



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**" ΜΕΛΕΤΗ *mecA*-ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *STAPHYLOCOCCUS*  
*AUREUS* ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ "**

υπό

**ΜΑΡΙΑ Α. ΛΑΜΠΡΟΥ**

Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2012

© 2012 Μαρία Λάμπρου

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

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (10<sup>ο</sup>/28-11-2007 ΓΣΕΣ):**

- |   |  |
|---|--|
| <b>1<sup>ος</sup> Εξεταστής</b><br><b>(Επιβλέπων)</b> | <b>Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας</b><br><i>Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br/>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>                       |
| <b>2<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Αθανάσιος Τσακρής</b><br><i>Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και<br/>Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών</i>            |
| <b>3<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος</b><br><i>Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,<br/>Πανεπιστήμιο Πατρών</i>                      |
| <b>4<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος</b><br><i>Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο<br/>Θεσσαλίας</i>                              |
| <b>5<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος</b><br><i>Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο<br/>Θεσσαλίας</i>                            |
| <b>6<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη</b><br><i>Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br/>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>                    |
| <b>7<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                       | <b>Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου</b><br><i>Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα<br/>Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i> |

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Πουρνάρα Σπύρο, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διδακτορική διατριβής αυτής. Η συμβολή του στην διεξαγωγή αυτής της μελέτης υπήρξε καθοριστική, καθώς οι υποδείξεις, η βοήθεια και η στήριξη σε όλα τα στάδια, υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Θερμά ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού πανεπιστημίου Αθηνών κ. Τσακρή Αθανάσιο και τον κ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών των οποίων οι υποδείξεις και η καθοδήγηση συνέβαλαν σημαντικά στην εκπόνηση της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Αντώνιο Μανιάτη, αφυπηρετήσαντα Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη συμβολή του στην διεκπαιρέωση αυτής της διατριβής. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στους κ. Μαλίζο Κωνσταντίνο Καθηγητή Ορθοπαιδικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Συρογιαννόπουλο Γεώργιο Καθηγητή Παιδιατρικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Πετεινάκη Ευθυμία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή.

*Λάρισα, 2012*

*Μαρία Α. Λάμπρου*

*Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος*

## **ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

**2007:** Πτυχιούχος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Βαθμός πτυχίου: Λίαν καλώς, 7.70)

**2007/08–Σήμερα:** Υποψήφια διδάκτορας Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Θέμα: "Μελέτη *mecA*-θετικών κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* με διαφορετικά επίπεδα αντοχής στη μεθικιλίνη". Επιβλέπων Καθηγητής: Σπύρος Πουρνάρας, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2010:** Μεταπτυχιακός τίτλος: "Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος", Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Βαθμός πτυχίου: Λίαν καλώς, 7.62)

**Ξένη γλώσσα:** Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English, Michigan 2004)

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- Σύμβαση ανάθεσης έργου από την 01/01/12 μέχρι 31/05/2012 για την εκπόνηση του έργου «ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ *IN VIVO* ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ, ΜΕΡΟΠΕΝΕΜΗ, ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ Ή ΓΕΝΤΑΜΙΚΙΝΗ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ KPC-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE ΣΕ ΖΩΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΤΟΥ ΜΗΡΟΥ»
- Σύμβαση ανάθεσης έργου από την 01/01/11 μέχρι 30/04/2011 για την εκπόνηση του έργου «BIOMEMBRANES ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ» - «ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ».
- Σύμβαση ανάθεσης έργου από την 02/12/09 μέχρι 31/12/2010 για την εκπόνηση του έργου «BIOMEMBRANES ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ» - «ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΝΑ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΝΑ ΑΝΘΙΣΤΑΝΤΑΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ».

- Σύμβαση ανάθεσης έργου από την 01/06/09 μέχρι 01/12/2009 για την εκπόνηση του έργου «ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ» - «ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΝΑ ΕΠΙΒΙΩΝΟΥΝ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ».

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Labrou M**, Michail G, Ntokou E, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. **(2012)** Activity of Oxacillin versus that of Vancomycin against Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates evaluated by Population Analyses, Time-Kill Assays, and a Murine Thigh Infection Model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56(6):3388-91.
2. Giannouli S, **Labrou M**, Kyritsis A, Ikonomidis A, Pournaras S, Stathopoulos C and Tsakris A. **(2010)** Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4):626-633.
3. Alexandros Ikonomidis, George Michail, Afroditi Vasdeki, **Maria Labrou**, Vasilis Karavasilis, Constantinos Stathopoulos, Antonios N. Maniatis and Spyros Pournaras. **(2008)** *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations of Oxacillin Efficiency against *mecA*-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52(11):3905-8.
4. Maragozidis P, Karangeli M, **Labrou M**, Dimoulou G, Papaspyrou K, Salataj E, Pournaras S, Matsouka P, Gourgoulialis KI, Balatsos NA. **(2012)** Alterations of Deadenylase Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly(A)-Specific Ribonuclease as a Potential Biomarker. *Acta Haematologica*, 17;128(1):39-46.
5. Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I, Dimitroulia E, **Labrou M**, Vasdeki A, Makris D, Zakynthinos E, Tsakris A, Pournaras S. **(2012)** Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 1819–1823.
6. Tsikrikonis G, Maniatis AN, **Labrou M**, Ntokou E, Michail G, Daponte A, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S. **(2012)** Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathogenesis*, 52(6):336-43.

7. Alexandros Ikonomidis, **Maria Labrou**, Zoe Afkou, Antonios N. Maniatis, Danai Sofianou, Athanassios Tsakris and Spyros Pournaras. **(2007)** First Occurrence of an *Escherichia coli* Clinical Isolate Producing the VIM-1/VIM-2 Hybrid Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-12. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51(8):3038-9.

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Πόστερ στο 21<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (ECCMID)/ 27<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Χημειοθεραπείας (ICC) **(2011)**: George Michail, **Maria Labrou**, Constantinos Stathopoulos, Athanassios Tsakris, and Spyros Pournaras; Experimental Infections caused by Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Treated by Oxacillin versus Vancomycin.
2. Πόστερ στο 49<sup>ο</sup> ICAAC Meeting **(2009)** της American Society for Microbiology: **Maria Labrou**, Alexandros Ikonomidis, Stamatina Giannouli, George Michail, Athanassios Kyritsis, Afroditi Vasdeki, Athanassios Tsakris, Constantinos Stathopoulos, and Spyros Pournaras; Oxacillin versus Vancomycin Efficiency against Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates.
3. Πόστερ στο 52<sup>ο</sup> ICAAC Meeting **(2012)** της American Society for Microbiology: G. Michail, **M. Labrou**, S. Manousaka, A. Tsakris and S. Pournaras; Activity of Tigecycline Combinations in Experimental Infections Caused by KPC-producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates.
4. Πόστερ στο 22<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (ECCMID) **(2012)**: G. Michail, **M. Labrou**, E. Ntokou, I. Kristo, S. Manousaka, A. Tsakris and S. Pournaras; *In vivo* efficacy of tigecycline alone and in combination with colistin, meropenem and gentamicin against KPC-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a mouse thigh infection model.

**" ΜΕΛΕΤΗ *mecA*-ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ"**

**ΜΑΡΙΑ Α. ΛΑΜΠΡΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα, Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**,
- 2. Δρ. Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3. Δρ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών



*Στους γονείς μου*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>18</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ.....</b>	<b>22</b>
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	22
1.1.2 Μικροβιολογία και ταξινόμηση σταφυλοκόκκων.....	23
1.1.3 Δομή του σταφυλοκόκκου.....	26
1.1.4 Κυτταρικό τοίχωμα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων.....	27
1.1.5 Κυτταρικό τοίχωμα του <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
1.1.6 Παράγοντες Fem και αλληλεπίδρασή τους με μόρια tRNA <sup>Gly</sup> .....	33
1.1.7 Κλινικές λοιμώξεις χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου ( <i>S. aureus</i> ).....	35
1.1.8 Επιδημιολογία σταφυλοκόκκου.....	38
1.1.9 Επιδημιολογική υποποίηση σταφυλοκοκκικών στελεχών.....	39
1.1.10 Αντιβιοτικά και αντοχή.....	39
1.1.10.1 β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	40
<b>1.2 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ ΧΡΥΣΙΖΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ (MRSA).....</b>	<b>43</b>
1.2.1 Penicillin-binding proteins/Τρανσπεπτιδάσες: οι στόχοι των β-λακταμικών αντιβιοτικών.....	44
1.2.2 Αντοχή στη μεθικιλίνη.....	45
1.2.3 PBP2a.....	46
1.2.4 Ρύθμιση της έκφρασης της PBP2a.....	49
1.2.5 Διαμόρφωση της αντοχής στη μεθικιλίνη.....	53
1.2.6 Εσωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλίνη.....	53
1.2.7 Εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλίνη.....	55
1.2.8 Ενώσεις που διαμορφώνουν την αντοχή στη μεθικιλίνη.....	55
1.2.9 Σταφυλόκοκκος χρυσίζων ανθεκτικός στη μεθικιλίνη που προέρχεται από το νοσοκομείο (HA-MRSA).....	56
1.2.10 MRSA που προέρχεται από την κοινότητα (CA-MRSA).....	56
<b>1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>S. AUREUS</i> ΜΕ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ (MRSA).....</b>	<b>59</b>
1.3.1 Προέλευση του MRSA.....	59
1.3.2 Επιδημιολογία του MRSA.....	62
1.3.3 Επιδημιολογία του MRSA της κοινότητας (CA-MRSA).....	63
1.3.4 Παθογένεια των CA-MRSA.....	65

1.3.5 MRSA εξελισσόμενη μικροβιακή αντοχή.....	66
1.3.6 Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	71
1.4 ΕΜΦΑΝΙΣΗ MRSA ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΞΑΚΙΛΛΙΝΗ (OXACILLIN-SUSCEPTIBLE MRSA, OS-MRSA).....	72
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	77

