματώδης και διηθημένη πλάκα με επεκτεινόμενη και επηρμένη παρυφή (όχθο), η οποία διακρίνεται με σαφήνεια από το περιβάλλον υγιές δέρμα. Συνήθως συνυπάρχει σύστοιχη λεμφαδενίτιδα. Εντοπίζεται κυρίως στις κνήμες (85%) και το πρόσωπο, αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Η κυτταρίτιδα έχει πολλά από τα χαρακτηριστικά του ερυσιπέλατος, αλλά επεκτείνεται στους υποδόριους ιστούς, οι βλάβες δεν είναι επηρμένες και τα όριά τους είναι δυσδιάκριτα. Και στις δύο περιπτώσεις, ορισμένες φορές στην επιφάνεια της πλάκας εμφανίζονται φυσαλίδες, πομφόλυγες, πετέχειες ή νεκρώσεις μελανέρυθρης χροιάς, με αποτέλεσμα εκτεταμένες περιοχές επιδερμικής αποκόλλησης και επιφανειακών διαβρώσεων, ενώ συχνά σχηματίζονται και υποδόρια αποστήματα. Πολλές φορές υπάρχει αλληλοεπικάλυψη σε σχέση με τις στιβάδες της ιστικής προσβολής, γεγονός που καθιστά τη διαφορική διάγνωση ιδιαίτερα δύσκολη [82,85].

2.7.1.6. Κριθή - Παρωνυχία

Επιπρόσθετα, στις επιπολής δερματικές λοιμώξεις που προκαλεί ο *S. aureus* ανήκουν η κριθή, λοίμωξη των σμηγματογόνων αδένων στο βλέφαρο, καθώς και η παρωνυχία, η οποία είναι φλεγμονή κατά μήκος του περιονυχίου.

2.7.1.7. Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο

Το σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο ή σύνδρομο της σταφυλοκοκκικής επιδερμικής νεκρόλυσης ή νόσος Ritter (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS) είναι μία επιδερμολυτική νόσος που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη επιφανειακή απώλεια της επιδερμίδας και οφείλεται στις σταφυλοκοκκικές επιδερμολυτικές τοξίνες. Προκαλείται από τον *S. aureus* ομάδας II (τύποι φάγων: 3A, 3B, 3C, 55 και κυρίως ο 71). Οι επιδερμολυτικές τοξίνες A και B (ETA, ETB) που παράγει ο *S. aureus*, όπως περιγράφηκαν παραπάνω, είναι υπεύθυνες για την κλινική εικόνα της νόσου, καθώς προκαλούν αποκόλληση της επιδερμίδας στο ύψος της κοκκώδους στιβάδας και ακανθόλυση. Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1878 από τον Gottfried Ritter von Rittershain, σε νεογνά με φυσαλλιδώδη απολεπιστική δερματίτιδα, οι τοξίνες ταυτοποιήθηκαν 100 χρόνια αργότερα, ενώ ο μηχανισμός δράσης τους αναλύθηκε πολύ πρόσφατα. Το πομφολυγώδες μολυσματικό κηρίο, που περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω, θεωρείται η εντοπισμένη μορφή του σταφυλοκοκκικού αποφολιδωτικού συνδρόμου.

Η νόσος εμφανίζεται συνήθως σε νεογνά, κατά τους πρώτους 3 μήνες της ζωής τους, σε βρέφη και μικρά παιδιά, μέχρι την ηλικία των 2-5 ετών. Σε ενήλικες παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια και αφορά κυρίως ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια ή ανοσοανεπάρκεια. Το

σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο προέρχεται συνήθως από αιματογενή διασπορά του *S. aureus* από άλλες λοιμώξεις, όπως είναι η πυώδης επιπεφυκίτιδα, η μέση ωτίτιδα, η ομφαλίτιδα, η λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού και το μολυσματικό κηρίο. Η νόσος ξεκινά με πυρετό, υπερευαισθησία και εξάνθημα που χαρακτηρίζεται από γενικευμένη ερυθρότητα. Όταν το δέρμα τρίβεται ελαφρά, η επιδερμίδα συρρικνώνεται μη αντιστρεπτά, δίνοντας το χαρακτηριστικό σημείο Nikolsky. Η περιτοματική περιοχή και τα άκρα μπορεί να αποτελούν την αρχική εντόπιση με σταδιακή επέκταση σε όλο το σώμα. Μέσα σε 24-48 ώρες το οστρακιοειδές εξάνθημα εξελίσσεται και εμφανίζονται φυσαλίδες ή πομφόλυγες, μετά τη ρήξη των οποίων παρατηρούνται εκτεταμένες ορορρούσες διαβρώσεις και χαρακτηριστική επιφανειακή επιδερμόλυση και απολέπιση. Παρά τη δραματική κλινική εικόνα, οι βλάβες επουλώνονται γρήγορα σε 5-7 ημέρες χωρίς το σχηματισμό ουλών, αφού η αποφολίδωση αφορά μόνο την επιφανειακή στιβάδα της επιδερμίδας. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νόσου και σημαντικό διαφοροδιαγνωστικό κριτήριο είναι ότι οι βλεννογόνοι παραμένουν ανέπαφοι. Οι κλινικές μορφές του σταφυλοκοκκικού αποφολιδωτικού συνδρόμου περιλαμβάνουν: α) την εντοπισμένη μορφή του μολυσματικού κηρίου, β) τη γενικευμένη μορφή του μολυσματικού κηρίου, γ) την ερυθροδερμική μορφή, η οποία καταλήγει στην απολέπιση χωρίς την εμφάνιση του πομφολυγώδους σταδίου και δ) το γενικευμένο σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο. Η βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων εξαρτάται από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και κυρίως από την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των επιδερμολυτικών τοξινών. Στις καλλιέργειες που λαμβάνονται ο *S. aureus* απομονώνεται μόνο στο σημείο της λοίμωξης, δηλαδή στη θέση παραγωγής της τοξίνης, ενώ δεν ανευρίσκεται στα σημεία της απολέπισης ή στις πομφόλυγες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αιματογενή διασπορά της τοξίνης, η οποία παράγεται σε μία απομακρυσμένη περιοχή που έχει μολυνθεί από τον *S. aureus* [19,37,50,82,84,85].



Εικόνα 10. Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο (SSSS). (www.dermnet.com)

2.7.2. ΕΝ ΤΩ ΒΑΘΕΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Η είσοδος του *S. aureus* στην κυκλοφορία του αίματος οδηγεί σε συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού με κύριες εκδηλώσεις πυρετό, ρίγος, ταχύπνοια, ταχυσφυγμία, υπόταση, κακουχία, αρθραλγίες και θόλωση της διανοίας. Ο *S. aureus* προέρχεται από τοπικές δερματικές λοιμώξεις, εστιακές λοιμώξεις των μαλακών μορίων, λοιμώξεις τραυμάτων ή χειρουργικών επεμβάσεων, μολύνσεις ενδαγγειακών καθετήρων ή άλλων ιατρικών προσθετικών υλικών. Στην κλινική εικόνα της μικροβιαμίας-σηψαιμίας από τον *S. aureus* προστίθενται συχνά και οι κλινικές εκδηλώσεις των επιπλοκών της, που είναι οι μεταστατικές λοιμώξεις στα διάφορα όργανα. Πολλές φορές κατά τη διαδρομή της σηψαιμίας εμφανίζονται δερματικές εκδηλώσεις, οι οποίες έχουν τη μορφή εξανθήματος με φυσαλιδώδη εμφάνιση και πυώδες περιεχόμενο εντός των φυσαλίδων ή έχουν τη μορφή αιμορραγικού εξανθήματος. Στις μεταστατικές λοιμώξεις του *S. aureus* υπάγονται η πυώδης περικαρδίτιδα και ο σχηματισμός αποστημάτων στο ήπαρ, στους νεφρούς, στον εγκέφαλο και στους πνεύμονες. Τα αποστήματα σε κάθε όργανο είναι συνήθως πολλαπλά, λόγω της αιματογενούς διασποράς του μικροβίου [80].

2.7.2.1. Ενδοκαρδίτιδα

Σε ασθενείς με μικροβιαμία-σηψαιμία ο *S. aureus* μπορεί να προσβάλλει τις καρδιακές βαλβίδες και να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα. Το 25%-35% των περιπτώσεων μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας οφείλεται στον *S. aureus* [88,89]. Η ενδοκαρδίτιδα από *S. aureus* σπάνια προσβάλλει υγιείς βαλβίδες (< 5% των περιπτώσεων), ενώ είναι πολύ συχνότερη σε ασθενείς με προϋπάρχουσα βλάβη, όπως είναι η ρευματική βαλβιδοπάθεια, ή σε ασθενείς που έχουν υποστεί αντικατάσταση βαλβίδας με τεχνητή, αλλά και σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Η ενδοκαρδίτιδα από τον *S. aureus* παρουσιάζει οξεία εισβολή και ταχέως λαμβάνει τη μορφή της σηψαιμίας, με υψηλό πυρετό που συνοδεύεται από ρίγος. Οι εκδηλώσεις από την προσβολή των βαλβίδων ακολουθούν και συνίστανται κυρίως στην προοδευτική δυσλειτουργία τους με την εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας και των ανάλογων προς την πάσχουσα βαλβίδα φυσημάτων. Συχνά συνυπάρχουν σπληνομεγαλία, αιμορραγικές οζώδεις κηλίδες στα άκρα, εμβολικά επεισόδια και πτώση της αρτηριακής πίεσης [19,80].

2.7.2.2. Πνευμονία

Η σταφυλοκοκκική πνευμονία είναι συνήθως πρωτοπαθής, από εισπνοή του *S. aureus* και έχει συνήθως μονήρη εντόπιση, ή είναι δευτεροπαθής, διαμέσου μικροβιαμίας και έχει πολλαπλές εντοπίσεις σε περισσότερους του ενός λοβού του πνεύμονα. Στους εξωνοσοκομειακούς ασθενείς η πρωτοπαθής σταφυλοκοκκική πνευμονία ακολουθεί συνήθως τη γρίπη και τότε έχει θνητότητα

30%-50%. Η νοσοκομειακή πρωτοπαθής σταφυλοκοκκική πνευμονία είναι συνήθως αποτέλεσμα μόλυνσης του τραχειοβρογχικού δένδρου σε ασθενείς με διασωλήνωση της τραχείας ή με επεμβάσεις στον πνεύμονα. Τόσο η πρωτοπαθής όσο και η δευτεροπαθής πνευμονία από *S. aureus* χαρακτηρίζονται από ταχεία αποστηματοποίηση, γεγονός συμβατό με την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει κυτταροτοξικές τοξίνες και ένζυμα και να σχηματίζει εντοπισμένα αποστήματα και μπορεί να συνοδεύονται από πνευμοθώρακα ή εμπύημα θώρακα. Η νόσος εκδηλώνεται με υψηλό πυρετό, ρίγος, βήχα με πυώδη απόχρεμψη, πλευροδυνία και έντονη λευκοκυττάρωση με πολυμορφοπυρήνωση, ενώ στην ακτινογραφία θώρακος απεικονίζεται πνευμονική πύκνωση, με ταχεία εξέλιξη τη δημιουργία αποστήματος με χαρακτηριστική υδραερική εικόνα μέσα στην αποστηματική κοιλότητα. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία σοβαρή μορφή νεκρωτικής πνευμονίας της κοινότητας με μαζική αιμόπτυση, σηπτική καταπληξία και υψηλή θνητότητα, η οποία είναι συνδεδεμένη με στελέχη *S. aureus* που παράγουν την PVL [19,80,90].

2.7.2.3. Οστεομυελίτιδα - Σηπτική αρθρίτιδα

Η οστεομυελίτιδα και η σηπτική αρθρίτιδα είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης μόλυνσης των οστών ή των αρθρώσεων κατά τους τραυματισμούς ή τις χειρουργικές επεμβάσεις, είτε αιματογενούς διασποράς του *S. aureus* από άλλα όργανα ή από δερματικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις.

Η αιματογενής οστεομυελίτιδα από *S. aureus* προσβάλλει στις νεαρές ηλικίες τη μετάφυση των μακρών οστών, μία περιοχή οστικής ανάπτυξης με πολύ καλή αγγείωση, ενώ στους ενήλικες προσβάλλει συνήθως την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και προκαλεί εστιακή λοίμωξη του οστού με διαπύηση και ισχαιμική νέκρωση, που ακολουθείται από ίνωση και οστική επανόρθωση. Ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να προσκολλάται στα στοιχεία από συνδετικό ιστό του οστού. Η λοίμωξη οδηγεί σε παραγωγή φλεγμονώδους εκκρίματος, το οποίο συσσωρεύεται υπό πίεση στον μυελό και το φλοιό του οστού. Αρκετή ποσότητα πύου μπορεί να συσσωρευτεί στον υποπεριοστικό χώρο και να ανυψώσει το μη πάσχον περίοστεο, προκαλώντας διακοπή της παροχής αίματος από το περίοστεο, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας περιοχής νεκρωμένου οστού, που ονομάζεται απόλυμα. Η νόσος εκδηλώνεται με πυρετό, οίδημα και πόνο στο σημείο της λοίμωξης και συνοδεύεται από λευκοκυττάρωση με πολυμορφοπυρήνωση και αύξηση της Τ.Κ.Ε., ενώ στον ακτινολογικό έλεγχο διαπιστώνεται αρχικά η υπέργερση του περιόστεου και στη συνέχεια η λυτική εστία.

Η σηπτική αρθρίτιδα από τον *S. aureus* εκδηλώνεται με οίδημα των αρθρώσεων, ερυθρότητα και πόνο που εμποδίζει την κίνηση. Είναι συνήθης επιπλοκή σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και εμφανίζεται κυρίως στα γόνατα, στους αγκώνες, στα ισχία και στις μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις. Συνέπεια είναι η καταστροφή της άρθρωσης, που επιτελείται μέσα

σε λίγες μέρες και σχετίζεται με μία ισχυρή πολυκλωνική απάντηση των Β-λεμφοκυττάρων [19,80,91,92].

Το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας και η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση, λοιμώξεις που οφείλονται στην παραγωγή τοξινών από τον *S. aureus* και συγκεκριμένα της τοξίνης TSST-1 και των εντεροτοξινών αντίστοιχα, περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω στην ενότητα των τοξινών της οικογένειας των υπεραντιγόνων.

2.8. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ως μικροβιακή αντοχή ορίζεται η κατάσταση όπου ο μικροοργανισμός εμφανίζεται ανθεκτικός σε κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά του φάσματός του. Η ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής χρονολογείται από το 1940 και οφείλεται στην αυξανόμενη χρήση αντιβιοτικών σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας. Σήμερα, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Υπάρχουν δύο τύποι αντοχής των βακτηρίων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες: η φυσική ή ενδογενής αντοχή (intrinsic), η οποία βασίζεται σε σταθερά εγγενή χαρακτηριστικά του βακτηρίου και η επίκτητη αντοχή (acquired), η οποία αναφέρεται σε σημειακές μεταλλάξεις του χρωμοσωμικού DNA ή σε απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού (MGEs) από άλλα στελέχη μικροβίων. Οι μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά περιλαμβάνουν την παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά, την τροποποίηση του στόχου δράσης των αντιβιοτικών, την ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα και την ενεργητική απέκκριση των αντιβιοτικών μέσω αντλιών ενεργητικής αποβολής (efflux pumps) [93]. Η ταχύτητα με την οποία τα παθογόνα προσαρμόζονται στη χρήση των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη αντικατοπτρίζεται πολύ καλά στον *S. aureus*, ένα από τα πιο λοιμογόνα μικρόβια, που επιδεικνύει μία αξιοσημείωτη ικανότητα ταχείας ανάπτυξης αντοχής έναντι κάθε νέου αντιμικροβιακού παράγοντα, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο μελέτης και προβληματισμού για την ιατρική κοινότητα.

2.8.1. ΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι κύριοι αντιμικροβιακοί παράγοντες έναντι του *S. aureus* είναι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, μία μεγάλη ομάδα αντιβιοτικών με κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία στο μόριό τους του β-λακταμικού δακτυλίου, ο οποίος αποτελείται από τρία άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου. Σε αυτή την κατηγορία αντιβιοτικών περιλαμβάνονται οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοβακτάμες, οι καρβαπενέμες και οι αναστολείς των β-λακταμασών. Δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*, που αποτελείται κυρίως από την πεπτοδογλυκάνη (μουκοπεπτίδιο). Η δομή των β-λακταμικών αντιβιοτικών μοιάζει με το τελικό άκρο D-Ala-D-Ala του μουκοπεπτιδίου που συμμετέχει στη χιαστί σύνδεση (cross-linking)

γειτονικών αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η αντίδραση τρανσπεπτιδίου καταλύεται από τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs) που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών προϋποθέτει τη δέσμευση των PBPs, διεργασία που οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και στην ενεργοποίηση των αυτολυτικών ενζύμων του *S. aureus*, με αποτέλεσμα τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και το θάνατο του μικροβιακού κυττάρου. Ειδικότερα, οι PBPs καταλύουν το σχηματισμό γέφυρας πενταγλυκίνης μεταξύ των πεπτιδικών μερών δύο γειτονικών πεπτιδογλυκανικών αλυσίδων. Οι β-λακταμικοί παράγοντες δεσμεύονται σε αυτά τα μόρια εμποδίζοντάς τα να δράσουν, με συνέπεια την αναστολή του πολυμερισμού της πεπτιδογλυκάνης και τη διαταραχή της ομαλής λειτουργίας του κυττάρου. Επιπλέον, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, εκτός από την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, φαίνεται ότι επηρεάζουν και άλλες σταφυλοκοκκικές ιδιότητες. Όπως έχει αποδειχθεί, σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγουν την έκφραση λοιμογόνων παραγόντων, όπως της κοαγκουλάσης, των αιμολυσίνων και των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την ινωδονεκτίνη, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις επάγουν, ως απάντηση στο κυτταρικό stress, την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή αντοχή. Τέλος, είναι γνωστό ότι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά επάγουν την απάντηση-SOS (SOS-response), η οποία με τη σειρά της προάγει τη μεταφορά λοιμογόνων παραγόντων μεταξύ των βακτηρίων [94,95,96].

2.8.2. ANTOXH TOY *S. AUREUS* ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ANTIBIOTIKA

Η αντοχή του *S. aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλεται σε δύο κύριους μηχανισμούς δράσης: την αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από τις β-λακταμάσες (πενικιλλινάσες) και την έκφραση της τροποποιημένης πενικιλλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a, που έχει χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με αυτούς τους αντιμικροβιακούς παράγοντες [97].

2.8.2.1. Αντοχή του *S. aureus* στην Πενικιλλίνη

Στην προ των αντιβιοτικών εποχή η θνητότητα λόγω σηψαιμίας από τον *S. aureus* ανερχόταν στο 82%. Η εισαγωγή της πενικιλλίνης στην κλινική πράξη το 1941 επέφερε επανάσταση στη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων και οδήγησε σε ραγδαία μείωση των ποσοστών θνησιμότητας, καθώς και σε δραματική βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών με σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Ωστόσο, ήδη από το 1942 αναγνωρίστηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη στελέχη *S. aureus*, τα οποία μέσα στα επόμενα χρόνια επικράτησαν πρώτα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και στη συνέχεια εξαπλώθηκαν στην κοινότητα. Έτσι, μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1960 περισσότερο από το 80% των στελεχών που απομονώνονταν, τόσο στο

νοσοκομείο όσο και στην κοινότητα, ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, ενώ σήμερα το ποσοστό αυτό ξεπερνά το 90% [98].

Η αντοχή του *S. aureus* στην πενικιλίνη οφείλεται στην παραγωγή β-λακταμάσης (πενικιλινάσης) από το κύτταρο. Η β-λακταμάση είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο που συντίθεται όταν ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και δρα υδρολύοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του β-λακταμικού αντιβιοτικού. Τα στελέχη *S. aureus* που είναι ικανά να παράγουν β-λακταμάση είναι και ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση είναι το *blaZ* και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών γονιδίων *blaR1* και *blaI*, που μαζί αποτελούν το οπερόνιο *bla*. Το γονίδιο *blaR1* συνθέτει τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη BlaR1, της οποίας το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται εκτεθειμένο στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρωτεΐνη BlaR1 δρα ως αισθητήρας των β-λακταμικών αντιβιοτικών και απαιτείται για την επαγωγή του οπερονίου *bla*. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνδέονται στο καρβοξυτελικό άκρο της BlaR1, με αποτέλεσμα την αποκοπή τμήματος από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο έχει δράση πρωτεάσης διασπώντας την κατασταλτική πρωτεΐνη BlaI και επιτρέποντας στο γονίδιο *blaZ* να συνθέσει β-λακταμάση [99].