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	79
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη.....	80
2.1.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση.....	82
2.1.3 Μικροβιακή ταυτοποίηση.....	82
2.1.4 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.....	82
2.1.4.1 Παρασκευή εναιωρήματος μικροβίου.....	82
2.1.4.2 Εκτέλεση μεθόδου ευαισθησίας.....	83
2.1.4.3 Μέθοδος Kirby-Bauer.....	83
2.1.4.4 Μέθοδος αραίωσης των αντιβιοτικών σε άγαρ.....	84
2.1.4.5 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) με τη μέθοδο του E-test.....	84
2.1.4.6 Μέθοδος μικροαραιώσεων σε σωληνάρια.....	86
2.1.4.6.1 Προσδιορισμός της MIC στην οξακιλλίνη και βανκομυκίνη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ.....	87
2.1.5 Μικροβιακή τυποποίηση.....	87
2.1.6 Γενετική τυποποίηση των Σταφυλοκόκκων.....	88
2.1.6.1 Γενετική συσχέτιση των στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE).....	89
2.1.6.2 Τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων (MLST-MultiLocus Sequence Typing).....	94
2.1.7 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis).....	95
2.1.8 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays).....	96
2.1.9 Εξαγωγή του γενωμικού μικροβιακού DNA.....	97
2.1.10 Ανίχνευση της PBR2a και του <i>mecA</i> γονιδίου.....	97

2.1.11 Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	98
2.1.12 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	100
2.1.13 Καθαρισμός και αποστολή των PCR προϊόντων για νουκλεοτιδική αλληλούχηση.....	101
2.1.14 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες.....	102
2.1.15 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Quantitative Real Time PCR).....	104
2.1.16 Κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδίων και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.....	106
2.1.17 Γενωμική ανάλυση και μοριακή μοντελοποίηση των FemABX πρωτεϊνών.....	106
2.1.18 Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών.....	107
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>109</b>
3.1 Προέλευση στελεχών και αρχικός προσδιορισμός των χαρακτηριστικών τους.....	110
3.2 Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών <i>S. aureus</i> με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE).....	111
3.3 Ενίσχυση με PCR του γονιδίου <i>mecA</i> και του γονιδίου της τοξίνης PVL των σταυλοκόκκων.....	114
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΩΤΑ 4 OS-MRSA ΣΤΕΛΕΧΗ.....	115
3.4.1 Μικροβιακή ταυτοποίηση και έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.....	115
3.4.2 Γενετική τυποποίηση.....	116
3.4.3 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis) και Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays).....	116
3.4.4 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες.....	120
3.4.5 qRT–PCR assays.....	121
3.4.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων και alignments (αντιστοιχίσεις).....	122
3.4.7 In silico ανάλυση της δομής των παραγόντων Fem.....	126
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ 15 OS-MRSA ΣΤΕΛΕΧΗ.....	129

3.5.1 Μικροβιακή ταυτοποίηση και έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.....	129
3.5.2 Γενετική τυποποίηση των 15 OS-MRSA.....	130
3.5.2.1 Αναλυτικά αποτελέσματα MLST τυποποίησης.....	130
3.5.3 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis) και Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays).....	135
3.5.4 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες.....	141
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>144</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>150</b>
<b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>154</b>





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο κάθε στελέχους που φέρει το γονίδιο *mecA*, τα επίπεδα αντοχής μπορεί να κυμαίνονται από φαινοτυπική ευαισθησία έως υψηλή αντοχή. Χαρακτηριστικό πολλών στελεχών MRSA αποτελεί η ετερογενής έκφραση της αντοχής, η οποία οφείλεται στον διαχωρισμό ενός ισχυρά ανθεκτικού υποπληθυσμού μετά από έκθεση σε μεθικιλίνη. Η μέγιστη έκφραση αντοχής από την μεταλλαγμένη πενικιλινο-δεσμευτική πρωτεΐνη PBP2' απαιτεί την ορθή και αποτελεσματική σύνθεση των προδρόμων μορίων της πεπτιδογλυκάνης. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και αποικοδόμηση των πρόδρομων του κυτταρικού τοιχώματος, τη ρύθμιση, τη μεταφορά και μεταγωγή σήματος μπορεί να καθορίσουν το επίπεδο αντοχής που εκφράζεται. Σε αυτό το στάδιο, ωστόσο, δεν υπάρχουν πληροφορίες διαθέσιμες σχετικά με τη λειτουργία ή την αποτελεσματικότητα αυτών των παραγόντων στα κλινικά στελέχη, σε σχέση με τα επίπεδα αντοχής στη μεθικιλίνη.

Στελέχη *S. aureus* της κοινότητας που φέρουν το *mecA* γονίδιο και την PBP2' αλλά εμφανίζουν φαινοτυπικά ευαισθησία στην οξακιλλίνη (OS-MRSA, oxacillin MIC  $\leq 2$  mg/L) αναφέρονται όλο και περισσότερο παγκοσμίως, με μία σαφή αναφορά να υπάρχει και από το ΠΓΝ Λάρισας. Για το λόγο αυτό, αρχικά μελετήσαμε τέσσερα κλινικά στελέχη *S. aureus* που φέρουν το *mecA* γονίδιο με MIC στην οξακιλλίνη  $< 2$  mg/L και ακολούθησε μελέτη της απόκρισης αυτών στην οξακιλλίνη με πληθυσμιακές αναλύσεις και πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες. Τα στελέχη αυτά έχουν SCC<sub>mec</sub> τύπου IV και ανήκουν σε δύο γονότυπους. Δύο από τα τέσσερα στελέχη βρέθηκαν, από την πληθυσμιακή ανάλυση, να είναι πραγματικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη. Και τα τέσσερα στελέχη εμφάνισαν σημαντικές μειώσεις στον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από θεραπεία με δικλοξακιλλίνη κατά τη διαδικασία των πειραματικών λοιμώξεων σε μηρό, κάτι που έγινε επίσης για ένα στέλεχος ελέγχου (control) *S. aureus* που είναι *mecA* αρνητικό. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ορισμένα από τα φαινοτυπικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη *mecA*-θετικά στελέχη *S. aureus* μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να ανταποκρίνονται στην οξακιλλίνη.

Παράλληλα, εστιάσαμε σε επιπρόσθετους παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν στην φαινοτυπική ευαισθησία με στόχο να αποκτήσουμε γνώσεις σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο. Διερευνήσαμε το νουκλεοτιδικό περιεχόμενο των

*femA*, *femB* και *femX* γονιδίων, τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για την αντοχή στη μεθικιλίνη, σε τέσσερα κλινικά στελέχη OS-MRSA του SCCmec-IV τύπου. Πραγματοποιήσαμε ποσοτική Real-Time PCR, η οποία έδειξε ότι τα γονίδια *mecA*, *femA*, *femB* και *femX* εκφράστηκαν στα ίδια επίπεδα σε όλα τα στελέχη. Επιπροσθέτως, εντοπίσαμε και στα τρία *fem* γονίδια αρκετές μεταλλάξεις που οδηγούν σε ουσιαστικές αντικαταστάσεις αμινοξέων σε θέσεις που ενδεχομένως να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των Fem ενζύμων. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *femX* ήταν περισσότερο συντηρημένες στα δύο OS-MRSA στελέχη που αναπτύχθηκαν και ήταν πλήρως λειτουργικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη με όλες τις δυνατές δοκιμασίες (χαρακτηριστικά αναπτύχθηκαν μόνο μέχρι 1 mg/L οξακιλλίνης στην πληθυσμιακή ανάλυση). Θεωρούμε ότι η συσσώρευση αυτών των αμινοξικών αλλαγών μπορεί να επηρεάσει την ανέπαφη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, συμβάλλοντας στην μη αναμενόμενη ανταπόκριση αυτών των στελεχών στην οξακιλλίνη.

Τέλος, συγκρίναμε *in vitro* την δραστικότητα της δικλοξακιλλίνης με εκείνη της βανκομυκίνης σε 15 κλινικά στελέχη OS-MRSA. Με πληθυσμιακές αναλύσεις, διαπιστώσαμε ότι 6 OS-MRSA στελέχη ήταν σε θέση να αναπτυχθούν παρουσία μέχρι και 8 mg/L δικλοξακιλλίνης, ενώ 9 στελέχη ήταν σε θέση να αναπτυχθούν σε 12 έως >32 mg/L δικλοξακιλλίνης. Όλα τα στελέχη ήταν πλήρως ευαίσθητα και αναπτύχθηκαν μέχρι 2 mg/L βανκομυκίνης. Και τα δύο φάρμακα όμως παρουσίασαν παρόμοιες βακτηριοκτόνες δραστηριότητες. Στις πειραματικές λοιμώξεις, η θεραπευτική αποτελεσματικότητα της δικλοξακιλλίνης (το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα της οξακιλλίνης) σε 10 OS-MRSA στελέχη ήταν σημαντική [ $P < 0.05$  σε σχέση με μάρτυρες (control) χωρίς θεραπεία] ενώ η βανκομυκίνη ήταν αποτελεσματική ( $P < 0.05$ ) έναντι σε 12 OS-MRSA στελέχη. Παράλληλα, η δικλοξακιλλίνη είχε αποτελεσματικότητα η οποία ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της βανκομυκίνης ( $P > 0.05$ ) σε 8 OS-MRSA στελέχη. Η ευνοϊκή ανταπόκριση στη θεραπεία με δικλοξακιλλίνη μπορεί να υποδηλώνει ότι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν σε OS-MRSA λοιμώξεις.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ

Οι Σταφυλόκοκκοι είναι αερόβιοι και δυνητικά αναερόβιοι καταλάση-θετικοί Gram-θετικοί κόκκοι.

### 1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο σταφυλόκοκκος για πρώτη φορά παρατηρήθηκε και καλλιεργήθηκε από τους Pasteur και Koch, όμως οι πρώτες εκτεταμένες μελέτες σε σταφυλόκοκκους πραγματοποιήθηκαν από τους Ogston (1881) και Rosenbach (1884).

Το όνομα του γένους σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus*) προέρχεται από τον ελληνικό όρο «σταφυλή» που σημαίνει «τσαμπί από σταφύλι» και οφείλεται στο γεγονός ότι οι Gram-θετικοί αυτοί κόκκοι αναπτύσσονται με τέτοιο τρόπο που μοιάζουν με τσαμπί από σταφύλι, κάτι που παρατήρησε πρώτος ο Ogston το 1881 σε πύον από ανθρώπινο απόστημα (Ogston, 1881).

Τρία έτη αργότερα, ο Rosenbach κατάφερε να απομονώσει και να αναπτύξει αυτούς τους μικροοργανισμούς σε καθαρή καλλιέργεια. Έδωσε σε αυτά τα βακτηρίδια το συγκεκριμένο επίθετο σταφυλόκοκκος χρυσίζων (*Staphylococcus aureus*) λόγω της κίτρινης-πορτοκαλί χρωματισμένης εμφάνισης των αποικιών τους. Ο Rosenbach έδειξε ότι ο *S. aureus* ήταν υπεύθυνος για λοιμώξεις σε πληγές μετά από τραυματισμό και για τη δοθιήνωση και ότι ο *Staphylococcus epidermidis* ήταν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος (Rosenbach, 1884). Από τότε που περιέγραψε ο Rosenbach για πρώτη φορά την ανάπτυξη αυτού του «χρυσού» κόκκου, οι χειρουργοί ανησυχούν για μετεγχειρητικές λοιμώξεις των τραυμάτων από σταφυλόκοκκο (Hart, 1937). Οι σταφυλόκοκκοι προκάλεσαν επίσης απειλητική για τη ζωή ασθένεια μετά από τραυματισμούς και θανατηφόρα πνευμονία κατά τη διάρκεια της περιόδου της γρίπης (Bennet et al., 1954). Ως εκ τούτου, κατά την εποχή προ των αντιβιοτικών, ο *S. aureus* ήταν γνωστός ως ένας σημαντικός παθογόνος παράγοντας απειλητικός για τη ζωή. Οι λοιμώξεις από σταφυλόκοκκο χαρακτηρίζονται από έντονη πυώδη φλεγμονή των τοπικών ιστών με μια τάση για το σχηματισμό αποστήματος. Η πιο κοινή λοίμωξη από σταφυλόκοκκο είναι ο δοθιήνας, ο οποίος είναι μια επώδυνη τοπική επιφανειακή λοίμωξη του δέρματος που αναπτύσσεται σε ένα θύλακα τρίχας ή αδένα. Ο δοθιήνας συχνά δημιουργείται σαν συνέχεια θυλακίτιδας, ιδιαίτερα σε περιοχές με αυξημένη τριβή και εφίδρωση,

όπως ο λαιμός και οι γλουτοί, συχνά ως αποτέλεσμα των στενών ρούχων που φοράμε. Η λοίμωξη από σταφυλόκοκκο μπορεί από ένα δοθιήνα να επεκταθεί στον υποδόριο ιστό με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός ή περισσότερων αποστημάτων.

Λόγω της σημαντικής συμβολής της πενικιλίνης στον αγώνα ενάντια σε λοιμώξεις από *S. aureus*, η περίοδος ανάμεσα στο 1946 και το 1950 αναφερόταν σαν η «χρυσή εποχή» για την θεραπεία στην σταφυλοκοκκική λοίμωξη. Ωστόσο, η ταχύτατη διασπορά των ανθεκτικών σταφυλοκόκκων σύντομα οδήγησε στην επιστροφή αυτού του σημαντικού παθογόνου.

### 1.1.2 Μικροβιολογία και ταξινόμηση σταφυλοκόκκων

Η οικογένεια των Micrococcaceae αποτελείται από τέσσερα γένη:

- *Planococcus*
- *Stomatococcus*
- *Micrococcus*, και
- *Staphylococcus* (Kloos, 1997)

Τα πιο σημαντικά γένη είναι το *Micrococcus* και *Staphylococcus*, τα οποία διαφέρουν ως προς τη διευθέτηση των κυττάρων τους, τη σχέση τους με το οξυγόνο, την ικανότητα ζύμωσης της γλυκόζης παρουσία οξειδάσης, τειχικών οξέων και την εκατοστιαία αναλογία τους σε G+C.

Οι πλανόκοκκοι δεν βρίσκονται στους ανθρώπους, ενώ οι στοματοκόκκοι και οι μικρόκοκκοι μπορούν να αποικίσουν ανθρώπους αλλά σπάνια προκαλούν λοιμώξεις.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί μη κινητοί κόκκοι που η διευθέτηση των κυττάρων τους θυμίζει σταφύλι καθώς χωρίζονται χαρακτηριστικά σε διάφορα σχέδια για να σχηματίσουν ακανόνιστα συσσωματώματα. Παράγουν καταλάση και για τον λόγο αυτό τα κύτταρά τους είναι θετικά στη δοκιμή του ενζύμου καταλάση. Όλοι οι σταφυλόκοκκοι παράγουν καταλάση, σε αντίθεση με τους στρεπτόκοκκους που δεν παράγουν (**Πίνακας 1**). Η καταλάση είναι σημαντικός παθογενετικός παράγοντας, καθώς διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε O<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται από τα ουδετερόφιλα και έχει αντιμικροβιακή δράση. Με την αδρανοποίησή του οι σταφυλόκοκκοι μπορούν να περιορίζουν την ικανότητα των ουδετερόφιλων να σκοτώνουν μικροοργανισμούς.

Επίσης, τα κύτταρα είναι αρνητικά στην οξειδάση, ζυμώνουν τη γλυκόζη αναερόβια, έχουν τειχοϊκά οξέα και αρκετά χαμηλό περιεχόμενο G+C (30 έως 39%). Οι σταφυλόκοκκοι είναι δυνητικά αναερόβιοι αλλά αναπτύσσονται καλύτερα υπό αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες. Παραδοσιακά, έχουν διαχωριστεί σε coagulase-θετικούς και coagulase-αρνητικούς σταφυλοκόκκους. Ανάλογα με το εάν μπορούν να παράγουν πηκτάση (κοαγκουλάση) οι σταφυλόκοκκοι διακρίνονται σε πηκτάση θετικούς (*Staphylococcus aureus* ή Σταφυλόκοκκος χρυσίζων) και πηκτάση αρνητικούς (CNS- Coagulase Negative Staphylococci, Σταφυλόκοκκοι επιδερμικοί ή σαπροφυτικοί) (**εικόνα 1**). Η πηκτάση είναι ένα ένζυμο που προκαλεί πήξη στο πλάσμα ενεργοποιώντας την προθρομβίνη σε θρομβίνη, που με τη σειρά της μετατρέπει το ινοδωγόνο σε ινώδες και θρόμβο. Οι coagulase-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν, προς το παρόν, σε 32 διαφορετικά είδη. Από τον τεράστιο αριθμό σταφυλοκόκκων, μόνο τρεις σχετίζονται συχνά με ανθρώπινες λοιμώξεις:

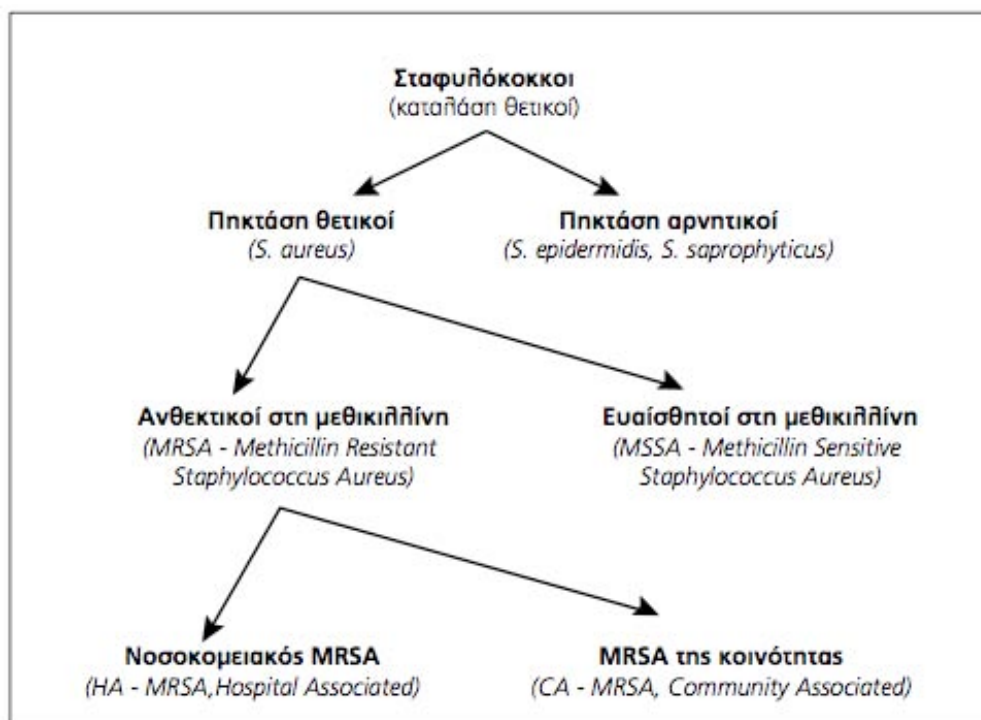
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*, και
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Staphylococcus lugdunensis*

Από τα είδη σταφυλόκοκκου που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος προκαλεί τις πιο σοβαρές λοιμώξεις. Ονομάζεται «χρυσίζων» γιατί παράγει μία καρωτινοειδή χρωστική που του προσδίνει το κίτρινο χρώμα. Η χρωστική αυτή αδρανοποιεί δραστικές ρίζες οξυγόνου που παράγουν τα ουδετερόφιλα και περιορίζει την αντιμικροβιακή τους δράση. Αντίθετα, οι υπόλοιποι σταφυλόκοκκοι επειδή δεν παράγουν κίτρινη χρωστική, έχουν λευκό χρώμα.



ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΕΙΔΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΝΟΣΟ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ					
Είδος	Καταλάση	Πηκτάση (κοαγκουλάση)	Αιμόλυση	Βιοχημικά χαρακτηριστικά	Κυριότερες νόσοι
<i>S. aureus</i> (χρυσίζων)	+	+	β-αιμόλυση (πλήρης)	Πρωτεΐνη Α στην επιφάνεια	Λοιμώξεις δέρματος, μαλακών μορίων, αποστήματα, τροφική δηλητηρίαση, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας
<i>S. epidermidis</i> (λευκός ή επιδερμικός)	+	-	-	Ευαίσθητοι στην νοβοβιοκίνη	Φυσιολογική χλωρίδα, λοιμώξεις σε προσθετικές βαλβίδες και ορθοπεδικές προσθέσεις, ενδοκαρδίτιδα
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	Ανθεκτικοί στην νοβοβιοκίνη	Ουρολοιμώξεις

Επίσης, πρέπει να αναφερθούν τα είδη *Staphylococcus lugdunensis* και *Staphylococcus schleiferi* καθώς αυτά τα δύο είδη είναι σχετικά επιθετικά και μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία λοιμώξεων, όπως σωματικές λοιμώξεις, βακτηριαμία, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις των οστών και αποστήματα σε διάφορα όργανα.