2.8.2.2. Αντοχή του *S. aureus* στη Μεθικιλίνη – Στελέχη MRSA – Σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες *mec* (SCC*mec*)

Το 1960 άρχισε η θεραπευτική χρήση της μεθικιλίνης, της πρώτης ημισυνθετικής αντισταφυλοκοκκικής πενικιλίνης με αντοχή στη δράση της β-λακταμάσης, για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη *S. aureus*. Ωστόσο, ένα χρόνο αργότερα περιγράφηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*, MRSA) στο Ηνωμένο Βασίλειο [100]. Τα στελέχη αυτά εξαπλώθηκαν τη δεκαετία του 1970 και στα τέλη της δεκαετίας του 1980 σε ολόκληρη την Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, αντίστοιχα. Αρχικά τα MRSA στελέχη εγκαταστάθηκαν στα νοσοκομεία και σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας, όπου η χρήση αντιβιοτικών είναι αυξημένη και ονομάστηκαν νοσοκομειακά MRSA στελέχη (Hospital-Associated ή Hospital-Acquired MRSA, HA-MRSA). Μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα τα στελέχη αυτά απέκτησαν αντοχή στα περισσότερα συνήθη αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των πρώτων πολυανθεκτικών HA-MRSA στελεχών. Έκτοτε οι λοιμώξεις από MRSA, που παρουσιάζουν συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση, έχουν εξελιχθεί σε ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Σύμφωνα με δεδομένα του Center for Disease Control (CDC) το 1974 οι λοιμώξεις από MRSA αντιπροσώπευαν το 2% του συνόλου των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων, το 1995 το 22% και το 2004 το 64% [101]. Μία παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στη μελέτη επιτήρησης που

διενεργήθηκε από το European Antimicrobial Surveillance System (EARSS) μεταξύ 1999-2005, η οποία έδειξε αυξανόμενο επιπολασμό του MRSA στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες (EARSS Annual Report 2005). Στις μέρες μας ο MRSA δεν περιορίζεται στους χώρους παροχής υγειονομικής περίθαλψης, αλλά έχει αναδυθεί ως παθογόνο της κοινότητας (Community-Associated ή Community-Acquired MRSA, CA-MRSA), σε κατά τα άλλα υγιή άτομα χωρίς ιστορικό επαφής με το σύστημα υγείας. Τα στελέχη αυτά ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους και εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο αντοχής σε σχέση με τα HA-MRSA στελέχη [102]. Η πρώτη επιδημία MRSA στην κοινότητα αναφέρθηκε το 1980 στο Detroit ανάμεσα σε χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών [103]. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι σε όλο τον κόσμο τα στελέχη CA-MRSA έχουν εισέλθει στο νοσοκομειακό περιβάλλον και τείνουν να εκτοπίσουν τα HA-MRSA στελέχη, λόγω καλύτερης προσαρμοστικότητας [102]. Η εμφάνιση και διασπορά των MRSA στελεχών θυμίζει αυτή των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών τη δεκαετία του 1940 [104].

Τα ευαίσθητα στη μεθικιλίνη στελέχη του *S. aureus* (Methicillin Sensitive *Staphylococcus Aureus*, MSSA) διαθέτουν τέσσερις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), τρεις υψηλού μοριακού βάρους (PBP1, PBP2, PBP3) και μία χαμηλού μοριακού βάρους (PBP4). Οι PBPs είναι DD-τρανσπεπτιδάσες που καταλύουν το τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, που πραγματοποιείται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη του *S. aureus* (MRSA) συνθέτουν μία επιπλέον PBP, την PBP2a, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA*. Η PBP2a έχει χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά σε σχέση με τις υπόλοιπες PBPs του κυττάρου και έχει δράση τρανσπεπτιδάσης όταν οι άλλες PBPs αδρανοποιούνται από υψηλές συγκεντρώσεις β-λακταμών στο περιβάλλον, επιτρέποντας στο βακτήριο να επιβιώνει και να αναπτύσσεται. Επιπλέον, για την πλήρη έκφραση της αντοχής στη μεθικιλίνη φαίνεται ότι απαιτείται και η PBP2, γεγονός που υποδηλώνει τη συνέργεια μεταξύ των δύο αυτών PBPs. Σε αντίθεση με την αντοχή που οφείλεται στις β-λακταμάσες (πενικιλινάσες), οι οποίες έχουν στενό φάσμα δράσης, η αντοχή στη μεθικιλίνη είναι ευρεία, προσδίδοντας αντοχή σε ολόκληρη την ομάδα των β-λακταμικών αντιβιοτικών [99,105].

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, τα στελέχη του *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA* είναι ανθεκτικά σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και λέγονται MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*). Η μεθικιλίνη δρα αναστέλλοντας τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, ενός βασικού δομικού συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*. Το γονίδιο *mecA* συνθέτει την τροποποιημένη χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης PBP, την PBP2a, που επιτελεί τις λειτουργίες των άλλων PBPs, αλλά είναι ανθεκτική στη δράση της μεθικιλίνης και όλων των άλλων β-λακταμικών

αντιβιοτικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα παρουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών να μην αναστέλλεται ο πολυμερισμός της πεπτιδογλυκάνης και κατ' επέκταση η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου [104,105].

Το γονίδιο *mecA*, που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της PBP2a, αποτελεί τμήμα μίας ευρύτερης περιοχής του χρωμοσώματος, του οπερονίου *mec*, στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και τα γονίδια *mecRI* και *mecI*. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *mecA* με παρόμοιο τρόπο με εκείνον της ρύθμισης του *blaZ* από τα γονίδια *blaRI* και *blaI*. Η έκφραση του *blaZ* που διαμεσολαβείται από το ρυθμιστικό σύστημα *blaRI-blaI* απαιτεί μόνο λίγα λεπτά, ενώ η επαγωγή του *mecA* από τα γονίδια *mecRI-mecI* χρειάζεται αρκετές ώρες, καθιστώντας έτσι τα στελέχη φαινοτυπικά ευαίσθητα παρά την παρουσία του γονιδίου αντοχής. Το πρόβλημα της αργής επαγωγής του *mecA* από τα ρυθμιστικά γονίδια *mecRI-mecI* ξεπερνιέται από την ικανότητα του εναλλακτικού συστήματος *blaRI-blaI* να επάγει την έκφραση του *mecA* και από μεταλλάξεις ή εξαλείψεις στα γονίδια *mecRI-mecI*, που καθιστούν αυτό το ρυθμιστικό σύστημα μη λειτουργικό, με αποτέλεσμα την ιδιοσυστατική παραγωγή της PBP2a. Έτσι, πολλά κλινικά στελέχη MRSA που χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, φέρουν ένα μη λειτουργικό ρυθμιστικό σύστημα *mecRI-mecI*. Ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της αντοχής και της λειτουργικότητας του *mecRI-mecI*, καθώς ορισμένα στελέχη που στερούνται *mecRI-mecI* εκφράζουν χαμηλό επίπεδο αντοχής, ενώ άλλα στελέχη που φέρουν ένα πλήρες λειτουργικό σύστημα *mecRI-mecI* παρουσιάζουν υψηλή αντοχή. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι άλλοι, ακόμη άγνωστοι παράγοντες, εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *mecA* και κατά συνέπεια στη φαινοτυπική έκφραση της αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ενδιαφέρον προκαλεί η διαπίστωση ότι η παρουσία του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την πενικιλινάση, διευκολύνει την απόκτηση του γονιδίου *mecA* και την έκφραση της αντοχής, προτείνοντας την ύπαρξη ενός φραγμού που εμποδίζει την εισαγωγή του γονιδίου σε ευαίσθητα στελέχη [99,104,106].

Το γονίδιο *mecA* και κατ' επέκταση το οπερόνιο *mec* εδράζονται σε μία ευρύτερη περιοχή του χρωμοσωμικού DNA (21-67 kb) του *S. aureus* που ονομάζεται σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec*) και κωδικοποιεί γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά και λοιμογόνους παράγοντες. Επί του παρόντος έχουν περιγραφεί έντεκα τύποι SCC*mec* σε στελέχη *S. aureus* (I-XI), εκ των οποίων οι τύποι I-V ανευρίσκονται πιο συχνά. Τα MRSA στελέχη της κοινότητας (CA-MRSA) συνήθως φέρουν τους SCC*mec* τύπους IV, V ή VII, ενώ τα στελέχη που σχετίζονται με το νοσοκομειακό περιβάλλον (HA-MRSA) συνήθως φέρουν τις μεγαλύτερες σε μέγεθος χρωμοσωμικές κασέτες *mec* I, II, III, VI ή VIII, αν και στις μέρες μας η διάκριση αυτή δεν είναι πάντα σαφής, αφού τα στελέχη που φέρουν τον SCC*mec* τύπο IV ολοένα και περισσότερο σχετίζονται με

νοσοκομειακές λοιμώξεις. Οι *SCCmec* τύποι I (34 kb), IV (21-24 kb) και V (28 kb) είναι μικροί σε μέγεθος και δεν φέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, πλην του γονιδίου *mecA*, που προσδίδει την αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ο τύπος I φαίνεται να είναι το τμήμα εκείνο που ενσωματώθηκε για πρώτη φορά στον *S. aureus*, με αποτέλεσμα να προκύψει ο αρχέγονος κλώνος των MRSA. Οι τύποι II (53 kb) και III (67 kb) έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, αφού φέρουν πρόσθετα γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα. Η ανάπτυξη πολυαντοχής παρέχει στα HA-MRSA στελέχη τη δυνατότητα επιβίωσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπου η υπερκατανάλωση αντιβιοτικών και η χρήση αντισηπτικών ασκούν «πίεση επιλογής» στα μικρόβια. Αντίθετα, τα CA-MRSA στελέχη που φέρουν τον τύπο *SCCmec* IV αντισταθμίζουν την έλλειψη πολυαντοχής με έναν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωσή τους, αφού επιτυγχάνουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο που τα καθιστά ανταγωνιστικά έναντι των άλλων βακτηρίων. Ο τύπος *SCCmec* IV παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με τους άλλους *SCCmec* τύπους και αποτελεί τον πιο ευρέως διαδεδομένο ανάμεσα στα MRSA στελέχη. Ανευρίσκεται σε εννέα διαφορετικά κλωνικά συμπλέγματα (Clonal Complex, CC) ή τύπους αλληλουχιών (Sequence Type, ST) MRSA, σε σύγκριση με μόλις δύο για τον τύπο I, τρία για τον τύπο II και δύο για τον τύπο III [98,104,107,108]. Οι τύποι IX, X και XI (30 kb) περιγράφηκαν πρόσφατα σε στελέχη MRSA που απομονώθηκαν από ζώα κτηνοτροφίας (Livestock-Associated MRSA, LA-MRSA) και η διάκρισή τους από τους υπόλοιπους κλώνους είναι σαφής. Αυτά τα ζωνοσογόνα στελέχη διασπείρονται πλέον στους εργαζόμενους στις κτηνοτροφικές μονάδες, αυξάνοντας τον αριθμό των MRSA στελεχών που ανευρίσκονται στον άνθρωπο [109].

Αν και η προέλευση του *SCCmec* μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη, θεωρείται ότι προέρχεται από κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους (CoNS) και ειδικότερα από τον *S. sciuri*. Οι μεθικιλίνη ευαίσθητοι *S. aureus* (MSSA) μπορούν εύκολα να αποκτήσουν *SCCmec* με οριζόντια μεταφορά και να μετατραπούν σε MRSA, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα διάφορα MRSA στελέχη έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα σε πολλές διαφορετικές περιπτώσεις. Τα MRSA στελέχη ανήκουν συνήθως σε συγκεκριμένους κλώνους, υποδηλώνοντας ότι προέρχονται από ορισμένα στελέχη MSSA με μεγαλύτερη ικανότητα ενσωμάτωσης του *mecA* [110].

Επιπρόσθετα, η περιοχή *SCCmec* είναι σημαντική διότι μπορεί να λειτουργεί ως «παγίδα» για διάφορα γονίδια αντοχής, εξηγώντας εν μέρει τον πολυανθεκτικό φαινότυπο που χαρακτηρίζει κάποια MRSA στελέχη. Μελέτες έδειξαν ότι τα MSSA στελέχη που αντιστοιχούν σε κύριους MRSA κλώνους ευκολότερα δέχονται και κωδικοποιούν το γονίδιο *mecA* σε σχέση με άλλα στελέχη, υποδεικνύοντας ότι συγκεκριμένα γενετικά υπόβαθρα μπορεί να είναι υπεύθυνα για τον φραγμό που ανακύπτει κατά τη διάρκεια της απόκτησης της *SCCmec*. Η διαπίστωση αυτή ίσως

εξηγεί το γεγονός ότι η σημερινή παγκόσμια διασπορά του MRSA εξακολουθεί να περιορίζεται σε λίγους επιτυχημένους επιδημικούς κλώνους [110].

2.9. ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟΣ MRSA (HA-MRSA)

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

Ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο τη δεκαετία του 1960 και έκτοτε ενδημεί στα νοσοκομεία όλου του κόσμου (Hospital Associated MRSA, HA-MRSA), όπου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων. Πρόκειται για στελέχη *S. aureus* πολυανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών [98]. Σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό του κέντρου ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC), ως νοσοκομειακά MRSA (HA-MRSA) ορίζονται τα στελέχη που απομονώνονται: i) σε περισσότερο από 48 ώρες μετά την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο, από καλλιέργειες που λαμβάνονται, ii) από άτομα με προηγούμενο ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης από MRSA, iii) από ασθενείς με ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας, διαμονής σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας, αιμοκάθαρσης ή χειρουργικής επέμβασης κατά τη διάρκεια του προηγούμενου έτους ή iv) από ασθενείς που φέρουν διαδερμικούς καθετήρες ή άλλες ιατρικές συσκευές, όπως τραχειοστομία, γαστροστομία, ουροκαθετήρα. Τα στελέχη τα οποία δεν πληρούν τον παραπάνω ορισμό χαρακτηρίζονται ως MRSA της κοινότητας (CA-MRSA) [70].

Σύμφωνα με τις διάφορες μεθόδους μοριακής τυποποίησης που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια, η συντριπτική πλειοψηφία των HA-MRSA στελεχών ανήκει σε έναν περιορισμένο αριθμό επιδημικών κλώνων (EMRSA), οι οποίοι προέκυψαν μετά από την επαναλαμβανόμενη εισαγωγή των διαφόρων SCCmec τύπων σε ήδη επιτυχημένους MSSA κλώνους, που ανήκουν σε πέντε κλωνικά συμπλέγματα (CC): CC5, CC8, CC22, CC30 και CC45. Η επικράτηση ενός μικρού αριθμού κλώνων δείχνει ότι ορισμένα HA-MRSA στελέχη έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διασπείρονται εντός του νοσοκομείου και ότι από τη στιγμή που εγκαθίστανται στο νοσοκομειακό περιβάλλον είναι δύσκολο να εξαλειφθούν. Οι επιδημικοί MRSA κλώνοι μοιράζονται ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο με τους επιτυχημένους MSSA κλώνους, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γενετικό υπόβαθρο πιθανόν να παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε αυτά τα στελέχη ανεξάρτητα από το προφίλ αντοχής στα αντιβιοτικά. Ωστόσο, παρά την επικράτηση λίγων μόνο κλώνων MRSA παγκοσμίως, μελέτες έδειξαν ότι τόσο η τοπική ποικιλομορφία των

στελεχών όσο και οι κύριοι MRSA κλώνοι αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου, με νέους κλώνους να εμφανίζονται ή να αντικαθιστούν τους παλαιότερους [104,111,112].

Ο συνδυασμός της μεθόδου MLST και του *SCCmec* τύπου αποκάλυψε ότι οι πέντε πανδημικοί HA-MRSA κλώνοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν πάνω από το 70% των HA-MRSA στελεχών είναι: ο Iberian (ST247-MRSA-IA), ο Brazilian (ST239-MRSA-IIIa), ο Hungarian (ST239-MRSA-III), ο New York / Japan (ST5-MRSA-II) και ο Pediatric (ST5-MRSA-IV). Εκτός, όμως, από αυτούς τους κλώνους (major clones), υπάρχουν και άλλοι οι οποίοι φαίνεται ότι περιορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (minor clones) ή απομονώνονται από ένα μικρό αριθμό ασθενών (sporadic clones), αν και λίγα γνωρίζουμε για αυτούς και τη δυναμική της εξάπλωσής τους [104,111,112]. Ο κλώνος Iberian απομονώνεται στα νοσοκομεία πολλών Ευρωπαϊκών χωρών, ενώ οι κλώνοι Brazilian, Hungarian και Pediatric ανιχνεύονται σε μικρότερο βαθμό [113]. Στην Αγγλία οι κλώνοι που ευθύνονται για την πλειονότητα των λοιμώξεων είναι ο ST22-IV (EMRSA-15) και ο ST36-II (EMRSA-16) [111], ενώ στη χώρα μας ο επικρατέστερος HA-MRSA κλώνος είναι ο ST239-MRSA-III/IIIa (Hungarian/Brazilian clone). Μία μελέτη που διεξήχθη στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Πάτρας κατά την περίοδο 1993-2000 έδειξε την προοδευτική μείωση ανίχνευσης του κλώνου ST30-MRSA-IV και την αύξηση του ST239-MRSA-III/IIIa, όπως επίσης και την εξάπλωση του ST80-MRSA-IV στο νοσοκομειακό περιβάλλον το 2000 [114]. Ο ST80-MRSA-IV είναι ένας από τους επικρατέστερους MRSA κλώνους της κοινότητας και η εμφάνισή του στο νοσοκομειακό περιβάλλον καταδεικνύει με τον καλύτερο τρόπο την ικανότητα των CA-MRSA στελεχών να διασπείρονται και να προκαλούν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Από την άλλη, οι HA-MRSA κλώνοι φαίνεται ότι προκαλούν λοιμώξεις στην κοινότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ορισμένοι κλώνοι έχουν την ικανότητα να διαχέονται από το νοσοκομείο στην κοινότητα. Έτσι, σε χώρες με υψηλό επιπολασμό MRSA στα νοσοκομεία, η ποικιλομορφία των στελεχών που ανευρίσκονται στην κοινότητα αντικατοπτρίζει την εικόνα των MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον [70,79,104,114].

Παράλληλα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των HA-MRSA κλώνων που ανευρίσκονται στην Ευρώπη, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κλώνων που ανευρέθηκαν στις διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, με τους επικρατέστερους να σχηματίζουν ευδιάκριτες γεωγραφικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι MRSA κλώνοι που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις στην Ευρώπη έχουν κατά κύριο λόγο συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή. Η γεωγραφική κατανομή των HA-MRSA κλώνων συνεπάγεται ότι οι κλώνοι αυτοί διασπείρονται μέσω του εθνικού συστήματος υγείας κάθε χώρας, για παράδειγμα μέσω της ενδονοσοκομειακής ή της διανοσοκομειακής μεταφοράς αποικισμένων ασθενών, αντί να εξαπλώνονται ελεύθερα στην κοινότητα [115,116].

Δεδομένα από το πρόγραμμα αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY έδειξαν ότι ο επιπολασμός του MRSA στα νοσοκομεία μεταξύ του 1997 και του 1999 ήταν 26.3% στην Ευρώπη, 22.4% στην Αυστραλία, 66.8% στην Ιαπωνία, 34.9% στη Λατινική Αμερική και 34.2% στις Η.Π.Α. Ο επιπολασμός του HA-MRSA στην Ευρώπη ποικίλλει, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στις χώρες της νότιας και δυτικής Ευρώπης (>40%) και τα χαμηλότερα στις χώρες της βόρειας Ευρώπης (<2%) [73]. Στην Ελλάδα ο επιπολασμός του HA-MRSA είναι από τους υψηλότερους στην Ευρώπη, με τον MRSA να ευθύνεται για το 40% όλων των διεισδυτικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Surveillance report. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2010). Επιπλέον, σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό των MRSA στελεχών παρατηρούνται και μεταξύ νοσηλευτικών ιδρυμάτων, τμημάτων νοσοκομείων και πληθυσμιακών ομάδων ασθενών, πολλές φορές στην ίδια γεωγραφική περιοχή. Η μεγάλη διακύμανση του επιπολασμού του MRSA μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές πολιτικές που εφαρμόζονται στις χώρες της Ευρώπης και αφορούν στον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων και στην ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών [115,116].

2.10. MRSA ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ (CA-MRSA)

Το 1982 στο Michigan απομονώθηκε το πρώτο MRSA στέλεχος από ασθενείς που έκαναν χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών, χωρίς προηγούμενη επαφή με το νοσοκομειακό περιβάλλον. Έκτοτε και κυρίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 παρατηρήθηκε μία μεγάλη αύξηση του αριθμού των λοιμώξεων, ιδιαίτερα των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων, από στελέχη MRSA σε άτομα στην κοινότητα, χωρίς προηγούμενη επαφή με το σύστημα υγείας. Η αύξηση αυτή σχετίστηκε με την εμφάνιση νέων MRSA στελεχών, των αποκαλούμενων MRSA της κοινότητας (Community- Associated ή Acquired MRSA, CA-MRSA), τα οποία εξαπλώθηκαν γρήγορα μεταξύ του γενικού πληθυσμού στα περισσότερα μέρη του κόσμου, προσβάλλοντας άτομα με ή χωρίς προηγούμενη έκθεση στο σύστημα παροχής υγειονομικής περίθαλψης [70,104].

Από τότε που ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο ικανό να προκαλεί λοιμώξεις στην κοινότητα, επιδημίες από CA-MRSA έχουν περιγραφεί σε διάφορες ομάδες πληθυσμών, που περιλαμβάνουν τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, τους αυτόχθονες κατοίκους διαφόρων περιοχών, τους κρατούμενους σε σωφρονιστικά ιδρύματα, τους ομοφυλόφιλους, τους συμμετέχοντες σε ομαδικά αθλήματα, τους εργαζόμενους σε βρεφονηπιακούς σταθμούς, τους επιζώντες φυσικών καταστροφών, τα παιδιά, το στρατιωτικό προσωπικό και τα άτομα χαμηλού κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου. Παρόλο που αυτές οι ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους, μοιράζονται κοινούς παράγοντες κινδύνου που μπορεί να αποτελούν τη βάση της μετάδοσης του MRSA στην κοινότητα. Οι παράγοντες αυτοί, που έχουν χαρακτηριστεί ως τα «5 Cs», είναι ο

συνωστισμός (crowding), η στενή σωματική επαφή (contact), η λύση της συνέχειας του δέρματος (compromised skin), η χρήση μολυσμένων αντικειμένων (contaminated objects) και η έλλειψη καθαριότητας (cleanliness). Η χρήση αντιβιοτικών αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου για αποικισμό από CA-MRSA στελέχη και έχει προταθεί ως το έκτο «C» (capsules). Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η ύπαρξη παιδιών στο σπίτι, η στενή επαφή με ασθενείς με λοιμώξεις δέρματος ή μαλακών μορίων από CA-MRSA, η κατάχρηση αλκοόλ, η HIV λοίμωξη, καθώς και πρόσφατα ταξίδια σε ενδημικές περιοχές. Τα CA-MRSA στελέχη προκαλούν διακριτά κλινικά σύνδρομα, μεταξύ των οποίων οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων αποτελούν τις πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις. Άλλες λοιμώξεις που σχετίζονται με τα CA-MRSA στελέχη είναι η νεκρωτική πνευμονία, η σηπτική θρομβοφλεβίτιδα και η σοβαρή σήψη [70].

Λόγω της εμφάνισης των MRSA στελεχών της κοινότητας και της ανάγκης διάκρισής τους από τα νοσοκομειακά στελέχη, το 2000 το κέντρο ελέγχου πρόληψης νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC) όρισε ως CA-MRSA τα στελέχη τα οποία απομονώνονται από ασθενείς στην κοινότητα ή εντός 48 ωρών από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο και οι οποίοι στερούνται παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Έτσι, αυτοί οι ασθενείς δεν πρέπει να έχουν ιστορικό λοίμωξης ή φορείας από MRSA ή ιστορικό νοσηλείας κατά τη διάρκεια του προηγούμενου ενός έτους, ούτε αιμοκάθαρσης, χειρουργικής επέμβασης, μόνιμου καθετήρα ή ιατρικών προσθετικών υλικών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η διάκριση μεταξύ των CA-MRSA και των HA-MRSA στελεχών γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη, καθώς τα CA-MRSA στελέχη έχουν πλέον εισέλθει και στο νοσοκομειακό περιβάλλον προκαλώντας λοιμώξεις σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα [70,102].

Τα CA-MRSA στελέχη συνήθως φέρουν τους μικρότερους σε μέγεθος *SCCmec* τύπους IV, V ή VII, είναι ανθεκτικά σε λιγότερες ομάδες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών σε σχέση με τα HA-MRSA και συνήθως φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL). Ωστόσο, άμεση σχέση των γονιδίων που κωδικοποιούν την PVL και της περιοχής *SCCmec* δεν έχει αποδειχθεί, αν και μεγάλο ποσοστό (40-90%) των MRSA στελεχών με *SCCmec* τύπου IV παράγουν και την PVL. Οι μικρότεροι σε μέγεθος *SCCmec* τύποι φαίνεται ότι παρέχουν στα στελέχη αυτά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης. Μέχρι σήμερα δεν έχει καθοριστεί ο λόγος για τον οποίο ο *SCCmec* τύπος IV σχετίζεται με τα επικρατέστερα CA-MRSA στελέχη και γιατί τα στελέχη που φέρουν τον τύπο V δεν είναι τόσο διαδεδομένα [70,104,112]. Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι παρόλο που ο *SCCmec* τύπος IV χαρακτηρίζει τα CA-MRSA στελέχη, κάποιοι από τους σημαντικότερους επιδημικούς νοσοκομειακούς κλώνους, όπως είναι ο ST22 και ο Παιδιατρικός κλώνος, φέρουν επίσης αυτόν τον *SCCmec* τύπο [111]. Ο *SCCmec* τύπος V ανευρίσκεται σε CA-MRSA στελέχη που επικρατούν κατά κύριο λόγο στην Αυστραλία και την Ταϊβάν [70], ενώ το 2004 ανιχνεύτηκαν τα

πρώτα ST377, με *SCCmec* τύπο V, PVL-θετικά στελέχη στη χώρα μας, καθώς και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες [117].

Σε αντίθεση με τα HA-MRSA στελέχη, τα CA-MRSA είναι ευαίσθητα στα περισσότερα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά και αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του *SCCmec* τύπου IV, ο οποίος στερείται γονιδίων που προσδίδουν αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά. Μάλιστα, η ευαισθησία σε περισσότερες από δύο κατηγορίες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών έχει χρησιμοποιηθεί από κάποιους ως κριτήριο για την αναγνώριση των CA-MRSA στελεχών. Τα CA-MRSA στελέχη εμφανίστηκαν στην κοινότητα λόγω της οριζόντιας μεταφοράς των *SCCmec* τύπων IV και V, των γονιδίων της PVL, καθώς και άλλων λοιμογόνων παραγόντων και γονιδίων αντοχής στο γονιδίωμα ήδη ευρέως διαδεδομένων MSSA κλώνων. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι τα στελέχη CA-MRSA που επικρατούν σήμερα έχουν αναπτυχθεί μετά από πολλές δεκαετίες πολύπλοκης εξέλιξης. Η PVL μολονότι συνδέεται επιδημιολογικά με τους επικρατέστερους CA-MRSA κλώνους, δεν είναι γνωστός με βεβαιότητα ο ρόλος που διαδραματίζει στην καλύτερη προσαρμοστικότητα και λοιμογονικότητα αυτών των στελεχών. Η μέθοδος MLST, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της γενετικής εξέλιξης των MRSA στελεχών, έδειξε ότι υπάρχουν αρκετοί CA-MRSA κλώνοι με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Όπως συμβαίνει και με τους HA-MRSA κλώνους, οι επικρατέστεροι CA-MRSA κλώνοι συνήθως ανευρίσκονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά που πιθανόν σχετίζονται με κοινωνικο-οικονομικούς παράγοντες και με την εφαρμογή πολιτικών ορθής χρήσης των αντιβιοτικών και ελέγχου των λοιμώξεων στις διάφορες χώρες. Έτσι, τα CA-MRSA στελέχη εξαπλώθηκαν αρχικά σε τοπικό επίπεδο, ενώ με την πάροδο του χρόνου οι επιτυχημένοι CA-MRSA κλώνοι εξαπλώθηκαν ευρέως σε όλο τον κόσμο, ως αποτέλεσμα της μαζικής μετανάστευσης και της μεγάλης αύξησης του αριθμού των διεθνών ταξιδιών [46,47,48,70,104].

Οι επικρατέστεροι CA-MRSA κλώνοι παγκοσμίως είναι ο ST1 (USA400), ο ST8 (USA300), ο ST80, ο ST30, ο ST59 και ο ST93. Ο ST1 (USA400) είναι ο κλώνος που κυριαρχούσε στις Η.Π.Α. όταν αναγνωρίστηκαν τα πρώτα CA-MRSA στελέχη στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Ο κλώνος αυτός, παρά την ικανότητά του να προκαλεί σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις, σύντομα αντικαταστάθηκε από τον ST8 (USA300), τον επικρατέστερο σήμερα CA-MRSA κλώνο στις Η.Π.Α. και στον Καναδά, ο οποίος φέρει την *SCCmec* τύπου IV, παράγει την PVL, είναι συνήθως ευαίσθητος σε πολλά μη β-λακταμικά αντιβιοτικά και ενοχοποιείται για λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, αλλά και για βακτηριαιμίες. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί και σε χώρες της δυτικής Ευρώπης, στην Ιαπωνία και στην Αυστραλία, αλλά παραμένει ασυνήθιστη αιτία λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων στην κοινότητα στις περιοχές αυτές [70,102,104,118].

Αντίθετα με την επικράτηση του ST8 (USA300) στις Η.Π.Α., στην Ευρώπη κυκλοφορούν πολλοί διαφορετικοί CA-MRSA κλώνοι. Ο ST80 είναι ο συνηθέστερος και για το λόγο αυτό αποκαλείται και Ευρωπαϊκός κλώνος. Φέρει την *SCCmec* τύπου IV, καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν την PVL, ενώ συνήθως παρουσιάζει ένα προφίλ αντοχής στα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά, το οποίο χαρακτηρίζεται από αντοχή στο φουσιδικό οξύ, την τετρακυκλίνη και την καναμυκίνη. Ανιχνεύεται σε όλες σχεδόν τις Ευρωπαϊκές χώρες, καθώς και στην Ελλάδα, ως μία ολοένα αυξανόμενη αιτία λοιμώξεων στην κοινότητα. Λιγότερο συχνά ανευρίσκεται και σε άλλα μέρη του κόσμου. Ο κλώνος αυτός πιθανόν να εμφανίστηκε αρχικά στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή ή τη βόρεια Αφρική, αφού τα πρώτα κρούσματα που καταγράφηκαν στην Ευρώπη αφορούσαν ασθενείς με ιστορικό πρόσφατου ταξιδιού σε αυτές τις περιοχές [46,115,119,120].

Ο κλώνος ST30, που φέρει επίσης την *SCCmec* τύπου IV και παράγει PVL, είναι άμεσος απόγονος του MSSA κλώνου 80/81, ο οποίος ήταν νοσοκομειακό παθογόνο στις Η.Π.Α. κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960. Είναι γνωστός ως κλώνος Southwest Pacific (SWP), αφού ευθύνεται κυρίως για λοιμώξεις στην Αυστραλία, αλλά από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 ανιχνεύεται επίσης και σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου, συμπεριλαμβανομένων των Η.Π.Α., της Λατινικής Αμερικής, της Μέσης Ανατολής και της Ευρώπης. Ο κλώνος ST59 επικρατεί στην Ταϊβάν, με τα PVL-θετικά στελέχη να φέρουν διαφορετικούς *SCCmec* τύπους, ενώ στελέχη ST59 έχουν απομονωθεί και από ασθενείς στις Η.Π.Α., στην Αυστραλία, στην Ολλανδία, στη Δανία και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Ο ST93 CA-MRSA κλώνος ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 2000 στο Queensland και στο New South Wales της Αυστραλίας, όπου και επικρατεί, ενώ σπάνια ανιχνεύεται στις άλλες ηπείρους [70,104,120].

Τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη έχουν εμφανιστεί πολλοί νέοι κλώνοι, όπως ο κλώνος ST398-IV/V στην Ολλανδία και στη Δανία, ο PVL-θετικός κλώνος ST152-V στα Βαλκάνια, ο ST150 στη Σουηδία, ο ST377-V στην Ελλάδα, καθώς και οι αρνητικοί PVL κλώνοι ST45 και ST1 στην Ελβετία και στην Αγγλία, αντίστοιχα. Ο κλώνος ST398-IV/V, που εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ολλανδία και στη Δανία το 2003, σχετίζεται με τα κτηνοτροφικά ζώα. Ο κλώνος αυτός βρέθηκε να αποικίζει ένα μεγάλο ποσοστό των χοίρων και των χοιροτρόφων σε αυτές τις χώρες και έχει την ικανότητα να προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο. Η μεγάλη διασπορά του USA300, του Ευρωπαϊκού κλώνου (ST80), καθώς και του ST398-IV/V τα τελευταία χρόνια, καταδεικνύει ότι ορισμένοι κλώνοι θα μπορούσαν μελλοντικά να εξαπλωθούν σε παγκόσμιο επίπεδο [119,120,121].

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

διδυμικές λοιμώξεις [117,122,123,124,125,126,127]. Επιπρόσθετα, ο νέος PVL-θετικός κλώνος ST377-V, αλλά και ο ST398 έχουν περιγραφεί πρόσφατα σε μελέτες που διεξήχθησαν στη Λάρισα και στην Πάτρα [117,125,128].

Παρά την παγκόσμια αύξηση των λοιμώξεων από στελέχη CA-MRSA, τα ποσοστά φορέας MRSA στον υγιή πληθυσμό παραμένουν χαμηλά. Ακόμα και στις Η.Π.Α., όπου ο CA-MRSA είναι ευρέως διαδεδομένος, ο επιπολασμός της ρινικής φορέας MRSA σε ένα μεγάλο δείγμα υγιών ατόμων ήταν μόλις 1.5% το 2003-2004 [129]. Ομοίως, φαίνεται ότι ο επιπολασμός της φορέας CA-MRSA είναι χαμηλός στις περισσότερες περιοχές της Ευρώπης, με τα ποσοστά όμως να καταγράφουν ανοδική τάση [130]. Ωστόσο, η δραματική αύξηση του ποσοστού των MRSA στελεχών στην κοινότητα σε συνδυασμό και με την ικανότητα ανάπτυξης πολυαντοχής, διατηρούν αυτά τα στελέχη στην πρώτη γραμμή του ιατρικού ενδιαφέροντος τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Ακόμα και στις Σκανδιναβικές χώρες και στην Ολλανδία, όπου ο επιπολασμός του HA-MRSA είναι πολύ χαμηλός, οι λοιμώξεις από CA-MRSA στελέχη έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, παρά την αυστηρή εφαρμογή πολιτικών ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών και στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων [131]. Αυτή η διαπίστωση προκαλεί σοβαρές ανησυχίες και δημιουργεί νέες προκλήσεις για τον έλεγχο των λοιμώξεων και την προσπάθεια περιορισμού της εξάπλωσης του MRSA στην κοινότητα σε παγκόσμιο επίπεδο.

2.11. ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *S. AUREUS*

Οι κλασικές μέθοδοι τυποποίησης του *S. aureus*, που χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες, βασίζονται στη μελέτη των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του μικροβίου, ενώ οι γονοτυπικές μέθοδοι αφορούν σύγχρονες μοριακές τεχνικές, οι οποίες στοχεύουν στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού. Μία τεχνική για να θεωρηθεί κατάλληλη ως τυποποιητική μέθοδος θα πρέπει να είναι σε θέση να χαρακτηρίσει όλα τα υπό εξέταση στελέχη, να έχει υψηλή διακριτική ικανότητα, μεγάλη επαναληψιμότητα και χαμηλό κόστος.

Οι πλέον διαδεδομένες φαινοτυπικές μέθοδοι είναι η οροτυπία, η βιοτυπία, η λυσιτυπία (βακτηριοφαγική τυποποίηση) και η ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Η ορολογική τυποποίηση βασίζεται στο χαρακτηρισμό των στελεχών *S. aureus* με βάση τον τύπο του πολυσακχαριδικού περιβλήματος (καψίδιο). Η βιοτυπία βασίζεται στην ταξινόμηση των στελεχών με βάση τα βιοχημικά, τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά και τη μορφολογία των αποικιών. Η λυσιτυπία στηρίζεται στην ιδιότητα των βακτηρίων να λύνονται από συγκεκριμένους βακτηριοφάγους. Τέλος, η ευαισθησία στα αντιβιοτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό των στελεχών, αν και η αξία του αντιβιογράμματος ως μεθόδου τυποποίησης είναι περιορισμένη, καθώς στελέχη που δεν σχετίζονται επιδημιολογικά ή γενετικά μπορεί να παρουσιάζουν όμοιο φαινότυπο αντοχής [5,19].

Το 2001 αποκωδικοποιήθηκε πλήρως το γονιδίωμα του πρώτου στελέχους *S. aureus* [7], συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής πορείας των σταφυλόκοκκων. Τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση και η διασπορά πολυανθεκτικών κλώνων, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα, σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, αλλά και την πρόοδο της πληροφορικής, οδήγησαν στην ανάπτυξη μίας πλειάδας μοριακών τεχνικών για τη μελέτη του γενετικού υλικού των στελεχών *S. aureus*. Η χρήση των μοριακών μεθόδων, οι οποίες εφαρμόζονται πλέον ευρέως τόσο στα πλαίσια ελέγχου των λοιμώξεων σε τοπικές επιδημίες όσο και σε μελέτες του τρόπου διασποράς των επιδημικών κλώνων σε παγκόσμια κλίμακα, οδήγησε σε μία νέα προσέγγιση στην τυποποίηση και τη μελέτη της επιδημιολογίας των στελεχών *S. aureus*. Οι σημαντικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη μοριακή τυποποίηση του *S. aureus* είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE), η μέθοδος τυποποίησης πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST), η οποία εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, η μέθοδος τυποποίησης μονοτοπικού προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*spa* typing) και η τυποποίηση με βάση τους *SCCmec* τύπους [104,132].

2.11.1. PFGE

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ των *S. aureus* στελεχών είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο του γονιδιακού DNA του βακτηρίου (PFGE). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πέψη του χρωμοσώματος των υπό μελέτη στελεχών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και στην ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων που προκύπτουν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η χαμηλή περιεκτικότητα του γονιδιώματος του *S. aureus* σε G+C ευνοεί τη χρήση της ενδονουκλεάσης *SmaI*, η οποία αναγνωρίζει πλούσιες σε G+C αλληλουχίες. Οι διαφορές των ηλεκτροφορημάτων που προκύπτουν και οι οποίες απεικονίζουν τις διαφορετικές θέσεις που δρα η περιοριστική ενδονουκλεάση στο χρωμόσωμα κάθε στελέχους, είναι γνωστές ως Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στη διερεύνηση τόσο των νοσοκομειακών εξάρσεων όσο και στη μελέτη των επιδημικών MRSA κλώνων (EMRSA) σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρόλο που η PFGE εξακολουθεί να θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την τυποποίηση των *S. aureus* στελεχών και κυρίως των MRSA στελεχών, το χρονοβόρο της διαδικασίας, το υψηλό κόστος, η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και η έλλειψη μίας κοινής ονοματολογίας σε διεθνές επίπεδο έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην αναζήτηση και εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων μοριακής τυποποίησης [133].