**Εικόνα 1.** Ταξινόμηση σταφυλοκόκκων

### 1.1.3 Δομή του σταφυλόκοκκου

- **Πολυσακχαρίτες του ελύτρου**

Οι σταφυλόκοκκοι συνήθως περιβάλλονται από μία χαλαρή κάψα πολυσακχαριτών. Η κάψα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθούν οι ορότυποι. Οι ορότυποι 5 και 8 είναι οι πιο κοινοί και πολλοί *S. aureus* ανθεκτικοί στην μεθικιλίνη (MRSA) ανήκουν σε αυτούς τους οροτύπους (Fournier, 1990).

Όταν ο *S. aureus* απομονώνεται από λοιμώξεις εκφράζει υψηλά επίπεδα πολυσακχαριτών όμως γρήγορα τα χάνει κατά την ανακαλλιέργεια αυτού στο εργαστήριο. Η λειτουργία της κάψας δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη. Μπορεί να εμποδίζει την φαγοκύττωση του *S. aureus* και έτσι να συμβάλλει στον διεισδυτικό του χαρακτήρα.

- **Πεπτιδογλυκάνη**

Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης είναι το κύριο μακρομόριο που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι αλυσίδες γλυκάνης σχηματίζονται με περίπου 10 διαδοχικές υπομονάδες N-ακετυλομουραμικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Πενταπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες προσδένονται στις υπομονάδες N-ακετυλομουραμικού οξέος. Οι αλυσίδες γλυκάνης κατόπιν διασταυρώνονται με πεπτιδικές γέφυρες ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες.

- **Πρωτεΐνη A**

Η επιφάνεια όλων των στελεχών του *S. aureus* περιέχει πρωτεΐνες που προεξέχουν από το πεπτιδογλυκανικό στρώμα και δεσμεύονται ομοιοπολικά. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη A, έχει την ικανότητα να προσδένει στο τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών των υποτάξεων IgG1, IgG2 και IgG4 (Karakawa, 1992). Η πρωτεΐνη A δεν παράγεται από coagulase-αρνητικούς σταφυλόκοκκους.

- **Τειχοϊκό οξύ**

Τα τειχοϊκά οξέα είναι μακρομόρια πολυσακχαριτών που περιέχουν φώσφορο. Το τειχοϊκό οξύ είναι προσδεμένο και στο πεπτιδογλυκανικό τοίχωμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι πολυσακχαρίτες είναι συγκεκριμένες για κάθε

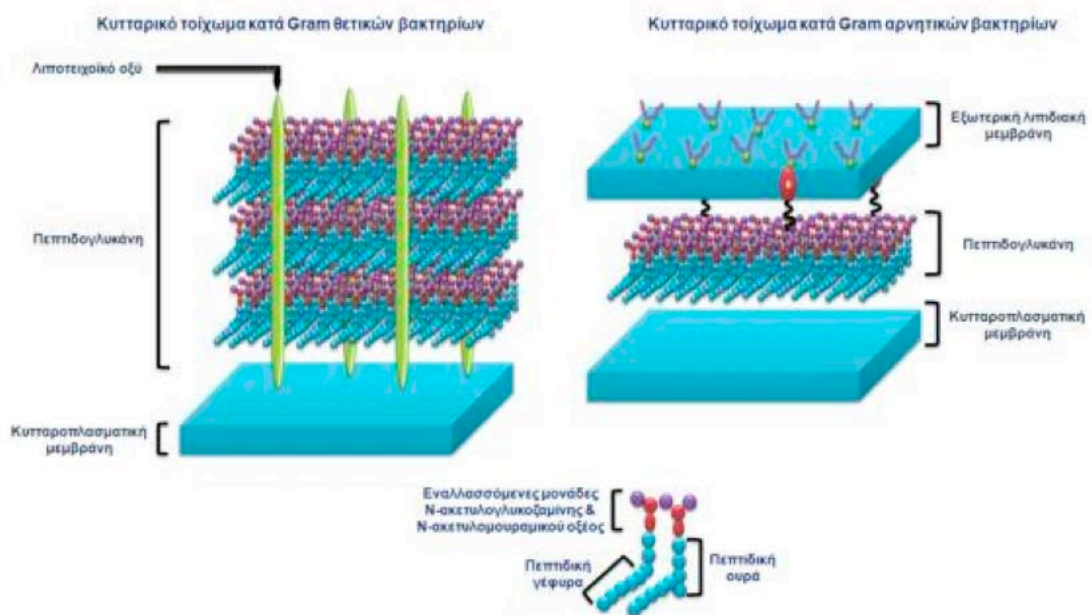
είδος. Συγκεκριμένα, τα τειχοϊκά οξέα ριβιτόλης συναντώνται στον *S. aureus* και τα τειχοϊκά οξέα γλυκερόλης στον *S. epidermidis* (Wilkinson, 1997).

#### 1.1.4 Κυτταρικό τοίχωμα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων βρίσκεται εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης και παρέχει στο κύτταρο κυρίως δομική στήριξη και προστασία. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει μεταξύ των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (**εικόνα 2**). Τα Gram θετικά βακτήρια φέρουν ένα πυκνό κυτταρικό τοίχωμα που εμπεριέχει πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκό οξύ. Αντίθετα, τα Gram αρνητικά βακτήρια φέρουν ένα σχετικά λεπτό κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από ελάχιστα στρώματα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλονται από μια δεύτερη λιπιδιακή μεμβράνη αποτελούμενη από λιποπολυσακχαρίτες και λιποπρωτεΐνες.

Η αντοχή του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος οφείλεται στα μακρομόρια της πεπτιδογλυκάνης. Η κύρια λειτουργία της είναι να διατηρεί την ακεραιότητα του κυττάρου καθώς ανθίσταται στην εσωτερική οσμωτική πίεση. Η πεπτιδογλυκάνη είναι επίσης υπεύθυνη για τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και εμπλέκεται στην κυτταρική αύξηση και διαίρεση.

Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα ετεροπολυμερές που αποτελείται από αλυσίδες γλυκάνης συνδεδεμένες μέσω μικρών πεπτιδίων (Osborn, 1969). Το τμήμα γλυκάνης της πεπτιδογλυκάνης είναι ομοιόμορφο. Αποτελείται συνήθως από εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc) συνδεδεμένα μεταξύ τους με δεσμό β1,4 (Bumsted et al., 1968). Η γλυκάνη παρουσιάζει ελάχιστες διαφοροποιήσεις, όπως ακετυλίωση ή φωσφορυλίωση της υδροξυλομάδας στη θέση 6 του μουραμικού οξέος (Araki et al., 1971, Ghuysen, 1968, Liu & Gotschlich, 1967) και κατά περίπτωση απουσία ενός πεπτιδίου ή N-ακέτυλο συστατικού (Ghuysen, 1968, Araki et al., 1971b). Σε διαφορετικούς οργανισμούς, ο μέσος όρος του μήκους της αλυσίδας είναι από 10 έως 65 μονάδες δισακχαριτών (Ghuysen, 1968, Hughes, 1970).



**Εικόνα 2.** Κυτταρικό τοίχωμα των κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει στον αριθμό των στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης και στην ύπαρξη της εξωτερικής λιπιδιακής μεμβράνης στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Σε κάθε περίπτωση, η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από εναλλασσόμενες μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος που φέρει μια πλευρική πεπτιδική αλυσίδα. Το πεπτιδικό τμήμα της πεπτιδογλυκάνης είναι υπεύθυνο για τη διασύνδεση μεταξύ των μονομερών απευθείας ή μέσω πεπτιδικών γεφυρών.

Το πεπτιδικό τμήμα της πεπτιδογλυκάνης εξυπηρετεί την σύνδεση μεταξύ των μονομερών (Rogers *et al.*, 1980). Η σύγκριση της διαφορετικής αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδογλυκανών υπέδειξε τους ακόλουθους κανόνες, όσον αφορά τη χημική κατασκευή του του πεπτιδικού τμήματος (Schleifer & Kandler, 1972):

- (i) Ο αριθμός των αμινοξέων στις διάφορες πεπτιδογλυκάνες είναι μάλλον περιορισμένος, 3 έως 6 διαφορετικά αμινοξέα απαντώνται σε μια συγκεκριμένη πεπτιδογλυκάνη. Διακλαδισμένα (βαλίνη, λευκίνη κ.τ.λ.), αρωματικά (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη), αμινοξέα που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη), ιστιδίνη, αργινίνη και προλίνη δεν έχουν ανιχνευθεί σε πεπτιδογλυκάνες.
- (ii) Οι πεπτιδικές αλυσίδες αποτελούνται από εναλλασσόμενα L- και D-αμινοξέα. Το D-γλουταμινικό οξύ στη θέση 2 και η D-αλανίνη στις θέσεις 4 και 5 της πεπτιδικής υπομονάδας δεν αντικαθιστώνται συνήθως από άλλα αμινοξέα. Στις θέσεις 1 και 3 μπορεί να βρεθούν διάφορα αμινοξέα σε διαφορετικές πεπτιδογλυκάνες. Στη θέση 1 συναντάμε συνήθως L-αλανίνη,