2.11.2. MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Η μέθοδος MLST είναι σήμερα η βασικότερη τεχνική μοριακής τυποποίησης του *S. aureus* που εφαρμόζεται, καθώς βασίζεται σε πολλαπλά γονίδια και εκμεταλλεύεται στο μέγιστο τις δυνατότητες του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA και του διαδικτύου. Η μέθοδος στηρίζεται στη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων, περίπου 450-500 bp, επτά γονιδίων (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes), τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα στελέχη του είδους. Οι διαφορές στην αλληλουχία των γονιδίων προκύπτουν ως αποτέλεσμα της φυλογενετικής εξέλιξης των βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου και οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Ένα τμήμα του κάθε γονιδίου πολλαπλασιάζεται με την τεχνική της PCR και στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία του (DNA sequencing). Οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων συγκρίνονται με τις αντίστοιχες άλλων στελεχών, οι οποίες είναι καταχωρημένες στην ιστοσελίδα του προγράμματος MLST (<http://saureus.mlst.net>). Οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια για το κάθε γονίδιο μεταβολισμού. Ο συνδυασμός των αλληλίων των επτά γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προφίλ (allelic profile), το οποίο χαρακτηρίζει το κάθε στέλεχος *S. aureus* και αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Καθώς υπάρχουν πολλά αλλήλια για κάθε ένα από τα επτά γονίδια μεταβολισμού, είναι απίθανο πανομοιότυπα προφίλ αλληλίων να έχουν προκύψει τυχαία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα στελέχη με το ίδιο προφίλ αλληλίων να κατατάσσονται στον ίδιο κλώνο, ενώ τα στελέχη που έχουν ίδια τουλάχιστον τα πέντε από τα επτά αλλήλια γονιδίων να ομαδοποιούνται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (Clonal Complex, CC). Πιο συγκεκριμένα, οι ST τύποι που διαφέρουν σε ένα από τα επτά γονίδια ορίζονται ως Single Locus Variants (SLV), ενώ οι τύποι που διαφέρουν σε δύο γονίδια ορίζονται ως Double Locus Variants (DLV). Συνεπώς, τα κλωνικά συμπλέγματα αποτελούνται συνήθως από έναν αρχικό γονότυπο (founding genotype) και από έναν αριθμό φυλογενετικά συγγενικών κλώνων. Για τον καθορισμό και τη μελέτη των κλωνικών συμπλεγμάτων χρησιμοποιείται το λογισμικό πρόγραμμα eBURST, που ανευρίσκεται στην ιστοσελίδα του MLST (<http://eburst.mlst.net>). Από τη στιγμή που έχει καταχωρηθεί ο τύπος του κάθε στελέχους, είναι εύκολα συγκρίσιμος με όλα τα υπόλοιπα στελέχη που ήδη υπάρχουν καταχωρημένα, αλλά και με κάθε νέο στέλεχος που τυποποιείται και εισάγεται στη συνέχεια στη βάση δεδομένων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πληροφορίες είναι διαθέσιμες σε μία διαδικτυακή βάση δεδομένων, η οποία περιλαμβάνει εκτός των άλλων τις αλληλουχίες των εκκινητών, το πρωτόκολλο της μεθόδου, όπως επίσης διάφορες μηχανές αναζήτησης και προγράμματα λογισμικού, συμπεριλαμβανομένου και του eBURST. Η MLST θεωρείται η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για τη μελέτη της φυλογενετικής εξέλιξης των στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο.

Αντίθετα, είναι ακατάλληλη ως μέθοδος για τη μελέτη επιδημικών εξάρσεων που εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια μικρών χρονικών περιόδων, αφού τα γονίδια που αποτελούν τους στόχους της MLST μεταλλάσσονται βραδέως [13,111].

2.11.3. ΜΕΘΟΔΟΣ *spa*

Η μέθοδος *spa* είναι μία μοριακή τεχνική τυποποίησης, η οποία βασίζεται σε ένα μόνο γονίδιο και συγκεκριμένα στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μίας μεταβλητής περιοχής του γονιδίου της πρωτεΐνης A (*spa*). Το γονίδιο αυτό απαρτίζεται από μία περιοχή που σχετίζεται με το τμήμα της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών και από την περιοχή X. Η περιοχή X περιέχει ποικίλο αριθμό (3-17) επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repeats) μήκους 24 ζευγών βάσεων και αποτελείται από δύο περιοχές, την Xr (Short Sequence Repeat, SSR) και την Xc (μεμβρανικό τμήμα). Η διαφοροποίηση μεταξύ των τύπων *spa* και άρα μεταξύ των διαφόρων στελεχών προκύπτει τόσο από απαλείψεις και εισδοχές ολόκληρων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όσο και από σημειακές μεταλλάξεις. Η ύπαρξη συντηρημένων περιοχών, που οριοθετούν την περιοχή X, επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό τους με PCR και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, σε συνδυασμό και με τη χρήση ειδικών για τον *S. aureus* λογισμικών προγραμμάτων. Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι βασίζεται σε ένα δομικό γονίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να εμφανίζει σημαντικές αλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα. Οι σημειακές μεταλλάξεις συσσωρεύονται αργά, ενώ αντίθετα η απώλεια και ο διπλασιασμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών πραγματοποιούνται με γρήγορο ρυθμό. Ως αποτέλεσμα, η συγκεκριμένη μοριακή μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση τόσο των επιδημικών εξάρσεων σε περιορισμένο χώρο και χρόνο, όσο και για τη μελέτη της παγκόσμιας επιδημιολογίας και διασποράς των στελεχών *S. aureus*, καθώς και των MRSA. Η μέθοδος συσχετίζεται στενά με την MLST, αφού σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα της τεχνικής *spa* μπορούν να προβλέψουν τους κυρίαρχους MLST κλώνους [134].

2.11.4. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΚΑΣΕΤΕΣ *SCCmec*

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των MRSA στελεχών, όπως έχει προαναφερθεί, είναι η ύπαρξη των σταφυλοκοκκικών χρωμοσωμικών κασετών *mec* (*SCCmec*), οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή και το γονιδιώμά τους και ως εκ τούτου ταξινομούνται σε διαφορετικούς τύπους. Οι *SCCmec* τύποι καθορίζονται από το συνδυασμό της δομικής τάξης του γονιδίου *mec* και του τύπου *ccr*, ενώ οι υπότυποι καθορίζονται με βάση τους πολυμορφισμούς των περιοχών J. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της πολλαπλής PCR [135]. Η τυποποίηση με βάση τους

SCCmec τύπους έχει καθιερωθεί ως μία σημαντική μέθοδος για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των MRSA στελεχών. Η σπουδαιότητα της μεθόδου αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η πρόταση του Enright και των συνεργατών του, οι οποίοι πρότειναν ότι ο χαρακτηρισμός των MRSA κλώνων πρέπει να γίνεται με βάση το συνδυασμό του ST και του *SCCmec* τύπου (π.χ. ST5-MRSA-II), είναι σήμερα ομόφωνα αποδεκτή [111]. Ωστόσο, λόγω των ασαφειών και αντιφάσεων στο χαρακτηρισμό των *SCCmec* τύπων που παρατηρήθηκαν τα προηγούμενα χρόνια στη βιβλιογραφία, η διεθνής ομάδα για την ταξινόμηση των κασετών *SCCmec* (the International Working Group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome elements, IWG-SCC) εξέδωσε πρόσφατα κατευθυντήριες οδηγίες για τον προσδιορισμό και την κατάταξη των διαφόρων *SCCmec* τύπων (www.sccmec.org).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Στη μελέτη περιελήφθησαν όλα τα στελέχη *S. aureus*, τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων ασθενών με δερματικές βλάβες, κατά τη διάρκεια μίας χρονικής περιόδου 4 μηνών, από τον Οκτώβριο 2013 έως και τον Ιανουάριο 2014. Το σύνολο των στελεχών *S. aureus* που μελετήθηκαν, απομονώθηκαν από ασθενείς, οι οποίοι είτε εξετάστηκαν στο Εξωτερικό Δερματολογικό Ιατρείο, είτε νοσηλεύτηκαν στην Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και οι οποίοι εμφάνιζαν κλινικά ένα ευρύ φάσμα σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων. Έτσι, τα κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν προήλθαν από διαφορετικές πυώδεις φλεγμονές του δέρματος και των μαλακών μορίων, όπως μολυσματικό κηρίο, θυλακίτιδα, δοθιήνες, ψευδάνθρακες και επιμολύνσεις ψωριασικών και εκζεματοειδών βλαβών που σχετίζονταν με χρόνιες δερματοπάθειες. Για όλους τους αντίστοιχους ασθενείς, από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη *S. aureus* που μελετήθηκαν, συλλέχθηκαν πληροφορίες από το αρχείο ασθενών των εξωτερικών ιατρείων και του κλειστού τμήματος νοσηλείας της Πανεπιστημιακής Δερματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, οι οποίες περιελάμβαναν απαραίτητα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία.

Στην παρούσα εργασία όλα τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους και είδους με τη χρήση φαινοτυπικών τεχνικών και τυποποιήθηκαν με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια. Τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν ως MRSA ή MSSA ανάλογα με την αντοχή ή ευαισθησία τους, αντίστοιχα, στα δύο β-λακταμικά αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά οξακιλλίνη (oxacillin) και κεφοξιτίνη (cefoxitin), σύμφωνα με τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά που πραγματοποιήθηκε και βάσει του αντιβιογράμματος που προέκυψε. Επιπρόσθετα, τα στελέχη *S. aureus* ταξινομήθηκαν είτε ως στελέχη της κοινότητας (Community-Associated ή Community-Acquired, CA- *S. aureus*), είτε ως νοσοκομειακά στελέχη (Hospital-Associated ή Hospital-Acquired, HA- *S. aureus*), σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό του κέντρου ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) [70]. Έτσι, ως στελέχη της κοινότητας ορίστηκαν τα στελέχη *S. aureus*, τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες που ελήφθησαν εντός 48 ωρών από την προσέλευση ή εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο και από ασθενείς χωρίς: i) ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης από *S. aureus*, ii) ιστορικό νοσηλείας, διαμονής σε μονάδα

μακροχρόνιας φροντίδας, αιμοκάθαρσης ή χειρουργικής επέμβασης κατά τη διάρκεια του προηγούμενου έτους, ή iii) διαδερμικούς καθετήρες ή άλλες ιατρικές συσκευές. Τα στελέχη *S. aureus* που δεν πληρούσαν τον παραπάνω ορισμό χαρακτηρίστηκαν ως στελέχη νοσοκομειακής προέλευσης.

3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

3.2.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΕΝΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΔΟΥΣ

Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως *S. aureus* σύμφωνα με τη μορφολογία των αποικιών των καλλιεργημάτων στο στερεό θρεπτικό υλικό αιματούχο άγαρ, όπου μετά από επώαση σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂ στους 37°C για 24 ώρες, εμφανίζονταν οι χαρακτηριστικές για τον *S. aureus* λευκές έως χρυσοκίτρινες αποικίες, που περιβάλλονταν από ζώνη αιμολύσεως. Εκτός από τη χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών, για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών χρησιμοποιήθηκε η χρώση Gram, καθώς και οι δοκιμασίες ελέγχου παραγωγής καταλάσης και κοαγκουλάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπως περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

3.2.1.1. Δοκιμασία χρώσης κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος. Ο μηχανισμός της χρώσης Gram συνδέεται με τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων και βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετνιανής και διάλυμα Lugol (ιώδιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, γεγονός που αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωο από τη σαφρανίνη. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως είναι ο *S. aureus*, η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο του κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου της χρωστικής εντός του κυττάρου [136]. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με τη μεθοδολογία που ακολουθεί:

ΥΛΙΚΑ

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

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

3.2.1.2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης αποτελεί την πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή μεταξύ των Gram θετικών κόκκων. Είναι θετική για τους σταφυλόκοκκους, χαρακτηριστικό που τους διακρίνει από τους στρεπτόκοκκους και τους εντερόκοκκους, οι οποίοι είναι καταλάση-αρνητικοί. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε H₂O και O₂ παράγοντας μικρές φυσαλίδες [5]. Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης των υπό μελέτη απομονωθέντων στελεχών της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase (BioMerieux) με την εξής μέθοδο:

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ID Color Catalase-ASE (BioMerieux)
- Κρικοφόροι στυλεοί
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

3.2.1.3. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης (κοαγκουλάσης)

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

Σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί στο Γενικό Μέρος, ο *S. aureus* φέρει δύο είδη πηκτάσης, τη συνδεδεμένη και την ελεύθερη. Η συνδεδεμένη πηκτάση βρίσκεται καθηλωμένη στο κυτταρικό τοίχωμα και μετατρέπει άμεσα το ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες, χωρίς τη συμμετοχή του παράγοντα του πλάσματος που μοιάζει με την προθρομβίνη (coagulase reating factor), προκαλώντας τη συγκόλληση και τη συσώρευση των σταφυλοκοκκικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, όπως επίσης προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη A βρίσκεται στην επιφάνεια των στελεχών *S. aureus* και έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών σχεδόν όλων των θηλαστικών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιζημάτων ή διαλυτών συμπλεγμάτων [5,19,22].

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

ΥΛΙΚΑ

- Εμπορικό αντιδραστήριο
- Καλλιεργήματα σταφυλόκοκκων σε αιματούχο άγαρ
- Αναλώσιμες κάρτες πεδίων αντίδρασης
- Κρικοφόροι στυλεοί

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στον έναν κύκλο μίας αναλώσιμης κάρτας πεδίων αντίδρασης τοποθετείται μία σταγόνα αντιδραστήριου, σε θερμοκρασία δωματίου (18°-25°C), η οποία με τη βοήθεια ενός κρικοφόρου στυλεού αναμιγνύεται με 3-6 μικρές αποικίες του προς μελέτη μικροοργανισμού. Έπειτα από 20 δευτερόλεπτα κυκλικής ανάδευσης, παρατηρείται η αντίδραση κάτω από κανονικές συνθήκες φωτισμού και χωρίς τη χρήση μεγεθυντικού φακού. Αν ο σταφυλόκοκκος παράγει συνδεδεμένη κοαγκουλάση και συνεπώς πρόκειται για *S. aureus*, η δοκιμασία είναι θετική, καθώς παρατηρείται μία ορατή αντίδραση συγκόλλησης. Στην πράξη το εναιώρημα θα «κόψει», δηλαδή θα σχηματιστούν αμέσως κατά την ανάδευση πήγματα μικρά και μεγάλα [5].

3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ VITEK-2

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

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

αντίστοιχα, στα δύο β-λακταμικά αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά οξακιλλίνη (oxacillin) και κεφοξιτίνη (cefoxitin), βάσει του αντιβιογράμματος.

3.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ – ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA EXTRACTION)

Μετά την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών της παρούσας εργασίας, με τη βοήθεια των φαινοτυπικών διαδικασιών που περιγράφηκαν παραπάνω, ακολούθησε η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA τους. Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής ιατρικής και κατ' επέκταση της μοριακής μικροβιολογίας και η απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή, μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και των μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως είναι οι πυρήνες, αποτελεί την προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία.

Η απομόνωση χρωμοσωμικού γενομικού υλικού (DNA) επιτυγχάνεται συνήθως με μεθόδους που στηρίζονται στη λύση των κυττάρων με το ένζυμο της πρωτεϊνάσης K, υπό την παρουσία αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και ενός ανιονικού απορρυπαντικού διαλύτη (όπως Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) [137]. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης του χρωμοσωμικού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

1. Καλλιέργημα *S. aureus* σε αιματούχο άγαρ
2. Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer) (V_τ=50 mL):
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 1% Triton X-100
 - 1 mM EDTA, pH 8.0
3. Πρωτεϊνάση K (20 mg/mL)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

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

3.4.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

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

Η PCR ως τεχνική κατέστη δυνατή με τη χρήση θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης για την ενίσχυση ειδικών τμημάτων DNA σε ένα δείγμα, εντός του οποίου βρίσκονται και διαφορετικά μόρια DNA, εκτός του DNA-στόχου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η PCR βρήκε θαυμάσια εφαρμογή στη μικροβιολογία, τόσο για την τυποποίηση και την επιδημιολογική μελέτη των μικροοργανισμών, όσο και για τη βασική έρευνα, η οποία τα τελευταία χρόνια γνωρίζει θεαματική ανάπτυξη. Η PCR, ως ειδική και ευαίσθητη μέθοδος, χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων βακτηρίων και ιών, αλλά και μυκήτων και παρασίτων, τόσο σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και σε δείγματα τροφίμων. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kits, η αύξηση της σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος, η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για ειδικές αλληλουχίες DNA, μέσω τεχνικών αλληλούχισης (sequencing), επέτρεψε την επίλυση αρχικών προβλημάτων εφαρμογής της μεθόδου στα διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια.

3.4.2.1. Βασικές αρχές της μεθόδου

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA κατέχει κεντρική θέση στις μελέτες της Μοριακής Ιατρικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται στην επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Για την επίτευξη αυτού του στόχου απαιτούνται:

α) ένα μητρικό μόριο DNA, το οποίο αποτελεί την αλληλουχία-στόχο ή τον DNA-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο.

β) μία DNA πολυμεράση, δηλαδή το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στην αντιγραφή του DNA, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και η επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5'- 3'. Καμία από τις γνωστές πολυμεράσες δεν έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν *de novo* DNA. Οι πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νουκλεοτίδια μόνο σε προϋπάρχον 3'- OH άκρο, με απαραίτητη την παρουσία αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων. Στη βιολογική δράση αρκετών πολυμερασών, αλλά όχι όλων, συμπεριλαμβάνεται και η επιδιόρθωση των λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (proofreading).

γ) αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινητές (*primers*), δηλαδή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA.

δ) νουκλεοτίδια (*dNTPs*), τα οποία είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση.

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

1. **Στάδιο αποδιάταξης (*denaturation*)** του DNA, το οποίο πραγματοποιείται με θέρμανση του μείγματος μέχρι περίπου τους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου, όσο και των εκκινητών, που πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

2. **Στάδιο αναδιάταξης ή ανασύνδεσης ή υβριδισμού (*annealing*)** των εκκινητών, κατά το οποίο πραγματοποιείται αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης το μείγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40°C έως 70°C. Στο στάδιο αυτό ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.

3. **Στάδιο επιμήκυνσης (*extension*)**, κατά το οποίο πραγματοποιείται συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από μία DNA πολυμεράση. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι περίπου 72°C.

Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Με τη συμπλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ακολούθως ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά.

Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους. Κατά τη διάρκεια των θερμικών κύκλων οι αντιδράσεις επέκτασης ενός εκκινητή καταλήγουν σε διαφορετικές αποστάσεις από την αρχή του κάθε εκκινητή, με αποτέλεσμα στα προϊόντα πολλαπλασιασμού να περιέχονται εκτός του DNA-στόχου και έλικες DNA με απροσδιόριστο μήκος (μη ειδικό προϊόν PCR). Ωστόσο, μετά τον δεύτερο κύκλο γίνεται συσσώρευση ενός ειδικού προϊόντος πολλαπλασιασμού, το οποίο περιλαμβάνει μόνο την αλληλουχία-στόχο και γίνεται με την πάροδο του χρόνου το κυρίαρχο προϊόν. Πρόκειται για το προϊόν της PCR, το λεγόμενο **amplicon**. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος αντίδρασης, διπλασιάζεται η αλληλουχία του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του ειδικού προϊόντος. Το μεγαλύτερο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης πολλαπλασιασμού είναι ένα τμήμα διπλής έλικας DNA, του οποίου το τελευταίο άκρο ορίζεται από το 5'- τελικό άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων και του οποίου το μήκος αντιστοιχεί στην απόσταση ανάμεσα στους εκκινητές. Το μεγαλύτερο μήκος που πολλαπλασιάζεται δεν μπορεί να υπερβεί τις 1000-1300 βάσεις.

Η διεργασία της PCR διευκολύνθηκε πολύ με την ανακάλυψη και χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, όπως της *Taq* DNA πολυμεράσης, οι οποίες είναι ανθεκτικές στην υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και διατηρούν τη λειτουργία τους. Το θερμοανθεκτικό ένζυμο *Taq* DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*), το οποίο ζει σε θερμές πηγές με μέση θερμοκρασία 70°C έως 75°C. Το ένζυμο εμφανίζει δραστηριότητα 800 bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτών στους 95°C, με αποτέλεσμα να αντέχει σε συνεχείς αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων της PCR. Έτσι, το ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς εξυπηρετεί την παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δε χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Με τη χρήση της *Taq* DNA πολυμεράσης η διαδικασία της PCR απλουστεύεται, αφού το ένζυμο προστίθεται στα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Επιπλέον, η εκτέλεση των αντιδράσεων ανασύνδεσης και

επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνει τον πολλαπλασιασμό των μη ειδικών προϊόντων. Μειονέκτημα του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση αποτελεί το γεγονός ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης.

Το γεγονός ότι η τεχνική της PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων σταδίων, οδήγησε στην αυτοματοποίηση του συνόλου της μεθόδου με τη δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών και δυνατότητα προγραμματισμού των διαφόρων αντιδράσεων, ώστε μετά από ρύθμιση των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, η διαδικασία να εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων.

3.4.2.2. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου PCR

Η τεχνική της PCR παρουσιάζει τρία κύρια πλεονεκτήματα:

α) χρόνος: με τη χρήση της PCR είναι δυνατό να παραχθούν περισσότερα από 10^5 αντίγραφα ενός τμήματος DNA, εντός λίγων ωρών. Τα στάδια της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο της ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και το στάδιο της επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Έτσι, για περίπου 30 κύκλους μίας αντίδρασης PCR απαιτούνται μόλις 3-6 ώρες.

β) ισχύς: η PCR έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση λόγω της επίδρασης του χρόνου ή άλλων αιτιών, ή βρίσκονται σε μη προσπελάσιμες θέσεις, όπως σε μονιμοποιημένους ιστούς.

γ) ευαισθησία: η PCR παράγει αντίγραφα του DNA-στόχου σε ποσότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν υπάρχει έστω και ένα αντίγραφο αυτού. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι που κατέστησε την PCR τόσο διαδεδομένη σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών εφαρμογών.

Εντούτοις, παρά τα ελκυστικά χαρακτηριστικά της PCR, η απόδοση της μεθόδου κρίνεται πολλές φορές, ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής της, μη αποδεκτή για τον πολλαπλασιασμό του DNA. Οι περιορισμοί της PCR εντοπίζονται στα εξής σημεία:

α) αλληλουχία-στόχος: είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της αλληλουχίας-στόχου, ώστε να συντεθούν οι εκκινητές. Επιπρόσθετα, σημαντικός περιορισμός της μεθόδου αποτελεί και το μέγεθος των DNA-στόχων, οι οποίοι μπορούν να ενισχυθούν με αξιοπιστία. Στις αλληλουχίες με μέγεθος έως 5kb η ενίσχυση θεωρείται γενικά αξιόπιστη, αλλά η ενίσχυση είναι πιο αξιόπιστη σε αλληλουχίες με μήκος 200-1000 βάσεων.

β) δράση της *Taq* πολυμεράσης: η *Taq* πολυμεράση δεν ασκεί πάντα τη δράση της με απόλυτη ακρίβεια, αφού σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντεθέντων κλώνων μπορεί να περιλαμβάνεται κάποιο σφάλμα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που εισάγονται με τη βοήθεια του ενζύμου. Αυτό οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην έλλειψη μηχανισμού *proofreading*. Συνήθως, το σφάλμα αφορά στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Επομένως, το τελικό μείγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν

όμοια, αλλά όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Με τρόπο ανάλογο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

γ) εκκινητές: οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η αλληλουχία των εκκινητών δεν πρέπει να περιλαμβάνει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε σειρά, κυρίως λόγω της συχνής παρουσίας τους στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ειδικότητα της πολλαπλής αντιγραφής. Παράλληλα, θα πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, καθώς το αντίθετο μειώνει την αποδοτικότητα της πολλαπλής αντιγραφής, ενώ τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR εξαρτώνται άμεσα από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών [138,139,140,141].

3.4.2.3. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου PCR

- 1) DNA βακτηρίου
- 2) WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H₂O)
- 3) Taq DNA πολυμεράση 5u/μL (Fermentas)
- 4) 10x Taq Buffer με KCl (Fermentas) (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
- 5) MgCl₂: 25 mM (Fermentas)
- 6) Primer 1: 100 pmol/μL
- 7) Primer 2: 100 pmol/μL
- 8) Μείγμα dNTPs: 100mM (Fermentas)
- 9) DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)
- 10) Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- 11) Αυτόματος αναδευτήρας Vortex (BICASA)
- 12) Σωληνάρια eppendorf για PCR
- 13) Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
- 14) Αποστειρωμένα ρύγχη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

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

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

3.4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, το σύνολο των στελεχών *S. aureus* ελέγχθηκε σε μοριακό επίπεδο, με εφαρμογή της μεθόδου της PCR, για την έκφραση του οπερονίου της PVL, καθώς και του γονιδίου *tst*, το οποίο κωδικοποιεί την τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (TSST-1). Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Taq DNA πολυμεράση (Fermentas) και οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA).

Το οπερόνιο PVL αποτελείται από δύο γονίδια, τα *lukS* και *lukF*, τα οποία σχηματίζουν μία διμερή πρωτεΐνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν την περιοχή του οπερονίου που περιέχει και τα δύο γονίδια. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ζεύγους των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* είναι:

PVL1: 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3'

PVL2: 5'-GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAGC-3'

Το μέγεθος της περιοχής ενίσχυσης των παραπάνω εκκινητών είναι 433bp. Η σύνθεση του μείγματος της PCR αντίδρασης, καθώς και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης αναφέρονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR εξετάσθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, μετά από ανάμειξη με 2μl χρωστικής ουσίας και

απεικονίστηκαν με τη χρήση υπεριώδους φωτός (UV illumination), σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης που περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Πίνακας 2. Σύνθεση του μείγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων της PVL.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1.5
Μείγμα dNTPs (20mM)	0.5
Primer PVL1 (25 pmol/μL)	0.25
Primer PVL2 (25 pmol/μL)	0.25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.2
WFI	17.3
DNA <i>S. aureus</i>	2.5
Τελικός όγκος	25

Πίνακας 3. Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης για την ανίχνευση των γονιδίων της PVL.

Αποδιάταξη	94°C, 30 sec
Αναδιάταξη	55°C, 30 sec
Επιμήκυνση	72°C, 60 sec
Αριθμός κύκλων	30
Τελική επιμήκυνση	72°C, 10 min

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ζεύγους των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του γονιδίου *tst* είναι:

TST1: 5'-TTCACTATTTGTAAAAGTGTTCAGACCCACT-3'

TST2: 5'-TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT-3'

Το μέγεθος της περιοχής ενίσχυσης των παραπάνω εκκινητών είναι 180bp. Η σύνθεση του μείγματος της PCR αντίδρασης, καθώς και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης αναφέρονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR εξετάστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2%, μετά από ανάμειξη με 2μl χρωστικής ουσίας και

απεικονίστηκαν με τη χρήση υπεριώδους φωτός (UV illumination), σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης που περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Πίνακας 4. Σύνθεση του μείγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tst*.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	5
MgCl ₂ (25mM)	3
Μείγμα dNTPs (20mM)	1
Primer TST1 (25 pmol/μL)	0.5
Primer TST2 (25 pmol/μL)	0.5
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.4
WFI	34.6
DNA <i>S. aureus</i>	5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 5. Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης για την ανίχνευση του γονιδίου *tst*.

Αρχική αποδιάταξη	96°C, 3 min
Αποδιάταξη	95°C, 60 sec
Αναδιάταξη	55°C, 30 sec
Επιμήκυνση	72°C, 30 sec
Αριθμός κύκλων	40
Τελική επιμήκυνση	72°C, 5 min

3.4.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MLST

Ο Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας DNA (Multi Locus Sequence Typing, MLST) είναι η μέθοδος που επιλέχθηκε για τη μοριακή τυποποίηση όλων των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus*. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιλογής εφαρμόζεται σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτές αρχές [13].

3.4.4.1. Γενικά

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

Όπως προαναφέρθηκε στο Γενικό Μέρος της παρούσας εργασίας, η μέθοδος MLST χρησιμοποιεί, ως μέσο για την ανάλυση της αλληλουχίας DNA, επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού, τα οποία εδράζονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις, υπό οποιεσδήποτε συνθήκες αύξησης των βακτηρίων. Τα γονίδια αυτά, τα οποία αποκαλούνται και γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή διατηρημένα γονίδια (housekeeping genes), βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα, δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες τυποποίησης, καθώς και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους βακτηρίου.

Για κάθε είδος βακτηρίου έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα γονίδια και η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος (internal fragment) του επιλεγέντος γονιδίου μήκους περίπου 450 bp, διαδικασία που ακολουθήθηκε και στην παρούσα εργασία για τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus*. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η αλληλούχισή τους (sequencing). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και παρατίθενται στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές διεθνώς να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια (alleles) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα αλλήλια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των αλληλίων

(allelic profile) των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων μεταβολισμού και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο, μοναδικό τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Ο ST αποτελεί έναν αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με τον ίδιο ST, αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

Όλες οι σχετικές με τη μοριακή μέθοδο MLST πληροφορίες, όπως οι αλληλουχίες αναφοράς των αλληλίων, οι ST τύποι, καθώς και επιδημιολογικά δεδομένα είναι καταχωρημένα στις δύο επίσημες διαδικτυακές βάσεις δεδομένων της τεχνικής MLST www.mlst.net και www.pubmlst.org, που προέρχονται από το Imperial College, London και το Oxford University, αντίστοιχα [13,142,143].

3.4.4.2. Ενίσχυση των γονιδίων της MLST με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus*

Στην παρούσα μελέτη όλα τα στελέχη *S. aureus*, MRSA και MSSA, που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών με δερματικές βλάβες, τυποποιήθηκαν μοριακά με τη μέθοδο MLST. Για το σκοπό αυτό σε κάθε στέλεχος τα επτά γονίδια μεταβολισμού του *S. aureus* που ανιχνεύονται στη μέθοδο MLST (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR [13]. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση MLST αναφέρονται στον πίνακα 6. Για κάθε γονίδιο της MLST που διερευνήθηκε παρασκευάστηκαν ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε γονίδιο, όπως φαίνεται στον πίνακα 7. Οι συνθήκες αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης ήταν κοινές για όλα τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν και περιγράφονται στον πίνακα 8. Όλες οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA), ενώ η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση (Fermentas).

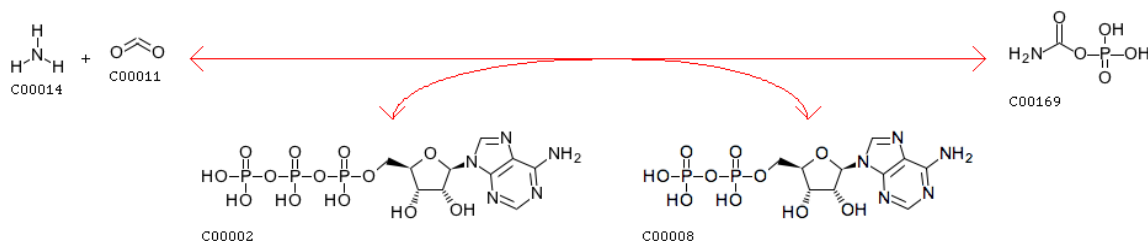
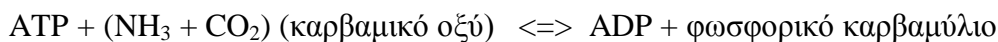
Πίνακας 6. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση MLST των στελεχών *S. aureus*.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5' - 3')	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (bp)
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTTCACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	429
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACACCTTCTAACAATTGTAC	402
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ MLST ΓΙΑ ΤΟΝ *S. AUREUS*, ENZYMA ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

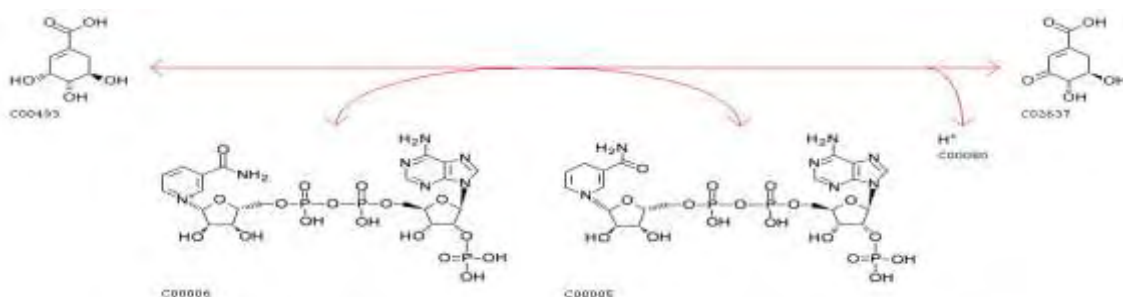
Τα επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού της MLST για τον *S. aureus* κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν ειδικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις πληροφορίες που αντλήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας από την ψηφιακή εγκυκλοπαίδεια του Πανεπιστημίου του Κιότο για γονίδια και γονιδιώματα (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – **KEGG**) (www.genome.jp/kegg/), τα ένζυμα και οι αντιδράσεις στις οποίες αυτά συμμετέχουν είναι :

1) Το γονίδιο **arcC** (Carbamate kinase) κωδικοποιεί το ένζυμο της καρβαμικής κινάσης. Πρόκειται για μία ATP καρβαμική φωσφοτρανσφεράση, η οποία καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδας, με χρήση ενέργειας από την μετατροπή του ATP σε ADP, σύμφωνα με την αντίδραση:

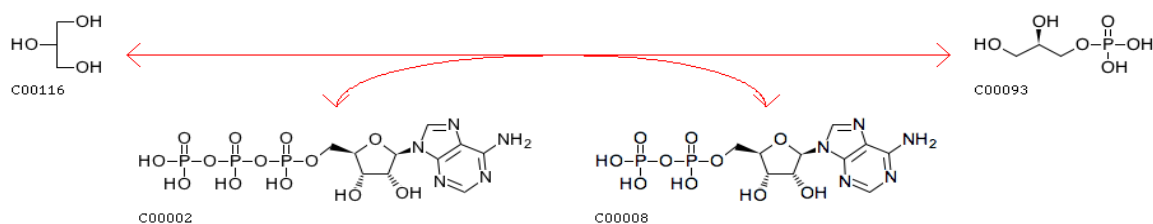


Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών, των αμινοξέων αργινίνης και προλίνης, καθώς και στον μεταβολισμό του αζώτου.

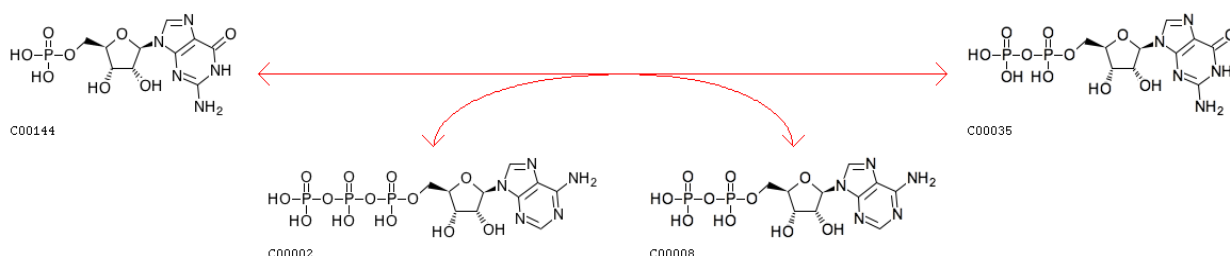
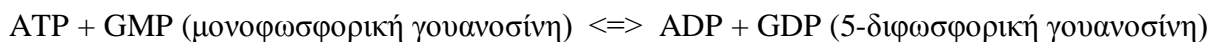
2) Το γονίδιο **aroE** (Shikimate dehydrogenase) κωδικοποιεί μία αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό αμινοξέων, κυρίως της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του NADP^+ ως δέκτη πρωτονίων (H^+) σύμφωνα με την αντίδραση:



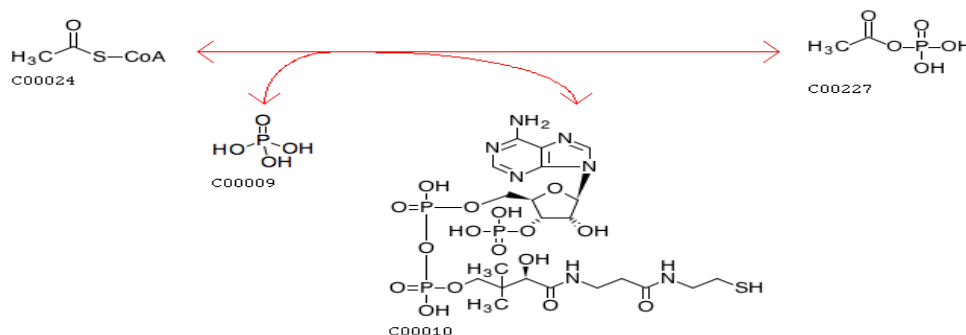
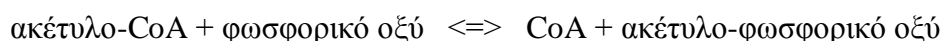
3) Το γονίδιο **glpF** (Glycerol kinase) κωδικοποιεί μία φωσφοτρανσφεράση, την κινάση της γλυκερόλης. Πρόκειται για ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και η αντίδραση που καταλύει πραγματοποιείται με προσφορά ενέργειας από τη διάσπαση του ATP:



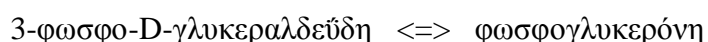
4) Το γονίδιο **gmk** (Guanylate kinase) κωδικοποιεί το ένζυμο κινάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης, μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων της μεταβολικής οδού των νουκλεοτιδίων και ειδικά των πουρινών, με προσφορά ενέργειας από το ATP:



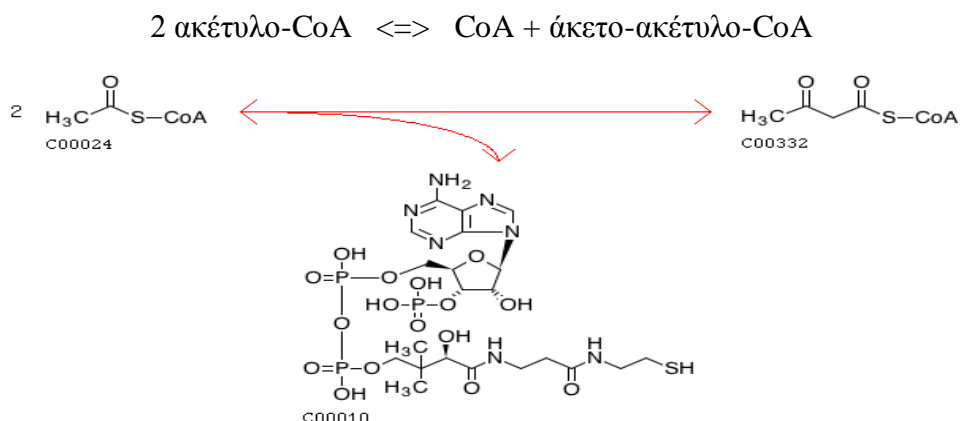
5) Το γονίδιο **pta** (Phosphate acetyltransferase) κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοτρανσακετυλάση, το οποίο καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων και ακετυλομάδων κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αμφίδρομη αντίδραση καταλύεται σε υπόστρωμα ακέτυλο-CoA:



6) Το γονίδιο **tpi** (Triosephosphate isomerase) κωδικοποιεί μία ισομεράση, ένζυμο με δράση αναγωγάσης του υποστρώματος της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης και προϊόν τη φωσφογλυκερόνη. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει το ένζυμο είναι οι οδοί της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:



7) Το γονίδιο *yqiL* (Acetyl-CoA acetyltransferase) κωδικοποιεί ένζυμο μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμο Α. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η συγκεκριμένη τρανσφεράση είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, η σύνθεση και αποδόμηση των κετονικών σωμάτων, καθώς και αμινοξέων, όπως βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης, σύμφωνα με την αντίδραση:



Πίνακας 7. Σύνθεση του μείγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων της MLST για *S. aureus*.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1.5
Μείγμα dNTPs (20mM)	0.5
Primer Up (25 pmol/μL)	0.25
Primer Dn (25 pmol/μL)	0.25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.2
WFI	17.3
DNA <i>S. aureus</i>	2.5
Τελικός όγκος	25

Πίνακας 8. Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων της MLST για *S. aureus*.