- L-σερίνη ή γλυκίνη. Η θέση 3 παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποικιλομορφία, καθώς 9 διαφορετικά αμινοξέα έχουν βρεθεί στη θέση αυτή.
- (iii) Τα περισσότερα από τα αμινοξέα της πεπτιδικής υπομονάδας μπορεί να χρησιμοποιηθούν και στη σύνθεση της γέφυρας διασύνδεσης. Τα περισσότερα μονοκαρβοξυλικά αμινοξέα των γεφυρών απαντώνται στη διαμόρφωση L. Εξαίρεση αποτελεί η D-σερίνη της ενδιάμεσης γέφυρας της πεπτιδογλυκάνης του *Bifidobacterium bifidum*. Τα δικαρβοξυλικά αμινοξέα και τα διαμινοξέα αντιθέτως συναντώνται και στις δύο διαμορφώσεις.
  - (iv) Τα μονοκαρβοξυλικά L-αμινοξέα και η γλυκίνη ενεργοποιούνται από τις συγγενείς τους συνθετάσες και μεταφέρονται εστεροποιημένα από τα συγγενή τους μόρια tRNA για την ενσωμάτωσή τους στην ενδιάμεση γέφυρα (Bumsted et al., 1968, Roberts et al., 1968a & b), κάτι που δεν είναι εφικτό για τα δικαρβοξυλικά αμινοξέα.
  - (v) Οι μεταξύ των πεπτιδίων γέφυρες που εμπεριέχουν διαμινοξέα παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ του τρόπου σύνδεσης και της διαμόρφωσης των διαμινοξέων.
  - (vi) Είναι πιθανό σε μια συγκεκριμένη πεπτιδογλυκάνη να απαντώνται διαφορετικά αμινοξέα. Βρέθηκε σε πολλούς οργανισμούς ότι η L-λυσίνη και η L-ορνιθίνη βρίσκονται στην ίδια πεπτιδογλυκάνη στη θέση 3 του πεπτιδικού τμήματος. Στις ενδιάμεσες γέφυρες η γλυκίνη, η L-αλανίνη και η L-σερίνη μπορούν να αντικαθιστούν μερικώς η μια την άλλη.

Η σύνδεση μεταξύ των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης ευθύνεται για τη δομική ακεραιότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και μπορεί επίσης να επηρεάζει τη διαπερατότητά του. Επειδή τα κύτταρα μπορεί να αλλάξουν όγκο ακόμα και κατά 200% λόγω των ιοντικών συνθηκών, το κυτταρικό τοίχωμα πρέπει να είναι ευέλικτο. Ένα μοντέλο του κυτταρικού τοιχώματος προτείνει ότι οι αλυσίδες γλυκάνης συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα, ενώ οι γέφυρες διασύνδεσης παρέχουν ευελιξία καθώς επεκτείνονται σε καταστάσεις στρες. Πολλοί αντιβακτηριακοί αναστολείς εμπλέκονται στην αναστολή των διαφόρων βημάτων κατά τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, τη διασύνδεση και τη μεταφορά ουσιών μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Έχει προταθεί ότι ο σχεδιασμός και ο έλεγχος

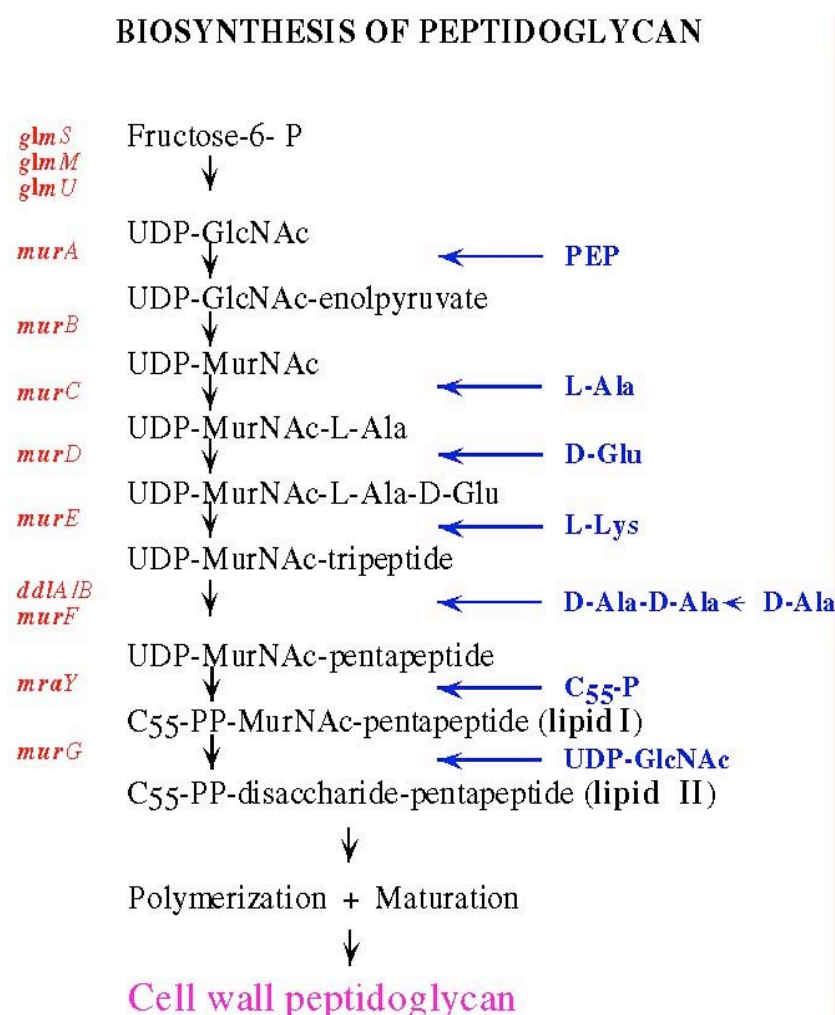
τέτοιων φαρμάκων μπορεί να ενισχυθεί από έναν ενδεδειγμένο βιοχημικό χαρακτηρισμό της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, της κινητικότητας και των πιθανών θέσεων αλληλεπίδρασης με τα φάρμακα.

### 1.1.5 Κυτταρικό τοίχωμα του *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα από τα πρώτα βακτήρια στα οποία μελετήθηκε η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια (van Heijenoort, 2001). Το πρώτο από αυτά, που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, είναι ένας καταράκτης ενζυμικών αντιδράσεων με τελικό προϊόν το UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο. Στο δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, πραγματοποιείται αρχικά σύνδεση του προϊόντος του πρώτου σταδίου με ένα λιπιδικό φορέα (φωσφοβακτοπρενόλη, C55-P) με αποτέλεσμα το σχηματισμό του λιπιδίου I (C55-PP-MurNAc-πενταπεπτίδιο). Έπειτα, στο μουραμικό τμήμα μεταφέρεται UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη προκειμένου να παραχθεί ο ενδιάμεσος δισακχαρίτης, γνωστός και ως λιπίδιο II (C55-PP-MurNAc-πενταπεπτίδιο-β1-4-GlcNAc) (**εικόνα 3**) (van Heijenoort & Gutmann, 2000). Όπως το λιπίδιο I έτσι και το λιπίδιο II, στο στάδιο αυτό της βιοσύνθεσης, παραμένουν αγκυροβολημένα στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ακολουθεί η σύνθεση των γεφυρών σύνδεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης, εάν απαιτούνται, ανάλογα με τον οργανισμό.

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το λιπίδιο II, μετά το σχηματισμό της πεπτιδικής γέφυρας, μεταφέρεται διαμέσου της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης στην εξωτερική πλευρά, όπου και ακολουθεί πολυμερισμός σε ίνες γλυκάνης με τη δράση τρανσγλυκολασών. Μετά τον πολυμερισμό και το σχηματισμό του υδατανθρακικού σκελετού της πεπτιδογλυκάνης, ο λιπιδιακός φορέας μεταφέρεται και πάλι μέσω της μεμβράνης στην εσωκυτταρική πλευρά προκειμένου να ανακυκλωθεί. Τα πολυμερή γλυκάνης από την άλλη, διασυνδέονται με το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ του αμινοξέος στη θέση 3 του πεπτιδικού τμήματος μιας μονάδας N-ακετυλομουραμικού με την D-Ala στη θέση 4 ενός γειτονικού πεπτιδίου, ενώ παράλληλα η D-Ala στη θέση 5 απομακρύνεται. Η αντίδραση αυτή της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από τρανσπεπτιδάσες, τις **PBPs (Penicillin Binding**

**Proteins**), οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικά το διπεπτίδιο D-Ala- D-Ala (Chambers, 1999).



**Εικόνα 3.** Συνοπτικός καταρράκτης αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Στο *Staphylococcus aureus* η σύνθεση των αλυσίδων πενταγλυκίνης πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, με το λιπίδιο II ως υπόστρωμα και το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης να προστίθεται στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης της πεπτιδικής ουράς (Strominger & Ghuysen, 1967, Hegde & Shrader, 2001, Rohrer & Berger-Bächi, 2003a). Ακολουθεί διαδοχική προσθήκη και των υπολοίπων τεσσάρων καταλοίπων γλυκίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιμήκυνση της γέφυρας πενταγλυκίνης πραγματοποιείται με κατεύθυνση από το καρβοξυ- προς το αμινο-τελικό άκρο, σε αντίθεση με τη σύνθεση πεπτιδίων μέσω της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής (Kamiryo & Matsushashi,

1972). Επίσης, μελέτες επί της σύνθεσης της γέφυρας πενταγλυκίνης έχουν δείξει ότι δεν αναστέλλεται από τα αντιβιοτικά που στοχεύουν στο ριβόσωμα (*Matsushashi et al.*, 1967). Οπότε, ο μηχανισμός προσθήκης των καταλοίπων γλυκίνης θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητος της ριβοσωμικής πρωτεϊνοσύνθεσης.

Τα ένζυμα που ευθύνονται για τη σύνθεση των ενδιάμεσων γεφυρών της πεπτιδογλυκάνης είναι οι **παράγοντες Fem (Factors Essential for Methicillin resistance)**, που ανήκουν σε μια σημαντική οικογένεια μη-ριβοσωμικών πεπτιδυλτρανσφερασών (*Berger-Bächi & Tschierske*, 1998). Σχεδόν όλοι οι παράγοντες Fem εμπλέκονται στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Η ακεραιότητα των διασυνδέσεων της πεπτιδογλυκάνης σχετίζεται άμεσα με την αντοχή του οργανισμού στην μεθικιλίνη και σε άλλες β-λακτάμες. Οι παράγοντες FemXAB εμπλέκονται αποκλειστικά στη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης. Ως δότη καταλοίπων γλυκίνης και οι τρεις παράγοντες χρησιμοποιούν αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA (Gly-tRNA<sup>Gly</sup>) (*Kamiryo & Matsushashi*, 1972).