Αρχική αποδιάταξη	95°C, 5 min
Αποδιάταξη	95°C, 60 sec
Αναδιάταξη	55°C, 60 sec
Επιμήκυνση	72°C, 60 sec
Αριθμός κύκλων	30
Τελική επιμήκυνση	72°C, 5 min

3.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η μέθοδος που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση θραυσμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους.

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μίας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% για την ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων PCR. Για κάθε προϊόν PCR πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μετά την ενίσχυση του DNA του με PCR και μία μετά τον καθαρισμό του DNA. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

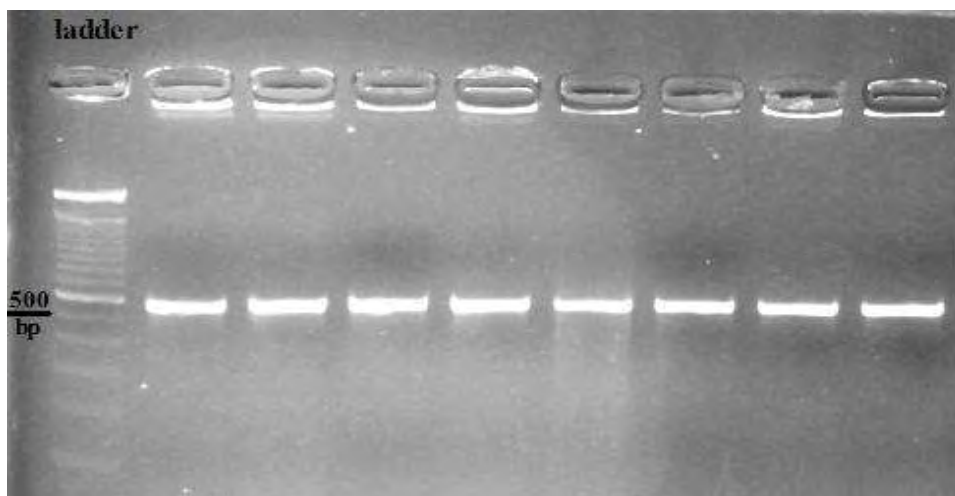
- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)
- 10x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA) (Ambion)
- Agarose SeaKem LE (Cambrex)
- Ethidium bromide (EtBr) solution 10 mg/ml (Research Organics)
- 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης (Fermentas)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

- Mass Ruler DNA Ladder, High Range (Fermentas)
- Λάμπα UV (MiniBisPro, Bio-Imaging Systems)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (EC105-LVD Submarine Gel System Classic, Thermo Electron Co)
- Τροφοδοτικό τάσης (EC105-LVD, Thermo Electron Co)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

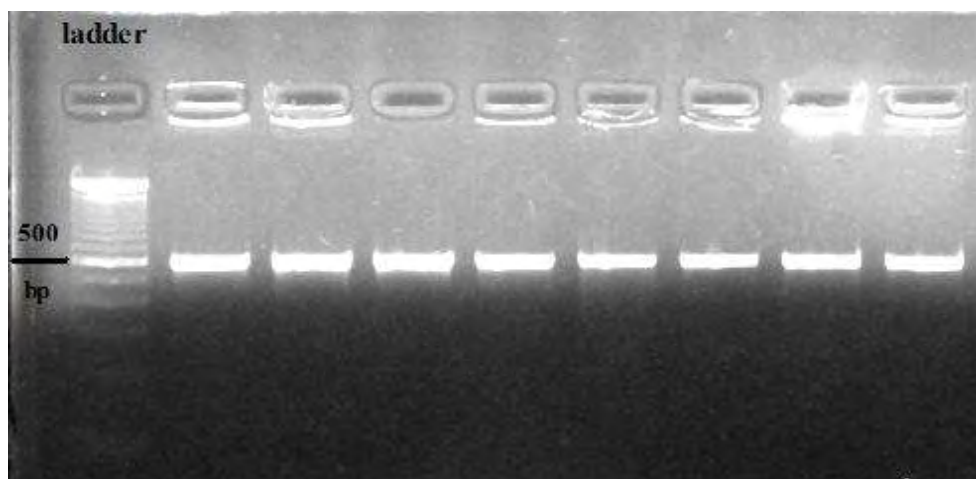
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αραίωση του 10x TBE Buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 10 ml 10x TBE και 90 ml H₂O (WFI).
- Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμειγνύονται 50 ml 1x TBE Buffer και 1g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμειγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και με βρασμό να διαυγάσει το διάλυμα. Στη συνέχεια, αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
- Προστίθενται 2μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml στο διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm.
- Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο, για τη δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA και αποχύνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
- Αφού στερεοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια» και το πήκτωμα (gel) είναι πλέον έτοιμο για την ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτισή του σε διάλυμα 1x TBE Buffer της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Αναμειγνύονται 6μl από έναστο δείγμα DNA με 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) Loading Dye Solution και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Χρησιμοποιήθηκε ο 1000bp/100bp DNA Ladder (Fermentas).
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volts και ένταση 50 mA για 20 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους

φωτός, UV Photo MiniBisPro, Bio-Imaging Systems και φωτογραφήθηκε με Olympus Digital Camera, που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *pta* μεγέθους 474 bp σε πήκτωμα αγαρόζης σε 8 στελέχη *S. aureus* μετά από ενίσχυση του DNA τους με PCR.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *yqiL* μεγέθους 516 bp σε πήκτωμα αγαρόζης σε 8 στελέχη *S. aureus* μετά από ενίσχυση του DNA τους με PCR.

3.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για MLST, για την απομάκρυνση των προσμείξεων της αντίδρασης, δηλαδή των υπολειμμάτων των εκκινητών, των dNTPs, του ενζύμου και των αλάτων, είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA των

στελεχών *S. aureus* σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικού PureLink PCR Purification Kit της Invotrogen.

ΥΛΙΚΑ

- Binding Buffer (B₁)
- Wash Buffer (W₁)
- Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (E₁)
- Στήλες φυγοκέντρησης PureLink PCR με σωληνάρια συλλογής
- Σωλήνες έκλουσης PureLink (1.7 ml)
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 96% - 100%
- Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων:

- Προστίθενται 48 ml ισοπροπανόλης 100% σε 72 ml Binding Buffer (B₁) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς, ώστε να καταστεί ομοιογενές.

- Προστίθενται 160 ml αιθανόλης 96% - 100% στα 40 ml Wash Buffer (W₁) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς, ώστε να καταστεί ομοιογενές.

Τα διαλύματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

1) Δέσμευση του DNA

- Σε ένα PCR προϊόν προστίθεται τετραπλάσιος όγκος αραιωμένου Binding Buffer (B₁), σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος της PCR. Το μείγμα αναδεύεται καλά με αναρρόφηση.

- Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink PCR, όπου και δεσμεύεται το DNA στη στήλη.

- Το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.400 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

2) Καθαρισμός του DNA

- Σε κάθε στήλη προστίθενται 650 μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash Buffer (W₁).

- Το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.400 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα.

- Ακολουθεί επαναφυγοκέντρωση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά στις 13.400 rpm, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer.

- Έκαστη στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1.7 ml), ενώ οι προηγούμενοι σωλήνες συλλογής του διηθήματος απορρίπτονται.

3) Έκλυση του DNA

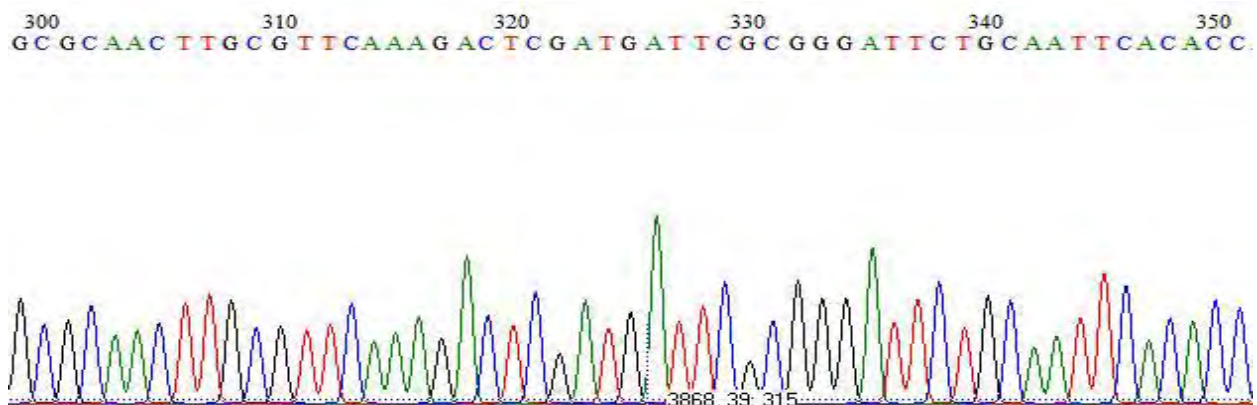
- Προστίθενται 50μl Elution Buffer (E₁) στο κέντρο κάθε στήλης, ώστε η στήλη να διαβραχεί και κατόπιν να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από τη στήλη. Στη συνέχεια, οι στήλες επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως φυγοκεντρώνονται για 4 λεπτά στις 13.400 rpm.

- Έκαστη στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει πλέον το καθαρισμένο προϊόν της PCR, το οποίο και ηλεκτροφορείται, σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης που περιγράφηκε παραπάνω, για επιβεβαίωση της ύπαρξης και της ποιότητάς του μετά τη διαδικασία του καθαρισμού. Τέλος, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να αποσταλούν για αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ MLST (SEQUENCING)

Η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για MLST πραγματοποιήθηκε σε ειδικό τμήμα του Εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης αποστέλλονταν στο Εργαστήριο 50 μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20 μl από έκαστο εκκινητή σε αραίωση 1 : 20, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 5 pmol/μl. Σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* της παρούσας εργασίας ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε και στις δύο έλικες των γονιδιακών θραυσμάτων, δηλαδή τόσο από την 5' κατεύθυνση του προϊόντος ενίσχυσης όσο και από την 3' κατεύθυνση, για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας των μελετώμενων γονιδίων παρουσιάζεται με τη μορφή ενός ηλεκτροφερογράμματος (electropherogram), το οποίο αποτελείται από μία σειρά κορυφών. Κάθε κορυφή (peak) αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (A: Αδερίνη, T: Θυμίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη) και εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το χρώμα φθορισμού (εικόνα 13). Πιο συγκεκριμένα, στο ηλεκτροφερόγραμμα αναπαρίσταται η ένταση των φθορίζοντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 13. Ενδεικτικό ηλεκτροφερόγραμμα τμήματος γονιδίου της MLST για τον *S. aureus*.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονιδιακών θραυσμάτων, καθώς και η στοίχιση-ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Mega 6.0. (εικόνα 14). Η επεξεργασία αυτή καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώσιμες και συγκρίσιμες.



Εικόνα 14. Ενδεικτική επεξεργασία-στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δύο ελίκων DNA ενός γονιδίου της MLST για τον *S. aureus*, με χρήση του προγράμματος Mega 6.0.

Μετά την επεξεργασία και τη μελέτη αλληλούχησης των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης της PCR, κατέστη πλέον γνωστή η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία καθενός από τα επτά διατηρημένα γονίδια του τυποποιημένου σχήματος της MLST, για όλα τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus*. Στη συνέχεια, για τον καθορισμό των τύπων MLST η αλληλουχία των επτά γονιδίων συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες αλληλουχίες αναφοράς της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων της MLST και αποδόθηκε ένας αριθμός αλληλόμορφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό αλληλόμορφο προφίλ (allelic profile) για κάθε στέλεχος *S. aureus*. Αυτός ο συνδυασμός των επτά αριθμών-αλληλίων (allelic profile) υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων της MLST (www.saureus.mlst.net) και για κάθε μοναδικό συνδυασμό αποδόθηκε ένας αντίστοιχος αριθμός, ο οποίος αποτέλεσε τον τύπο αλληλουχίας (Sequence Type, ST) για κάθε στέλεχος *S. aureus*. Μέσω της μεθόδου μοριακής τυποποίησης MLST, η οποία κατέληξε στον καθορισμό του χαρακτηριστικού τους ST, τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* τυποποιήθηκαν με αξιοπιστία και ακρίβεια.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ – ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά τη διάρκεια της χρονικής περιόδου από τον Οκτώβριο 2013 έως και τον Ιανουάριο 2014 απομονώθηκαν συνολικά 41 στελέχη *S. aureus*, από κλινικά δείγματα ασθενών με δερματικές βλάβες της Πανεπιστημιακής Δερματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Μεταξύ των ασθενών οι 26 (63.4%) ήταν γυναίκες και οι 15 (36.6%) ήταν άντρες. Η μέση ηλικία των ασθενών της μελέτης ήταν τα 51 έτη, με εύρος ηλικιών 1-84 έτη.

Από το σύνολο των ασθενών οι 29 (70.7%) προσήλθαν και εξετάστηκαν στο Εξωτερικό Δερματολογικό Ιατρείο, ενώ οι 12 (29.3%) εισήχθηκαν και νοσηλεύτηκαν στο τμήμα νοσηλείας της Πανεπιστημιακής Δερματολογικής Κλινικής. Οι ασθενείς εμφάνιζαν κλινικά διαφορετικές πυώδεις δερματικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις: 14 από αυτούς εμφάνιζαν δοθιήνα, 8 εμφάνιζαν θυλακίτιδα, 6 εμφάνιζαν μολυσματικό κηρίο, 5 εμφάνιζαν ψευδάνθρακα και 8 εμφάνιζαν σταφυλοκοκκική επιμόλυνση δερματικών βλαβών που σχετιζόνταν με χρόνιες δερματικές παθήσεις (5 ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα και 3 με ψωρίαση).

4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ - ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Σύμφωνα με τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά κεφοξιτίνη (cefoxitin) και οξακυλλίνη (oxacillin) που πραγματοποιήθηκε, 32 (78%) από τα 41 στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν ως MSSA (Methicillin-Susceptible *S. aureus*) και 9 (22%) χαρακτηρίστηκαν ως MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*).

Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εκτός από τα δύο β-λακταμικά αντιβιοτικά που προαναφέρθηκαν, έμφαση δόθηκε παράλληλα στον έλεγχο ευαισθησίας των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών και σε δύο επιπλέον αντιβιοτικά, την ερυθρομυκίνη (erythromycin) και την κλινδαμυκίνη (clindamycin). Ο λόγος είναι ότι στην Ελλάδα, εκτός από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η ερυθρομυκίνη (που ανήκει στις μακρολίδες) και η κλινδαμυκίνη (που ανήκει στις λινκοζαμίδες) αποτελούν αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη για την εμπειρική θεραπεία των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων και μάλιστα των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων της κοινότητας. Έτσι, στην παρούσα εργασία με βάση τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά που πραγματοποιήθηκε και το αντιβιογράμμο που προέκυψε, 11 (26.8%) στελέχη, από το σύνολο των 41 στελεχών *S. aureus* που ελέγχθηκαν, παρουσίαζαν ταυτόχρονα αντοχή στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, ενώ 1 (2.4%) ήταν ανθεκτικό μόνο στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητο στην κλινδαμυκίνη. Μεταξύ των 11

στελεχών *S. aureus*, που παρουσίαζαν αντοχή ταυτόχρονα στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, τα 6 (54.5%) χαρακτηρίστηκαν ως MSSA, ενώ τα υπόλοιπα 5 (45.5%) ως MRSA. Το μοναδικό *S. aureus* στέλεχος που παρουσίαζε αντοχή μόνο στην ερυθρομυκίνη και όχι στην κλινδαμυκίνη, ταξινομήθηκε ως MSSA, βάσει του αντιβιογράμματος.

Με βάση τον επιδημιολογικό ορισμό του CDC που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.1., 38 (92.7%) από τα 41 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν ως στελέχη της κοινότητας (community-associated), ενώ ως νοσοκομειακά στελέχη (hospital-associated) ταξινομήθηκαν μόνο τα 3 (7.3%). Τα 3 αυτά *S. aureus* στελέχη χαρακτηρίστηκαν επιπλέον ως MRSA (HA-MRSA) στελέχη και με τη μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο της MLST βρέθηκε να αντιστοιχούν στον ST225.

4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ - ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησης με τη μέθοδο της MLST που εφαρμόστηκε για όλα τα στελέχη *S. aureus* της παρούσας μελέτης ήταν τα εξής:

1) Μεταξύ των MSSA στελεχών που μελετήθηκαν, ανευρέθηκαν 12 διαφορετικοί STs. Οι επικρατέστεροι ήταν οι ST1, ST15, ST45 και ST72, με έκαστο να αντιστοιχεί σε 4 (12.5%) στελέχη μεταξύ του συνόλου των 32 MSSA στελεχών. Οι ST7, ST22 και ST728 αποδόθηκαν έκαστος σε 3 (9.38%) MSSA στελέχη, οι ST34 και ST59 ανιχνεύθηκαν σε 2 (6.25%) MSSA στελέχη έκαστος, ενώ οι ST10, ST398 και ST1153 ανευρέθηκαν έκαστος σε 1 (3.12%) MSSA στέλεχος (τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού των 32 MSSA στελεχών που απομονώθηκαν).

2) Μεταξύ των MRSA στελεχών που μελετήθηκαν, ανευρέθηκαν μόνο 2 STs. Επικρατέστερος ήταν ο ST80, ο οποίος αποδόθηκε σε 6 (66.7%) MRSA στελέχη, ενώ ο ST225 ανιχνεύθηκε στα υπόλοιπα 3 (33.3%) MRSA στελέχη, μεταξύ του συνόλου των 9 MRSA στελεχών που μελετήθηκαν (τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού των 9 MRSA στελεχών που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανίχνευση των γονιδίων τοξινών με εφαρμογή της μεθόδου της PCR ήταν τα εξής:

1) Το γονίδιο της PVL ανιχνεύθηκε σε 13 (31.7%) στελέχη *S. aureus* μεταξύ του συνόλου των 41 στελεχών που ελέγχθηκαν. Συγκεκριμένα, το γονίδιο της PVL βρέθηκε σε όλα τα CA-MRSA ST80 στελέχη (66.7% επί του συνόλου των MRSA στελεχών), ενώ μεταξύ των 32 CA-MSSA στελεχών που απομονώθηκαν, τα 7 (21.9%) βρέθηκαν θετικά για την παραγωγή της

τοξίνης της PVL. Τα PVL θετικά CA-MSSA στελέχη αντιστοιχούσαν σε δύο διαφορετικούς STs, τον ST72 και τον ST728. Το σύνολο των PVL θετικών στελεχών *S. aureus* απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών που εμφάνιζαν μολυσματικό κηρίο, δοθήνα ή ψευδάνθρακα.

2) Από το σύνολο των 41 στελεχών *S. aureus* που ελέγχθηκαν, μόνο σε 2 (4.9%) στελέχη ανιχνεύθηκε το *tst* γονίδιο. Τα δύο αυτά στελέχη ήταν CA-MSSA, ανήκαν και τα δύο στον ST34, ενώ απομονώθηκαν από δύο διαφορετικούς ασθενείς που εμφάνιζαν ψευδάνθρακα.

Πίνακας 9. Γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus*.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>S. aureus</i>	CA/HA- MSSA/MRSA	ST	PVL	<i>tst</i>	CEF	OXA
(4)	CA-MSSA	1	(-)	(-)	(-)	(-)
(4)	CA-MSSA	15	(-)	(-)	(-)	(-)
(4)	CA-MSSA	45	(-)	(-)	(-)	(-)
(4)	CA-MSSA	72	(+)	(-)	(-)	(-)
(3)	CA-MSSA	7	(-)	(-)	(-)	(-)
(3)	CA-MSSA	22	(-)	(-)	(-)	(-)
(3)	CA-MSSA	728	(+)	(-)	(-)	(-)
(2)	CA-MSSA	34	(-)	(+)	(-)	(-)
(2)	CA-MSSA	59	(-)	(-)	(-)	(-)
(1)	CA-MSSA	10	(-)	(-)	(-)	(-)
(1)	CA-MSSA	398	(-)	(-)	(-)	(-)
(1)	CA-MSSA	1153	(-)	(-)	(-)	(-)
(6)	CA-MRSA	80	(+)	(-)	(+)	(+)
(3)	HA-MRSA	225	(-)	(-)	(+)	(+)
Σύνολο: (41)						

CEF: κεφοξιτίνη, OXA: οξακιλλίνη, (+): αντοχή, (-): ευαισθησία

Πίνακας 10. Οι STs και το αντίστοιχο Allelic Profile των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus*.

ST	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
15	13	13	1	1	12	11	13
45	10	14	8	6	10	3	2
72	1	4	1	8	4	4	3
7	5	4	1	4	4	6	3
22	7	6	1	5	8	8	6
728	1	3	1	14	11	27	10
34	8	2	2	2	6	3	2
59	19	23	15	2	19	20	15
10	8	7	6	2	9	9	7
398	3	35	19	2	20	26	39
1153	1	13	1	1	124	5	3
80	1	3	1	14	11	51	10
225	1	4	1	4	12	25	10

Πίνακας 11. Συσχέτιση των γονοτυπικών χαρακτηριστικών των στελεχών *S. aureus* και της αντοχής τους στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη.

ST	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	MSSA/MRSA	ERY	CLI
1	1	MSSA	(+)	(+)
728 (PVL +)	1	MSSA	(+)	(+)
72 (PVL +)	1	MSSA	(+)	(+)
34 (tst +)	1	MSSA	(+)	(+)
398	1	MSSA	(+)	(+)
45	1	MSSA	(+)	(+)
15	1	MSSA	(+)	(-)
80 (PVL +)	2	MRSA	(+)	(+)
225	3	MRSA	(+)	(+)
Σύνολο: 12				

ERY: Ερυθρομυκίνη, **CLI:** Κλινδαμυκίνη, **(+):** αντοχή, **(-):** ευαισθησία

Πίνακας 12. Τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών και οι αντίστοιχες δερματικές λοιμώξεις.

ST	Δοθίνας	Θυλακίτιδα	Μολυσματικό κηρίο	Ψευδάνθρακας	Βλάβες Ατοπικής Δερματίτιδας	Ψωριασικές βλάβες
1	2 ασθενείς	1 ασθενής	1 ασθενής			
15	3 ασθενείς	1 ασθενής				
45		2 ασθενείς	1 ασθενής		1 ασθενής	
72 PVL(+)	2 ασθενείς		1 ασθενής	1 ασθενής		
7		2 ασθενείς			1 ασθενής	
22	2 ασθενείς				1 ασθενής	
728 PVL(+)	2 ασθενείς		1 ασθενής			
34 <i>tst</i> (+)				2 ασθενείς		
59		1 ασθενής	1 ασθενής			
10					1 ασθενής	
398	1 ασθενής					
1153		1 ασθενής				
80 PVL(+)	1 ασθενής		1 ασθενής	2 ασθενείς	1 ασθενής	1 ασθενής
225	1 ασθενής					2 ασθενείς
Σύνολο: 41	14 ασθενείς	8 ασθενείς	6 ασθενείς	5 ασθενείς	5 ασθενείς	3 ασθενείς

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία ο *S. aureus*, αν και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων, χαρακτηρίζεται ως κύριος παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο, ικανός να προκαλεί ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα. Ο μεγάλος αριθμός λοιμογόνων παραγόντων που διαθέτει, καθώς και το ιδιαίτερα ευέλικτο γονιδιώμα του, του επιτρέπουν να προσαρμόζεται εύκολα και να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες εντός του ανθρώπινου ξενιστή, καθώς και να διασπείρεται ταχέως. Ο *S. aureus* αποτελεί αντικείμενο διαρκούς επιστημονικής μελέτης, καθώς ως ευέλικτο παθογόνο δεν παύει να εξελίσσεται, εμφανίζοντας νέες ιδιότητες που σχετίζονται με την αύξηση της λοιμογόνου ικανότητας και της αντοχής του στα αντιβιοτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ταχεία απομόνωση στελεχών με ικανότητα παραγωγής β-λακταμάσης αμέσως μετά την εφαρμογή της πενικιλίνης στην κλινική πράξη, καθώς και η εμφάνιση των πρώτων MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*) στελεχών το 1961 στην Αγγλία, ένα χρόνο μετά την εισαγωγή στη θεραπευτική πράξη των ημισυνθετικών πενικιλινών (methicillin, oxacillin, nafcillin). Τα MRSA στελέχη φέρουν το γονίδιο *mecA*, που κωδικοποιεί τη σύνθεση της τροποποιημένης πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP2a, η οποία εμφανίζει μειωμένη συγγένεια σύνδεσης προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά [70,104].

Αν και στο παρελθόν ο MRSA θεωρούνταν αμιγώς νοσοκομειακό παθογόνο (Hospital-Associated MRSA, HA-MRSA), από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 παρατηρήθηκε μία μεγάλη αύξηση του αριθμού των λοιμώξεων από στελέχη MRSA σε άτομα στην κοινότητα, χωρίς προηγούμενη επαφή με το σύστημα υγείας. Η αύξηση των λοιμώξεων στην κοινότητα σχετίστηκε με την εμφάνιση νέων MRSA στελεχών, των αποκαλούμενων MRSA της κοινότητας (Community-Associated MRSA, CA-MRSA), τα οποία εξαπλώθηκαν γρήγορα μεταξύ του γενικού πληθυσμού στα περισσότερα μέρη του κόσμου, προσβάλλοντας συνήθως άτομα χωρίς προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομεία. Τα CA-MRSA στελέχη χαρακτηρίζονται από την παρουσία του γονιδίου που κωδικοποιεί τη λευκοκτονίνη PVL και από την αντοχή τους στην τετρακυκλίνη και στο φουσιδικό οξύ [70,104].

Τα στελέχη *S. aureus* της κοινότητας, τόσο τα CA-MRSA όσο και τα CA-MSSA (Community-Associated Methicillin-Susceptible *S. aureus*), προκαλούν διακριτά κλινικά σύνδρομα μεταξύ των οποίων οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (Skin and Soft Tissue Infections, SSTIs) αποτελούν τις πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις σε παγκόσμιο επίπεδο [70]. Οι δερματικές λοιμώξεις που προκαλεί ο *S. aureus* χαρακτηρίζονται από έντονη διαπηκτική φλεγμονή των ιστών και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών κλινικών εκδηλώσεων, όπως είναι το μολυσματικό κηρίο, η θυλακίτιδα, ο δοθιήνας, ο ψευδάνθρακας, η κριθή, η παρωνυχία, οι επιμολύνσεις τραυμάτων, εγκαυμάτων, ψωριασικών, εκζεματοειδών ή

άλλων βλαβών που σχετίζονται με χρόνιες δερματοπάθειες, το ερυσίπελας, η κυτταρίτιδα, καθώς και το σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο.

Αντικείμενο εντατικής επιστημονικής μελέτης κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών αποτελεί όχι μόνο η ταχεία εξάπλωση των CA-MRSA στελεχών παγκοσμίως, αλλά και η ευρεία απομόνωση CA-MRSA στελεχών τα οποία παράγουν την Panton-Valentine λευκοκυττονίνη (PVL). Η PVL είναι μία τοξίνη που καταστρέφει τα λευκοκύτταρα σχηματίζοντας πόρους στην κυτταρική τους μεμβράνη, προκαλεί νέκρωση ιστών και έχει δερμονεκρωτική δράση, ιδιότητα που εξηγεί ίσως την παθοβιολογία των χαρακτηριστικών δερματικών βλαβών που προκαλούνται στις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων που οφείλονται σε στελέχη *S. aureus*. Αν και ο ρόλος της τοξίνης PVL ως ο σημαντικότερος λοιμογόνος παράγοντας στην παθογένεια των λοιμώξεων από *S. aureus* στην κοινότητα είναι αμφιλεγόμενος, τα γονίδια της PVL ανευρίσκονται κυρίως σε στελέχη CA-MRSA που προκαλούν λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (SSTIs), αλλά και άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως νεκρωτική πνευμονία ή σοβαρή σήψη και ενοχοποιούνται τόσο για σποραδικά κρούσματα όσο και για εξάρσεις ή μικροεπιδημίες στην κοινότητα. Ωστόσο, εκτός από τα CA-MRSA στελέχη, η τοξίνη PVL παράγεται και από τα CA-MSSA στελέχη. Έτσι, η ανίχνευση των γονιδίων της PVL έχει κατεξοχήν συσχετισθεί με λοιμώξεις από στελέχη *S. aureus* της κοινότητας [44,46,47,48,70,144].

Στην παρούσα εργασία τα 41 στελέχη *S. aureus* απομονώθηκαν από ασθενείς με δερματικές βλάβες λόγω πυωδών δερματικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων, όπως δοθιήνα, ψευδάνθρακα, θυλακίτιδα, μολυσματικό κηρίο, καθώς και επιμολύνσεις δερματικών βλαβών που σχετίζονταν με χρόνιες δερματοπάθειες (ατοπική δερματίτιδα και ψωρίαση). Η συντριπτική πλειοψηφία (92.7%) των στελεχών *S. aureus* που μελετήθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως στελέχη της κοινότητας, σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό του CDC [70], με εξαίρεση τριών (7.3%) μόνο στελεχών, τα οποία ταξινομήθηκαν ως νοσοκομειακά.

Τα 3 νοσοκομειακά στελέχη, τα οποία ταξινομήθηκαν ως HA-MRSA, μετά τη μοριακή τους τυποποίηση με τη μέθοδο MLST αποδόθηκαν όλα στον ST225. Πρόκειται για HA-MRSA κλώνο, ο οποίος ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990 στις Η.Π.Α., ενώ μετά το 2000 άρχισε να εξαπλώνεται ταχύτατα στο νοσοκομειακό περιβάλλον χωρών της Κεντρικής Ευρώπης, αντικαθιστώντας άλλους ήδη διαδεδομένους HA-MRSA κλώνους. Έτσι, από το 2001 η συχνότητα ανίχνευσής του ST225 στα νοσοκομεία της Γερμανίας ήταν διαρκώς αυξανόμενη, ενώ μέχρι το 2007 είχε ήδη απομονωθεί και σε νοσοκομεία άλλων γειτονικών της Γερμανίας χωρών, όπως της Τσεχίας, της Δανίας και της Ελβετίας [153,154].

Μεταξύ των στελεχών της κοινότητας, 6 (15.8%) χαρακτηρίστηκαν ως MRSA, ενώ η μεγάλη πλειοψηφία αυτών (84.2%) ήταν στελέχη MSSA. Όλα τα CA-MRSA στελέχη βρέθηκαν, μέσω

της μοριακής μεθόδου τυποποίησης MLST, να αντιστοιχούν σε έναν μοναδικό ST, τον ST80, ενώ παράλληλα, μέσω της μοριακής ενίσχυσης με την τεχνική της PCR, βρέθηκε να παράγουν όλα την τοξίνη PVL. Ο ST80 είναι ο συνηθέστερος CA-MRSA κλώνος που επικρατεί στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, γι' αυτό και είναι γνωστός ως «Ευρωπαϊκός κλώνος». Φέρει την *SCCmec* τύπου IV, παράγει PVL (όπως επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία) και αναφέρεται ως μία ολόένα αυξανόμενη αιτία δερματικών λοιμώξεων στην κοινότητα σε Αυστρία, Νορβηγία, Δανία, Σουηδία, Γαλλία, Αγγλία, Ελβετία, καθώς και στην Ελλάδα [46,70,115,119,120]. Στη χώρα μας ο CA-MRSA ST80, PVL-θετικός, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1998 στην Πάτρα [114] και έκτοτε εξαπλώνεται ταχέως και ενδημεί στην κοινότητα. Χαρακτηρίζεται ως ο επικρατέστερος μεταξύ των CA-MRSA κλώνων που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, καθώς και στη Θεσσαλία, ενώ ενοχοποιείται πρωτίστως για λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων στην κοινότητα [117,122,123,124,125,126,127,145].

Εντούτοις, όπως προαναφέρθηκε, η μεγάλη πλειοψηφία (84.2%) των *S. aureus* στελεχών της κοινότητας που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν MSSA. Σε σύγκριση με τα CA-MRSA, τα οποία αμιγώς αποδόθηκαν σε έναν μοναδικό κλώνο, τον ST80, τα CA-MSSA στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα δερματικών βλαβών, παρουσίαζαν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, καθώς βρέθηκε να αντιστοιχούν σε 12 διαφορετικούς STs, τους ST1, ST15, ST45, ST72, ST7, ST22, ST728, ST34, ST59, ST10, ST398 και ST1153. Το εύρημα σχετικά με τη γενετική ποικιλομορφία των MSSA στελεχών της κοινότητας προκύπτει και από προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο [146,147,148,149]. Επιπρόσθετα, αξιοσημείωτο είναι επίσης το εύρημα ότι ορισμένα από τα CA-MSSA στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη, μετά τη μοριακή τους τυποποίηση με τη μέθοδο της MLST βρέθηκε να αντιστοιχούν στους ίδιους STs με άλλα διαδεδομένα CA-MRSA στελέχη σε όλο τον κόσμο. Πρόκειται για τα στελέχη που αποδόθηκαν στους ST1 (USA400), ST22, ST59, ST45 και ST398 [119,120,121,146,147,149]. Μάλιστα, ο ST398 είναι ένας νέος LA-MRSA (livestock-associated MRSA) κλώνος, ο οποίος εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ολλανδία και στη Δανία το 2003, συνδέθηκε με τα παραγωγικά ζώα και γρήγορα εξαπλώθηκε σε διάφορες χώρες [120,121,146,147], όπως και στην Ελλάδα, καθώς πρόσφατα περιγράφηκε και σε μία μελέτη που διεξήχθη στη Λάρισα [128]. Η ανεύρεση κοινών STs που αντιστοιχούν τόσο σε CA-MSSA όσο και σε CA-MRSA στελέχη σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελεί απόδειξη της γενετικής συσχέτισης μεταξύ των *S. aureus* στελεχών της κοινότητας. Η γενετική ομοιότητα συνεπάγεται την ενσωμάτωση των *SCCmec* στα MSSA στελέχη της κοινότητας, με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε MRSA ή σπανιότερα την αποκοπή των *SCCmec* από τα MRSA και κατ' επέκταση τη μετατροπή τους σε MSSA στελέχη. Με άλλα λόγια, όπως προκύπτει και από την

παρούσα μελέτη, ορισμένα MSSA στελέχη αποτελούν γενετικά προγονικά στελέχη, ή λιγότερο πιθανόν είναι απόγονα, των αντίστοιχων MRSA στελεχών της κοινότητας [146,149,150].

Επιπλέον, ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι μεταξύ των 32 CA-MSSA στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, μέσω της μοριακής ενίσχυσης με PCR τα 7 (21.9%) βρέθηκε να φέρουν τα γονίδια της τοξίνης PVL, ενώ σε 2 (6.3%) ανιχνεύθηκε το *tst* γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1). Τα MSSA στελέχη που βρέθηκε να παράγουν την PVL αποδόθηκαν σε δύο διαφορετικούς STs, τους ST72 και ST728, ενώ τα *tst*-θετικά στελέχη αποδόθηκαν και τα δύο στον ίδιο ST, τον ST34, μετά τη μοριακή τους τυποποίηση με τη μέθοδο της MLST. Στελέχη που να φέρουν ταυτόχρονα τα γονίδια της PVL και το *tst* γονίδιο δεν ανιχνεύθηκαν.

Τα MSSA στελέχη της παρούσας εργασίας που βρέθηκε να παράγουν σημαντικούς για το είδος του *S. aureus* λοιμογόνους παράγοντες, απομονώθηκαν από ασθενείς με δερματικές λοιμώξεις της κοινότητας, οι οποίοι κλινικά εμφάνιζαν δοθειήνα, ψευδάνθρακα ή μολυσματικό κηρίο. Έτσι, τα κλινικά, καθώς και τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών ήταν κοινά με εκείνα των ασθενών που εμφάνιζαν δερματικές λοιμώξεις της κοινότητας από MRSA στελέχη. Άλλωστε, σε προηγούμενες μελέτες έχει επίσης ήδη αποδειχθεί ότι οι κλινικοί και οι επιδημιολογικοί παράγοντες δεν επαρκούν από μόνοι τους για την αξιόπιστη διάκριση ασθενών με δερματικές λοιμώξεις της κοινότητας που οφείλονται σε MRSA στελέχη, από εκείνους με δερματικές λοιμώξεις που οφείλονται σε MSSA στελέχη. Αυτή η παρατήρηση περιπλέκει και δυσχεραίνει την κλινική θεραπευτική προσέγγιση και ειδικά την επιλογή της κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής για την εμπειρική θεραπεία των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων της κοινότητας, που εφαρμόζεται συχνά στην καθημερινή κλινική πράξη, καθώς η ευρεία κατηγορία των β-λακταμικών αντιβιοτικών έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα μόνο για τα MSSA στελέχη [151,152].

Η παραγωγή της κυτταροτοξίνης PVL έχει αποδοθεί σε στελέχη *S. aureus* και ειδικά σε CA-MRSA στελέχη, τα οποία προκαλούν κυρίως λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων στην κοινότητα, όπως είναι τα χαρακτηριστικά στελέχη ST80 που επικρατούν στην Ελλάδα και σε ολόκληρη την Ευρώπη. Η συσχέτιση της PVL με τα CA-MRSA στελέχη έχει αναμφισβήτητα μελετηθεί διεξοδικά σε παγκόσμιο επίπεδο. Ωστόσο, από μελέτες που έχουν διεξαχθεί στην Ελλάδα και παγκοσμίως προκύπτει ότι ένα μεγάλο ποσοστό των πολυκλωνικών MSSA στελεχών της κοινότητας παράγουν επίσης την PVL και ευθύνονται κυρίως για δερματικές λοιμώξεις στην κοινότητα [122,146,147,148,149], εύρημα που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μοριακή μελέτη. Μάλιστα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες τα CA-MSSA PVL-θετικά στελέχη ενοχοποιούνται όχι μόνο για σποραδικά κρούσματα, αλλά και για εξάρσεις και μικροεπιδημίες λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων στην κοινότητα, όπως αυτές περιγράφηκαν

ξεχωριστά σε ένα σχολείο της Ελβετίας, σε ένα χωριό της Γερμανίας, σε μία φυλακή της Γαλλίας, σε ένα προάστιο της Βόρειας Ιταλίας, καθώς και μεταξύ Γάλλων στρατιωτών στην Ακτή Ελεφαντοστού. Το βασικό στοιχείο που έχει σημασία να επισημανθεί είναι ότι σε όλες αυτές τις περιπτώσεις τα κύρια επιδημιολογικά, μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά των μικροεπιδημιών και εξάρσεων, ήταν αντίστοιχα με εκείνα πρόσφατων μικροεπιδημιών και εξάρσεων σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων στην κοινότητα, που προκλήθηκαν όμως από τυπικά CA-MRSA στελέχη [155,156].