Ένα ασύνηθες μονοπάτι αμινοακυλίωσης Gly-tRNA<sup>Gly</sup> εμπλέκεται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*. Οι πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή του στη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης βασίστηκαν στο γεγονός ότι η ενσωμάτωση γλυκίνης στη πεπτιδογλυκάνη παρεμποδίζεται από ριβονουκλεάσες (*Matsushashi et al.*, 1967). Επιπρόσθετα στοιχεία αντλήθηκαν από το μερικό χαρακτηρισμό του συγκεκριμένου συστήματος σε ένα συγγενή οργανισμό, το *Staphylococcus epidermidis*. Στο βακτήριο αυτό οι γέφυρες διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης αποτελούνται από κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (*Petit et al.*, 1968). Όσον αφορά την ενσωμάτωση της γλυκίνης, έχουν ταυτοποιηθεί τα μόρια tRNA<sup>Gly</sup> που ευθύνονται για τη μεταφορά των αμονιζέων στο κυτταρικό τοίχωμα, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός κατάλυσης της προσθήκης των καταλοίπων στη γέφυρα.

Τα μόρια tRNA που φαίνεται να εμπλέκονται αποκλειστικά στη διαδικασία αυτή, και όχι στη πρωτεϊνοσύνθεση, φέρουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που οδήγησαν στο χαρακτηρισμό τους ως μη πρωτεϊνογενετικά (*Roberts*, 1972 & 1974). Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες στις θηλιές DHU και στο βραχίονα και τη θηλιά TψC. Η απουσία των νουκλεοτιδίων GG από τη θηλιά DHU δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση των μορίων tRNA με τον παράγοντα EF-Tu. Επιπρόσθετα, η



αντικατάσταση της χαρακτηριστικής αλληλουχίας GUΨC της θηλιάς ΤΨC με την αλληλουχία GUGC αλλοιώνει τη θέση αναγνώρισης των μορίων από το ριβόσωμα (*Ofengand & Henes, 1969, Stewart et al., 1971*), αποτρέποντας έτσι και μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

Στο *Staphylococcus aureus* τουλάχιστον 4 tRNA<sup>Gly</sup> μόρια έχουν ταυτοποιηθεί. Τα μόρια αυτά αμινοακυλιώνονται από τη μοναδική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) που κωδικοποιείται στο γονιδίωμά του (*Niyomporn et al., 1968*). Τα μόρια που tRNA<sup>Gly</sup> κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του *Staphylococcus aureus* παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές στη δομή και την αλληλουχία, αν και φέρουν την πλειοψηφία των στοιχείων ταυτότητας, όπως αυτά έχουν προσδιοριστεί για το tRNA της γλυκίνης (*Nameki et al., 1997*).

#### 1.1.6 Παράγοντες Fem και αλληλεπίδρασή τους με μόρια tRNA<sup>Gly</sup>

Η δράση των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλο-τρανσφερασών FemXAB είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη και κάθε μια από αυτές είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση καταλοίπων γλυκίνης σε συγκεκριμένες θέσεις της πεπτιδικής γέφυρας. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως ο FemX καταλύει την προσθήκη του πρώτου καταλοίπου γλυκίνης στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης (*Rohrer et al., 1999*). Ο FemA ενσωματώνει το δεύτερο και τρίτο κατάλοιπο γλυκίνης (*Maidhof et al., 1991, Stranden et al., 1997*), ενώ ο FemB, που παρουσιάζει 40% ταυτότητα και 60% ομοιότητα όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία με τον FemA, προσθέτει τα κατάλοιπα γλυκίνης 4 και 5 (*Henze et al., 1993*). Ο FemX χρησιμοποιεί αποκλειστικά ως αποδέκτη για την πρώτη γλυκίνη, το λιπίδιο II (*Hedge & Shrader, 2001*). Τα υποστρώματα των FemA και FemB είναι το λιπίδιο II-Gly1 και το λιπίδιο II-Gly3 αντίστοιχα, ενώ κανένα από τα ένζυμα FemXAB δεν απαιτεί την παρουσία κάποιου ή και των δύο άλλων Fem για να δράσει (*Schneider et al., 2004*). Αν και τα υποστρώματα των τριών παραγόντων διαφέρουν ως προς τον αριθμό των καταλοίπων γλυκίνης που εμπεριέχουν, και οι τρεις παράγοντες αναγνωρίζουν το λιπίδιο II μέσω του σακχάρου. Αυτό μπορεί να αποτελεί και εξήγηση της μειωμένης δραστηριότητας του FemX παρουσία του FemA, που έχει παρατηρηθεί *in vitro*.

Δεδομένου ότι η πεπτιδυλο-τρανσφεράση FemA περιέχει μόνο μια θέση δέσμευσης tRNA, είχε προταθεί ότι μετά την προσθήκη της πρώτης γλυκίνης

ακολουθεί ένας δεύτερος γύρος δέσμευσης Gly-tRNA και μεταφοράς της δεύτερης γλυκίνης. Ωστόσο, με το σύστημα του διπλού υβριδίου έχουν αναχνησθεί αλληλεπιδράσεις FemA-FemA, FemB-FemB και FemA-FemB. Ο FemX δεν φάνηκε να αλληλεπιδρά με τους άλλους δύο παράγοντες (Rohrer & Berger-Bächi, 2003b). Αυτό υποδεικνύει ότι ο FemX δρα ως μονομερές ενώ οι FemA και FemB μπορεί να δρουν ως ομοδιμερή.

Τα γονίδια των παραγόντων FemAB είναι οργανωμένα υπό την μορφή οπερονίου στο χρωμόσωμα του *Staphylococcus aureus*. Στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο *femAB* είναι ψευδοπολυκυτταρικά με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, σημαντική μείωση στη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, χαμηλά ποσοστά γλυκίνης στο τοίχωμα, υπερευαισθησία στη μεθικιλίνη και άλλα αντιβιοτικά και πολλές φορές η βιωσιμότητά τους εξαρτάται από αντισταθμιστικές μεταλλάξεις (Ling & Berger-Bächi, 1998, Strandén et al., 1997). Ωστόσο, κάποια μεταλλαγμένα στελέχη που στερούνται των παραγόντων FemA και FemB μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να επιβιώσουν. Αντιθέτως, σε περίπτωση αναστολής του γονιδίου *femB*, που κωδικοποιεί τον παράγοντα FemX, προκαλείται κυτταρικός θάνατος (De Lencastre & Tomasz, 1994). Σε τέτοια στελέχη παρατηρείται υπερσυσσώρευση μονομερών μονάδων πεπτιδογλυκάνης που δεν περιέχουν καθόλου γλυκίνη, πλήρης απώλεια της αντοχής στη μεθικιλίνη και μηδαμινή διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης.

Οι παράγοντες Fem είναι ένζυμα υψηλής σημασίας για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, εμπλέκονται έμμεσα και στην αντοχή των κυττάρων στα αντιβιοτικά που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα.

### 1.1.7 Κλινικές λοιμώξεις από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*S. aureus*)

(Lee et al., 2004, Daum, 2007, Gorwitz, 2008, Niniou et al., 2008, Appelbaum, 2008)

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος μπορεί να προκαλέσει εντοπισμένες λοιμώξεις (δέρμα, μυοσκελετικές λοιμώξεις, πνεύμονες) όσο και πολυσυστηματικές γενικευμένες λοιμώξεις ή σηπτικό σύνδρομο (**πίνακας 2**). Οι συνηθέστερες λοιμώξεις στην κοινότητα σε παιδιά είναι λοιμώξεις του δέρματος και των υποκείμενων ιστών. Διακρίνονται σε εντοπισμένες πυογόνες και σε τοξινογόνες λοιμώξεις που χαρακτηρίζονται από διάχυτο εξάνθημα.

#### A) Πυογόνες δερματικές λοιμώξεις

- Θυλακίτιδα (folliculitis): αφορά πυόδερμα του θυλάκου των τριχών
- Δοθιήνας και ψευδάνθρακας (furuncle, carbuncle): αποτελούν επέκταση της θυλακίτιδας στο χόριο και τον υποδόριο ιστό, προς το βάθος και τα πλάγια του θυλάκου της τρίχας σε περιοχές όπως το πρόσωπο, οι μασχάλες, οι μηροβουβωνικές πτυχές και ο τράχηλος. Στον ψευδάνθρακα υπάρχει προσβολή πολλών θυλάκων τριχών και εμφάνιση συριγγωδών πόρων.
- Μολυσματικό κηρίο (impetigo): μπορεί να προκαλείται και από πυογόνο στρεπτόκοκκο αλλά συνήθως το σταφυλοκοκκικό σχηματίζει μεγαλύτερες φυσαλίδες και χαρακτηρίζεται ως πομφολυγώδες.
- Διαπυητική ιδρωταδενίτιδα (hidradenitis suppurativa): αφορά υποτροπιάζουσα πυογόνο λοίμωξη των απεκκριτικών ιδρωτοποιών αδένων στις περιοχές της μασχάλης, του περινέου και των μηροβουβωνικών πτυχών.
- Κυτταρίτιδα (cellulitis): αναφέρεται σε λοίμωξη που επεκτείνεται στα εν τω βάθει τμήματα του υποδόριου ιστού. Μπορεί να εντοπίζεται στο πρόσωπο (π.χ. κυτταρίτιδα οφθαλμικού κόγχου) ή στον κορμό (π.χ. ομφαλίτιδα των νεογνών) ή τα άκρα. Το δέρμα που πάσχει εμφανίζει ερυθρότητα, οίδημα, θερμότητα και ευαισθησία και μπορεί να υπάρχει σύστοιχη λεμφαδενίτιδα.