Τέλος, στην παρούσα εργασία με βάση τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά που πραγματοποιήθηκε και το αντιβιογράμμα που προέκυψε, 11 (26.8%) στελέχη, από το σύνολο των 41 στελεχών *S. aureus* που ελέγχθηκαν, βρέθηκαν να παρουσιάζουν αντοχή ταυτόχρονα στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, ενώ 1 (2.4%) ήταν ανθεκτικό μόνο στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητο στην κλινδαμυκίνη. Μεταξύ των 11 στελεχών *S. aureus*, που παρουσίαζαν αντοχή ταυτόχρονα στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, τα 6 (54.5%) χαρακτηρίστηκαν ως MSSA, ενώ τα υπόλοιπα 5 (45.5%) ως MRSA. Μάλιστα, μεταξύ αυτών των 6 CA-MSSA στελεχών, τα 3 (50%) βρέθηκαν θετικά στην έκφραση των τοξινών της PVL ή της TSST-1. Συγκεκριμένα, μέσω της μοριακής τυποποίησης βρέθηκε ότι επρόκειτο για ένα στέλεχος ST728 PVL-θετικό, ένα ST72 PVL-θετικό και ένα ST34 *tst*-θετικό. Τα υπόλοιπα 3 CA-MSSA στελέχη περιελάμβαναν ένα στέλεχος ST45, ένα ST1 και το μοναδικό στέλεχος ST398 που ανιχνεύθηκε. Από την άλλη, τα MRSA στελέχη που εμφάνιζαν αντοχή ταυτόχρονα στην κλινδαμυκίνη και την ερυθρομυκίνη ήταν 2 στελέχη CA-MRSA ST80, καθώς και τα 3 στελέχη HA-MRSA ST225. Το μοναδικό *S. aureus* στέλεχος που παρουσίαζε αντοχή μόνο στην ερυθρομυκίνη και όχι στην κλινδαμυκίνη, ταξινομήθηκε ως CA-MSSA ST15. Στην Ελλάδα, εκτός από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η ερυθρομυκίνη (που ανήκει στις μακρολίδες) και η κλινδαμυκίνη (που ανήκει στις λινκοζαμίδες) αποτελούν αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη για την εμπειρική θεραπεία των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων και μάλιστα των σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων της κοινότητας. Ο ολοένα και αυξανόμενος ρυθμός ανάπτυξης αντοχής προς αυτά τα αντιβιοτικά στη χώρα μας, τόσο των MSSA όσο και των MRSA στελεχών της κοινότητας, που πιθανότατα οφείλεται στην υπερβολική και ανεξέλεγκτη χορήγηση αντιβιοτικών στην καθημερινή κλινική πράξη [145], είναι εύρημα που αξίζει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την επιλογή αντιβιοτικής αγωγής για την εμπειρική θεραπεία των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων στην κοινότητα.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, οι λοιμώξεις από *S. aureus* στελέχη της κοινότητας αποτελούν τα τελευταία χρόνια σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο όσο και στην Ελλάδα. Στην ιατρική κοινότητα σοβαρές ανησυχίες προκαλεί η αυξανόμενη

εξάπλωση και απομόνωση των CA-MRSA στελεχών, τα οποία συνδέονται συχνότερα με λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (SSTIs) στην κοινότητα, αλλά και με άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις. Παράλληλα, σημαντική κρίνεται και η διερεύνηση των MSSA στελεχών της κοινότητας, που πρωτίστως ευθύνονται για δερματικές λοιμώξεις, λόγω της εξίσου ισχυρής λοιμογόνου ικανότητάς τους μέσω της έκφρασης γονιδίων τοξινών, όπως της PVL. Η συστηματική μελέτη των *S. aureus* στελεχών της κοινότητας, η οποία περιλαμβάνει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, το προφίλ ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά, αλλά κυρίως τη μοριακή τους τυποποίηση και τη διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων τοξινών ή άλλων λοιμογόνων παραγόντων, είναι κρίσιμη για την κατανόηση της παθογένειας των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων, την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, καθώς και την εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων για τον περιορισμό της διασποράς του *S. aureus* στην κοινότητα και τον έλεγχο των λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτόν τον παθογόνο μικροοργανισμό.

ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kloos WE. Taxonomy and systematics of *staphylococci* indigenous to humans. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in Human Disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997:113–137
2. Mathema B, Mediavilla J, Chen L, Kreiswirth B. Evolution and taxonomy of *staphylococci*. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG. *Staphylococci in human disease*, Wiley-Blackwell, 2009:31-64
3. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Jorgensen EJ, Tenover JC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003
4. Παπαπαναγιώτου ΙΚ, Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνα Β. Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία, Β' Έκδοση, Θεσσαλονίκη, University Studio Press, 2004:15-20
5. Αρσένη Α. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων, 4^η Έκδοση, 1^{ος} Τόμος, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα, 2007:61-90
6. Somerville G, Proctor R. The Biology of *Staphylococci*. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG. *Staphylococci in human disease*. Wiley-Blackwell, 2009:3-18
7. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001, 357(9264):1225-1240
8. Gill SR, Fouts DE, Archer GL et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*. 2005, 187(7):2426-2438
9. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2006, 367(9512):731-739
10. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Husain SE, Butcher PD, Hinds J. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol*. 2006, 188(2):669-676
11. Robinson DA, Enright MC. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. *J Bacteriol*. 2004, 186(4):1060-1064
12. Gill RS. Genomics of the *staphylococci*. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG. *Staphylococci in human disease*. Wiley-Blackwell, 2009:19-30

13. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000, 38(3):1008-1015
14. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. Spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macro-variation. J Clin Microbiol. 2004, 42(2):792-799
15. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 2010, 67(18):3057-3071
16. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol. 2000, 54:641-679
17. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease. Infect Immun, 2002, 70:631-641
18. Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in Human Disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997:55-81
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Ιατρική Μικροβιολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αντωνιάδης Α, Μαλισιόβας Ν, 5^η Έκδοση, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, 2008:221-237
20. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ, Peschel A. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nat Med. 2004, 10(3):243-245
21. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. Adv Microb Physiol. 2006, 51:187-224
22. Foster TJ. Immune evasion by *staphylococci*. Nat Rev Microbiol. 2005, 3(12):948-958
23. Gómez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. J Biol Chem. 2006, 281(29):20190-20196
24. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Joseffson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. Microb Pathog. 2002, 33(5):239-249

25. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med.* 2004, 10(8):842-848
26. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect.* 2000, 41(1):23-31
27. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet.* 2004, 363(9403):139-149
28. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiaro J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun.* 2006, 74(4):2145-2153
29. Gillaspay AF, Lee CY, Sau S, Cheung AL, Smeltzer MS. Factors affecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1998, 66(7):3170-3178
30. George NP, Wei Q, Shin PK, Konstantopoulos K, Ross JM. *Staphylococcus aureus* adhesion via Spa, ClfA and SdrCDE to immobilized platelets demonstrates shear-dependent behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26(10):2394-2400
31. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology.* 2007, 153(Pt 8):2435-2446
32. Takahashi J, Komatsuzawa H, Yamada S, Nishida T, Labischinski H, Fujiwara T, Ohara M, Yamagishi J, Sugai M. Molecular characterization of an Atl null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 2002, 46(9):601-612
33. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrman M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost.* 2005, 94:278-285
34. Verbrugh HA, Peterson PK, Nguyen BY, Sisson SP, Kim Y. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. *J Immunol.* 1982, 129(4):1681-1687
35. Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Nicholson-Weller A, Lee JC. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun.* 2005, 73(6):3502-3511
36. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002, 43(6):1367-1378
37. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000, 13(1):16-34

38. Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C, Bayley H. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 91(26):12828-12831
39. Schlievert P, McCormick J, Bohach G, Ohlendorf D. Exotoxins. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in Human Disease*. Wiley-Blackwell, 2009:125-146
40. Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW. The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun*. 1993, 61(2):768-771
41. König B, Prévost G, König W. Composition of staphylococcal bicomponent toxins determines pathophysiological reactions. *J Med Microbiol*. 1997, 46(6):479-485
42. Boakes E, Kearns AM, Ganner M, Perry C, Hill RL, Ellington MJ. Distinct bacteriophages encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL) among international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones harboring PVL. *J Clin Microbiol*. 2011, 49(2):684-692
43. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010, 107(12):5587-5592
44. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999, 29(5):1128-1132
45. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R. Comparison of community- and health care- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*. 2003, 290(22):2976-2984
46. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003, 9(8):978-84
47. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis*. 2006, 194(12):1761-1770

48. Diep BA, Palazzolo-Balance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Kreiswirth BN, Otto M, DeLeo FR, Chambers HF. Contribution of Pantone-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. PLoS One. 2008, 3(9):e3198
49. Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo and the staphylococcal scalded-skin syndrome. N Engl J Med. 2006, 355(17):1800-1810
50. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003, 39(2):181-189
51. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol. 2001, 55:77-104
52. Schlievert PM, Tripp TJ, Peterson ML. Reemergence of staphylococcal toxic shock syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 surveillance period. J Clin Microbiol. 2004, 42(6):2875-2876
53. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. Clin Microbiol Rev. 2013, 26(3):422-447
54. McCormick JK, Bohach GA, Schlievert PM. Pyrogenic, lethal and emetic properties of superantigens in rabbits and primates. Methods Mol Biol. 2003, 214:245-253
55. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis. 2004, 189(12):2334-2336
56. Rooijackers SH, van Wamel WJ, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes Infect. 2005, 7(3):476-484
57. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2004, 150(pt 1):217-228
58. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. Virulence. 2011, 2(5):445-459
59. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits and adaptive responses. Int J Med Microbiol. 2004, 294(2-3):203-212

60. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol.* 2002, 184(4): 1180-1186
61. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997, 10(3):505-520
62. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005, 5(12): 751-762
63. Solberg CO. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scand J Infect Dis.* 2000, 32(6):587-595
64. Reagan DR, Doebbeling BN, Pfaller MA, Sheetz CT, Houston AK, Hollis RJ, Wenzel RP. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann Intern Med.* 1991, 114(2):101-106
65. Mertz D, Frei R, Jaussi B, Tietz A, Stebler C, Flückiger U, Widmer AF. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2007, 45(4):475-477
66. Pantosti A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and its relevance to Human Health. *Front Microbiol.* 2012, 3:127
67. Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, Boelens HA, Hofman A, van Belkum A, Verbrugh HA. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a “culture rule”. *Clin Infect Dis.* 2004, 39(6):806-811
68. VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol.* 1999, 37(10):3133-3140
69. Lebon A, Labout JA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, van Wamel W, Moll HA, van Belkum A. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(10):3517-3521
70. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010, 23(3):616-687
71. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med.* 2001, 344(1):11-16

72. Tammelin A, Klötz F, Hambræus A, Stahle E, Ransjö U. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a Department for Thoracic and Cardiovascular Surgery: endogenous or exogenous source? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003, 24(9):686-689
73. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 2001, 32 Suppl 2:S114-132
74. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. National Healthcare Safety Network Team, Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008, 29(11):996-1011
75. Laupland KB, Gregson DB, Flemons WW, Hawkins D, Ross T, Church DL. Burden of community-onset bloodstream infection: a population-based assessment. *Epidemiol Infect*. 2007, 135(6):1037-1042
76. Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis*. 2003, 187(9):1452-1459
77. Crum NF, Lee RU, Thornton SA, Stine OC, Wallace MR, Barrozo C, Keefer-Norris A, Judd S, Russell KL. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Med*. 2006, 119(11):943-951
78. Jacobsson G, Dashti, Wahlberg T, Andersson R. The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden. *Scand J Infect Dis*. 2007, 39(1): 6-13
79. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005, 5(5):275-286
80. Ζιάκας Γ. Εσωτερική Παθολογία, 3^η Έκδοση, 1^{ος} Τόμος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ιατρικής-Τομέας Παθολογίας, Θεσσαλονίκη, University Studio Press, 2004:175-180
81. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998, 339:520-532

82. Χρυσομάλλης Φ και συνεργάτες. Δερματολογία-Αφροδισιολογία, Θεσσαλονίκη, University Studio Press, 2005: 55-69
83. Pereira LB. Impetigo-review. *An Bras Dermatol.* 2014, 89(2):293-299
84. Mempel M. Skin diseases induced by *Staphylococcus aureus*. *CME Dermatol.* 2008, 3(1):20-30
85. Fitzpatrick T, Johnson R, Wolff K, Suurmond D. Κλινική Δερματολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Κατσάμπας Α, 2^{ος} Τόμος, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2003:650-692
86. Ibler KS, Kromann CB. Recurrent furunculosis-challenges and management: a review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2014, 7:59-64
87. Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, Chiba J, Kamio Y, Iwatsuku K. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine Leukocidin genes and the development of deep-seated Follicular Infection. *Clin Infect Dis.* 2005, 40:381-385
88. Sanabria TJ, Alpert JS, Goldberg R, Pape LA, Cheeseman SH. Increasing frequency of staphylococcal infective endocarditis: experience at a university hospital, 1981 through 1988. *Arch Intern Med* 1990, 150:1305-1309
89. Hase R, Otsuka Y, Yoshida K, Hosokawa N. Profile of infective endocarditis at a tertiary-care hospital in Japan over a 14-year period: characteristics, outcome and predictors for in-hospital mortality. *Int J Infect Dis.* 2015, 7(33C):62-66
90. Papamythiotou E, Souli M, Galani I, Giamarellou H, Armaganidis A. Success stories about severe pneumonia caused by Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Braz J Infect Dis.* 2014, 18(3):341-345
91. Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician.* 2011, 84(9):1027-1033
92. Bremmel T, Abdelnour A, Tarkowski A. Histopathological and serological progression of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Infect Immun.* 1992, 60(7):2976-2985
93. Sheldon AT Jr. Antibiotic resistance: a survival strategy. *Clin Lab Sci.* 2005, 18(3):170-180
94. Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 268(1):98-105

95. Yin S, Daum RS, Boyle-Vavra S. VraSR two-component regulatory system and its role in induction of PBP2 and VraSR expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006, 50(1):336-343
96. Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, Novick RP, Barbé J, Penadés JR. Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2006, 188(7):2726-2729
97. Katayama Y, Zhang HZ, Hong D, Chambers HF. Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2003, 185(18):5465-5472
98. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*, 2001, 7:178-182
99. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003, 111(9):1265-1273
100. Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in *staphylococci*. *Lancet*, 1963, i:904-907
101. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. National Nosocomial Infections Surveillance System. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis*. 2006, 42(3):389-391
102. Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis*. 2008, 46(6):787-794
103. Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med*. 1982, 97:325-329
104. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009, 7(9):629-641
105. Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mechanisms of resistance and implications for treatment. *Postgrad Med*. 2001, 109(2 Suppl):43-50
106. Oliveira DC, de Lencastre H. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: a surprising observation. *PLoS One*. 2011, 6(8):e23287
107. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 2010, 67(18):3057-3071

108. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2007, 13(3):222-235
109. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sorum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2011, 55(6):3046-3050
110. Katayama Y, Robinson DA, Enright MC, Chambers HF. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005, 43(5):2380-2383
111. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99(11):7687-7692
112. De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. Curr Opin Microbiol. 2007, 10(5):428-435
113. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococci* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003, 9(12):1179-1186
114. Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, de Lencastre H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. J Clin Microbiol. 2003, 41(5):2027-2032
115. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW. European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med. 2010, 7(1):e1000215
116. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundmann H. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis. 2004, 10(9):1627-1634
117. Chini V, Petinaki E, Meugnier H, Foka A, Bes M, Etienne J, Dimitrakopoulos G, Spiliopoulou I. Emergence of a new clone carrying Pantone-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome *mec* type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. Scand J Infect Dis. 2008, 40(5):368-372
118. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. N Engl J Med. 2006, 355(7):666-674

119. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2010, 10(4):227-239
120. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, Reverdy ME, Enright MC, Vandenesch F, Etienne J. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007, 13(4):594-600
121. Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, van Leeuwen WB, van Duijkeren E, Huijsdens XW, Spalburg E, de Neeling AJ, Verbrugh HA. Methicillin-resistant and – susceptible *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14(3):479-483
122. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2006, 12(1):29-34
123. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Stamatakis E, Vris A, Christodoulidi I, Protopapadakis G, Spiliopoulou I. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect.* 2008, 14(11):995-1001
124. Tsironi E, Zacharaki F, Grivea I, Tachmitzi S, Michoula A, Vlychou M, Petinaki E, Syrogiannopoulos G. European ST80 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orbital cellulitis in a neonate. *BMC Ophthalmol.* 2012, 12:7
125. Dailiana Z, Rigopoulos N, Varitimidis S, Poultides L, Petinaki E, Malizos K. Clinical and epidemiological features of upper-extremity infections caused by *Staphylococcus aureus* carrying the PVL gene: A four-year study in Greece. *Med Sci Monit.* 2008, 14(10):CR511-515
126. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakis A, Jelastopulu E, Chini V, Spiliopoulou A, Levidiotou S, Panagea T, Vogiatzi A, Lebessi E, Petinaki E, Spiliopoulou I. A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? *Clin Microbiol Infect.* 2014, 20(11):O796-803
127. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, Pasparakis DG, Kafetzis DA, Tsolia MN. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008, 27(9):831-837
128. Drougka E, Foka A, Marangos MN, Liakopoulos A, Makatsoris T, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. The first case of *Staphylococcus aureus* ST398 causing

bacteremia in an immunocompromised patient in Greece. *Indian J Med Microbiol.* 2012, 30(2):232-236

129. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis.* 2008, 197(9):1226-1234

130. Grundmann H, Tami A, Hori S, Halwani M, Slack R. Nottingham *Staphylococcus aureus* population study: prevalence of MRSA among elderly people in the community. *BMJ.* 2002, 324(7350):1365-1366

131. Skov R, SSAC MRSA Working Party. MRSA infections increasing in the Nordic countries. *Euro Surveill.* 2005, 10(8):E050804.2

132. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007, 13(3):222-235

133. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995, 33(9):2233-2239

134. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 1999, 37(11):3556-3563

135. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the Multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(9):3374-3377

136. Παπαπαναγιώτου ΙΚ. Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία. Τόμος 1^{ος}, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Παρατηρητής, 1999:16-26

137. Lazarevic V, Gaïa N, Girard M, François P, Schrenzel J. Comparison of DNA extraction methods in analysis of salivary bacterial communities. *PLoS One.* 2013, 8(7):c67699

138. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med.* 1990, 322(3):178-183

139. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988, 239(4839):487-491

140. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας-Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2000:367-403
141. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013, 133(3):c6
142. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:W728-733
143. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol.* 2003,185(11):3307-3316
144. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and Soft-Tissue Infections caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008, 46:S368-377
145. Katopodis GD, Grivea IN, Tsantsaridou AJ, Pournaras S, Petinaki E, Syrogiannopoulos GA. Fucidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece. *BMC Infect Dis.* 2010, 10:351
146. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Tristan A. Global distribution and evolution of Panton-Valentine Leukocidin-positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981-2007. *J Infect Dis.* 2010, 201(10):1589-1597
147. Zhao C, Liu Y, Zhao M, Liu Y, Yu Y, Chen H, Sun Q, Chen H, Jiang W, Liu Y, Han S, Xu Y, Chen M, Cao B, Wang H. Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with Skin and Soft Tissue Infection in Beijing: High prevalence of PVL⁺ ST398. *PLoS One.* 2012, 7(6):e38577
148. Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S, Reed P, Ritchie S, Lennon D, Roberts S. Incidence, risk factors and outcomes of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* infections in Auckland, New Zealand. *J Clin Microbiol.* 2010, 48(10):3470-3474
149. Miko BA, Hafer CA, Lee CJ, Sullivan SB, Hackel MAM, Johnson BM, Whittier S, Della-Latta P, Uhlemann AC, Lowy FD. Molecular characterization of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010. *J Clin Microbiol.* 2013, 51(3):874-879

150. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA. Methicillin-Resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006, 355:666-674
151. Miller LG, Perdreau-Remington F, Bayer AS, Diep B, Tan N, Bharadwa K, Tsui J, Perlroth J, Shay A, Tagudar G, Ibebuogu U, Spellberg B. Clinical and Epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. *Clin Infect Dis*. 2007, 44:471-482
152. Miller LG, Quan C, Shay A, Mostafaie K, Bharadwa K, Tan N, Matayoshi K, Cronin J, Tan J, Tagudar G, Bayer AS. A prospective investigation of outcomes after hospital discharge for endemic, community-acquired methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* skin infection. *Clin Infect Dis*. 2007, 44:483-492
153. Schulte B, Bierbaum G, Pohl K, Goerke C, Wolz C. Diversification of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains (Rhine-Hesse Clone) within Germany. *J Clin Microbiol*. 2013, 51(1):212-216
154. Nübel U, Dordel J, Kurt K, Strommenger B, Westh H, Shukla SK, Zemlichova H, Leblois R, Wirth T, Jombart T, Balloux F, Witte W. A timescale for evolution, population expansion and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*. 2010, 6(4):e1000855
155. Tinelli M, Monaco M, Vimercati M, Ceraminiello A, Pantosti A. Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Skin and Soft Tissue Infections, Northern Italy. *Emerg Infect Dis*. 2009, 15(2):250-257
156. Bourigault C, Corvec S, Brulet V, Robert PY, Mounoury O, Goubin C, Boutoille D, Hubert B, Bes M, Tristan A, Etienne J, Lepelletier D. Outbreak of skin infections due to Panton-Valentine Leukocidin-positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a French prison in 2010-2011. *PLoS Curr*. 2014, 6:1-12