#### B) Τοξινογόνες δερματικές λοιμώξεις

Στην κατηγορία αυτή η οποία περιλαμβάνει δερματικές εκδηλώσεις που χαρακτηρίζονται από διάχυτο εξάνθημα που ακολουθείται από αποφολίδωση ανήκουν:

- Το σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome-SSSS) που παρατηρείται κυρίως σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών και εκδηλώνεται με πυρετό, ευερεθιστότητα και καθολικό οστρακιοειδές εξάνθημα που μπορεί να έχει και φυσαλίδες και ακολουθείται από εκτεταμένη απολέπιση. Χαρακτηριστικό του είναι το σημείο Nikolsky όταν μετά από ελάχιστη τριβή σε υγιές δέρμα μπορεί να σχηματίζονται εσχάρες.
- Σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (Toxic shock syndrome - TSS): Αρχικά περιγράφηκε σε νεαρές γυναίκες που χρησιμοποιούσαν ταμπόν αλλά μπορεί να εμφανιστεί και ως επιπλοκή χειρουργικής επέμβασης ή άλλης σταφυλοκοκκικής λοίμωξης δέρματος, μαλακών μορίων, οστών ή πνευμονίας. Η κλινική εικόνα αφορά αιφνίδια πολυοργανική προσβολή που εξελίσσεται ταχέως. Εκτός από το γενικευμένο εξάνθημα μπορεί να εμφανιστούν εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό, τα νεφρά, το ήπαρ, το αίμα και το ΚΝΣ.

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2.

### ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ Ο ΧΡΥΣΙΖΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ

---

#### • Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων

- Θυλακίτιδα
- Δοθιήνας, ψευδάνθρακας
- Μολυσματικό κηρίο
- Διαπυητική ιδρωταδενίτιδα
- Λεμφαδενίτιδα
- Μαστίτιδα
- Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων
- Μυοσκελετικές λοιμώξεις
- Σηπτική αρθρίτιδα
- Οστεομυελίτιδα
- Πυομυοσίτιδα
- Απόστημα ψώιτη μυός

#### • Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος

---

- 
- Πνευμονία
  - Εμπύημα
  - Σηπτική πνευμονική εμβολή
  - Νοσοκομειακή πνευμονία
  - Πνευμονία που σχετίζεται με αναπνευστήρα

- **Βακτηριαμία και επιπλοκές**

- Σήψη
- Μεταστατικές εστίες λοίμωξης (νεφροί, αρθρώσεις, οστά, πνεύμονες)

- **Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα**

- Σε φυσικές βαλβίδες
- Σε προσθετικές βαλβίδες

- **Λοιμώξεις σε ξένα σώματα**

- Σε ενδοφλέβιους καθετήρες
- Ορθοπεδικές προθέσεις
- Καρδιακές προθέσεις, βηματοδότες

- **Άλλες λοιμώξεις**

- Ωτίτιδα
- Παραρρινοκολπίτιδα
- Μηνιγγίτιδα
- Οφθαλμικές λοιμώξεις

- **Κλινικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από τοξίνες**

- Σύνδρομο τοξικής καταπληξίας
  - Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο
  - Τροφική δηλητηρίαση
-

### 1.1.8 Επιδημιολογία σταφυλόκοκκου

Κάθε ανθρώπινος οργανισμός είναι αποικισμένος από *S. epidermidis*. Το φυσικό περιβάλλον αυτών των σταφυλοκόκκων είναι το δέρμα και οι βλεννογόνοι. Τα μέρη του ανθρώπινου οργανισμού που κυρίως προσβάλλονται από τα πιο παθογόνα είδη, που είναι οι *S. aureus*, είναι οι πρόσθιοι ρώθωνες και το περίνεο.

Τα νεογνά αποικίζονται άμεσα από *S. epidermidis* και συχνά από *S. aureus*. Τα νεογνήνητα βρέφη συνήθως αποκτούν πρώτα *S. aureus* στο δέρμα και κατόπιν στη μύτη (Mevissen-Verhage *et al.*, 1997, Kauffman *et al.*, 1997). Σύντομα μετά την νεογνική περίοδο μερικά εξ αυτών γίνονται μόνιμοι φορείς, συχνά φέροντας το ίδιο στέλεχος. Αν και μπορεί να εμφανιστεί μερική διασπορά *S. aureus* μέσα σε μία οικογένεια, γενικά η φυσιολογική χλωρίδα της μύτης αποτρέπει την απόκτηση νέων στελεχών (Hollis *et al.*, 1995). Ωστόσο, ο αποικισμός με άλλα στελέχη μπορεί να συμβεί κατά τη θεραπεία με αντιβιοτικά, δεδομένου ότι οδηγεί στην εξάλειψη των ευαίσθητων στελεχών του φορέα. Επειδή αυτή η περίπτωση συμβαίνει συχνά σε νοσοκομεία, οι ασθενείς μπορεί να αποικιστούν από ανθεκτικούς σταφυλοκόκκους. Η συχνότητα ρινικής φορέας του *S. aureus* σε άτομα εκτός νοσοκομείου ποικίλει από 10% έως 40%. Οι ασθενείς και το προσωπικό των νοσοκομείων έχουν υψηλότερες συχνότητες φορέας. Η συχνότητα φορέας των ασθενών μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στο νοσοκομείο μέσω αποικισμού και νοσοκομειακής μετάδοσης. Οι συχνότητες είναι ιδιαίτερα υψηλές σε ασθενείς που κάνουν αιμοδιάλυση και σε διαβητικούς, χρήστες ναρκωτικών και ασθενείς με ποικίλες δερματικές παθήσεις (Frenay *et al.*, 1992, Boyce, 1997).

Η κατάσταση φορέας είναι κλινικά σημαντική γιατί οι φορείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση έχουν περισσότερες λοιμώξεις από εκείνους που δεν είναι φορείς. Αυτό έχει οδηγήσει στην εφαρμογή μουπιροσίνης (τοπικό αντιβιοτικό) στο ανώτερο αναπνευστικό σε μερικά νοσοκομειακά κέντρα πριν από τις εγχειρήσεις ανοιχτής καρδιάς για να μειωθούν οι περιπτώσεις μετεγχειρητικών μολύνσεων των τραυμάτων (Kluytmans *et al.*, 1995). Η διασπορά μέσω των φορέων είναι πολύ σημαντική γιατί μεταδίδουν τους σταφυλόκοκκους όχι μόνο με άμεση επαφή αλλά και με μεταφορά από τον αέρα. Σοβαροί περινεϊκοί φορείς σταφυλόκοκκου σχεδόν πάντοτε διασπείρουν μεγάλες ποσότητες αυτού. Οι σταφυλόκοκκοι μπορεί να συσσωρεύονται στα ρούχα και στα κλινოსκεπάσματα των

φορέων και μέσω αυτών είναι εφικτή η διασπορά τους. Μόρια σκόνης που φέρουν σταφυλοκόκκους μπορούν να μεταφερθούν για σημαντικά μεγάλες αποστάσεις.

### 1.1.9 Επιδημιολογική τυποποίηση των σταφυλοκόκκων

Συχνό πρόβλημα στα νοσοκομεία είναι το υψηλό ποσοστό MRSA. Στα παλίσια επιδημιολογικής επιτήρησης για περιορισμό στη διασπορά των MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον, εφαρμόζονται μέθοδοι τυποποίησης με σκοπό τον καθορισμό πιθανής κλωνικής συγγένειας. Ο στόχος της μοριακής τυποποίησης είναι να προσδιοριστεί με ακρίβεια η πηγή, η έκταση και οι μηχανισμοί μετάδοσης των λοιμώξεων. Η αύξηση του επιπολασμού της λοίμωξης από *S. aureus* ή η επισήμανση της εμφάνισης στελεχών με ξεχωριστό φαινότυπο ευαισθησίας σε αντιβιοτικά αποτελούν συνήθως έναυσμα για περαιτέρω μελέτες. Μία πρακτική βάση ταξινόμησης των μεθόδων τυποποίησης είναι να χωριστούν σε:

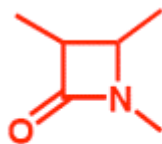
- Φαινοτυπικές τεχνικές - εκείνες που ανιχνεύουν χαρακτηριστικά που εκφράζονται από τους μικροοργανισμούς, όπως biotyping, antimicrobial susceptibilities, serotyping, bacteriophage typing, immunoblotting και multilocus enzyme electrophoresis.
- Γενωτυπικές τεχνικές - εκείνες που περιλαμβάνουν αναλύσεις DNA από χρωμοσωμικά και εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία, όπως plasmid restriction digests, ribotyping, Southern blot analysis, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) και PCR-based methods (Arbeit, 1997).

### 1.1.10 Αντιβιοτικά και αντοχή

Τα αντιβακτηριακά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά συγκαταλέγονται σήμερα ανάμεσα στα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα. Αυτό οφείλεται κατά ένα μέρος στο γεγονός ότι μερικά αντιβιοτικά είναι εξαιρετικά ασφαλή κατά την χρήση τους. Η υπερβολική όμως χρήση τους έχει συμβάλλει σημαντικά στην επιδείνωση του διεθνούς προβλήματος της αντοχής βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

### 1.1.10.1 β-λακταμικά αντιβιοτικά

Οι β-λακτάμες είναι μία κύρια κατηγορία αντιβιοτικών που διαθέτουν ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο (**εικόνα 4**) που περιέχει άζωτο και αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.



**β-lactam**

**Εικόνα 4.**  
β-λακταμικός  
δακτύλιος

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν στα βακτήρια μέσω δύο μηχανισμών που στοχεύουν στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος.

- ✓ Αρχικά, ενσωματώνονται στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και αναστέλλουν την δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, η οποία ευθύνεται για την σύνθεσή του. Έτσι, αναστέλλουν τις διασταυρούμενες συνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος.
- ✓ Επιπλέον, η σύνδεσή τους με τις πενικιλλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP's), οι οποίες φυσιολογικά αναστέλλουν τις υδρολάσες του κυτταρικού τοιχώματος, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των υδρολασών, οι οποίες εν συνεχεία πραγματοποιούν την λύση του κυτταρικού τοιχώματος.

Για να μπορέσουν τα βακτήρια να παρακάμψουν αυτούς τους αντιμικροβιακούς μηχανισμούς δράσης, ενεργοποιούν την σύνθεση ενζύμων απενεργοποίησης των β-λακταμικών αντιβιοτικών (β-λακταμάσες) ή μεταλλαγμένους τύπους πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών.

Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση. Έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις.

Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί εμφάνισης αντοχής στις β-λακτάμες:



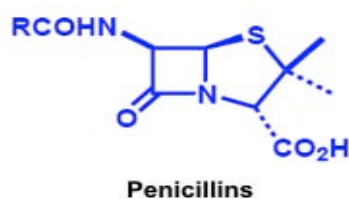
- \* Ο πιο σημαντικός είναι η ενζυματική υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου από τις β-λακταμάσες. Υπάρχουν πολλές β-λακταμάσες, που διαφέρουν στην ειδικότητα για το υπόστρωμά τους.
- \* Ο δεύτερος σημαντικότερος μηχανισμός αντοχής είναι η τροποποίηση των στόχων δράσης, που λέγονται πενικιλλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBP's). Η μεταβολή μιας συγκεκριμένης πενικιλλινο-δεσμευτικής πρωτεΐνης είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής στους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκους και στους ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους.
- \* Ο τρίτος μηχανισμός αντοχής οφείλεται στη μειωμένη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών στα gram-αρνητικά βακτήρια.

Οι β-λακτάμες αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που περιλαμβάνει τέσσερις κύριες υποκατηγορίες:

- ✧ τις πενικιλίνες
- ✧ αναστολείς β-λακταμασών
- ✧ τις κεφαλοσπορίνες
- ✧ τις καρβαπενέμες
- ✧ τις μονοβακτάμες

Όλες αυτές οι υποκατηγορίες έχουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο, ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί από τις β-λακταμάσες. Η διαφοροποίησή τους έγκειται στην παρουσία επιπρόσθετων διαφορετικών δακτυλίων.

**Πενικιλλίνες:** Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1928, σαν ένα παραπροϊόν του *Penicillium notatum*, από το οποίο προκύπτει και το όνομά της. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο (**εικόνα 5**). Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας στην θέση 6 του β-λακταμικού δακτυλίου καταλήγει σε φάρμακα με διαφορετικές αντιμικροβιακές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες πενικιλινών (**πίνακας 3**).



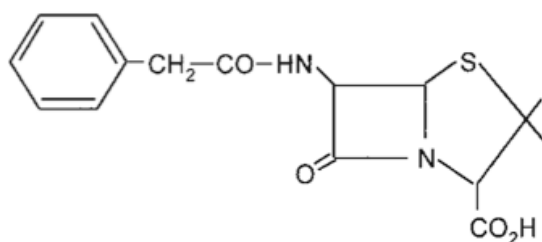
**Εικόνα 5.** Δομή πενικιλινών

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Κατηγορίες πενικιλινών

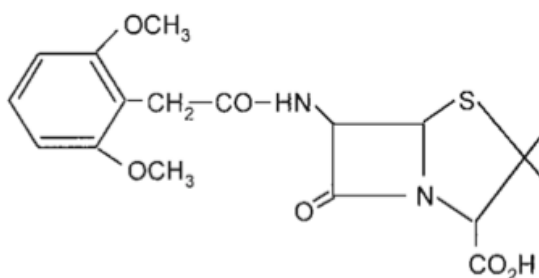
Κατηγορίες πενικιλινών	
Φυσικές πενικιλίνες	Πενικιλίνη G
	Πενικιλίνη V
	Υδατική προκαϊνούχος πενικιλίνη G
	Βενζαθινική πενικιλίνη G
Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες	Μεθικιλίνη
	Ναφκιλλίνη
	Ισοξαζολικές πενικιλίνες
	Οξακιλλίνη
	Κλοξακιλλίνη
	Δικλοξακιλλίνη
	Φλουκλοξακιλλίνη
Αμινοπενικιλίνες	Αμπικιλίνη
	Αμοξικιλίνη
Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες	Καρβοξυπενικιλίνες
	Καρβενικιλίνη
	Τικαρκιλίνη
	Ουρεϊδοπενικιλίνες
	Πιπερακιλλίνη
	Αζλοκιλλίνη
	Μεζλοκιλλίνη

## 1.2 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ ΧΡΥΣΙΖΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ (MRSA)

Η θεραπεία των λοιμώξεων από *S. aureus* πριν από τη δεκαετία του 1950 περιελάμβανε τη χορήγηση βενζυλοπενικιλίνης (πενικιλίνη G) (**εικόνα 6**), β-λακταμικό αντιβιοτικό, αλλά από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, η εμφάνιση στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη βενζυλοπενικιλίνη είχαν προκαλέσει αυξανόμενη ανησυχία. Τα ανθεκτικά στελέχη παράγουν συνήθως ένα ένζυμο, β-λακταμάση, η οποία υδρολύει τη β-λακτάμη. Καταβλήθηκαν προσπάθειες για να συντεθούν παράγωγα της πενικιλίνης που ήταν ανθεκτικά στην υδρόλυση από β-λακταμάση. Αυτό επιτεύχθηκε το 1959 με τη σύνθεση της μεθικιλλίνης, στην οποία έχει αντικατασταθεί η φαινολική ομάδα της βενζυλοπενικιλίνης με μεθοξυ ομάδες (**εικόνα 6**). Δυστυχώς, αμέσως μόλις χρησιμοποιήθηκε η μεθικιλλίνη κλινικά, αναδύθηκαν στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (MRSA) (*Chambers, 1997*). Η αντοχή δεν οφειλόταν στην παραγωγή της β-λακταμάσης, αλλά στην έκφραση μίας επιπρόσθετης πενικιλλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP2a), που αποκτήθηκε από άλλα είδη, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην δράση του αντιβιοτικού (*Chambers, 1997*). Η χρήση διαφόρων τύπων αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών MRSA (*Livermore, 2000*), στην εμφάνιση μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-στόχους και στην απόκτηση και συσσώρευση γονιδίων που επιφέρουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Μέχρι το 2002, πριν την εισαγωγή νεότερων αντιβιοτικών (π.χ. οξαζολιδιόνες, νταπτομυκίνη, τιγκεκυκλίνη), η μόνη επιλογή για θεραπεία λοιμώξεων παρέμενε η βανκομυκίνη. Το γεγονός ότι μεταφέρθηκαν στον *S. aureus* γονίδια που προσδίδουν αντοχή στη βανκομυκίνη τα οποία προέρχονται από άλλες ομάδες βακτηρίων (όπως από εντερόκοκκους), και η εμφάνιση, σπάνιως ευτυχώς, στελεχών *S. aureus* με αντοχή σε γλυκοπεπτίδια (*Livermore, 2000*), δείχνει ότι τη σπουδαιότητα της εισαγωγής νέων αντισταφυλοκοκκικών φαρμάκων στην κλινική θεραπευτική.



Benzylpenicillin



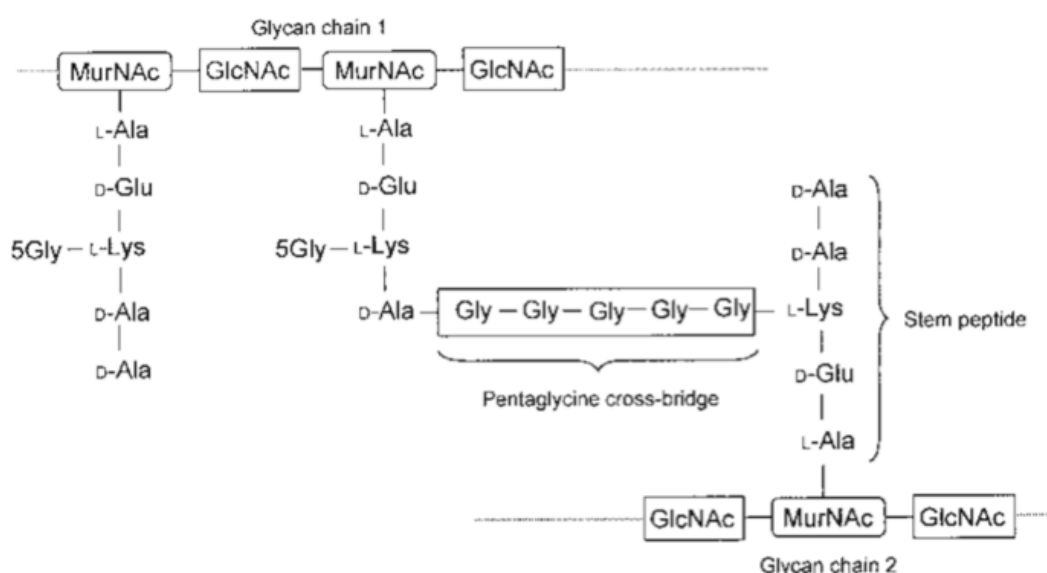
Methicillin

**Εικόνα 6.** Οι χημικές δομές των β-λακταμικών αντιβιοτικών, βενζυλοπενικιλίνη και μεθικιλίνη

### 1.2.1 Penicillin-binding proteins/Τρανσπεπτιδάσες: οι στόχοι των β-λακταμικών αντιβιοτικών

Το κύτταρο του σταφυλόκοκκου περιβάλλεται από μία δομή πάχους 20-40 nm που μοιάζει με πλέγμα, η οποία ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη, και αποτελείται από μια σειρά αλυσίδων γλυκάνης περίπου 20 εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc) συνδεδεμένα μεταξύ τους με δεσμό β1,4 (*Giesbrecht et al., 1998*). Επισυνάπτεται σε κάθε κατάλοιπο N-ακετυλομουραμικού οξέος μια πενταπεπτιδική αλυσίδα που αναφέρεται ως stem πεπτίδιο. Οι αλυσίδες γλυκάνης στην πεπτιδογλυκάνη συνδέονται μεταξύ τους μέσω του τελευταίου καταλοίπου γλυκίνης μίας πενταγλυκίνης η οποία συνδέεται με το κατάλοιπο L-Lys (θέση 3) σε ένα stem πεπτίδιο και το κατάλοιπο d-Ala (θέση 4) σε ένα άλλο (**εικόνα 7**). Οι γέφυρες πενταγλυκίνης σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα από τις FemX, FEMA, και FemB πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέουν τα κατάλοιπα γλυκίνης στο κατάλοιπο της L-λυσίνης των stem πεπτιδίων (*Berger-Bächli et al., 1998*). Οι αντιδράσεις της τρανσπεπτιδάσης πραγματοποιούνται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε μια αντίδραση που καταλύεται από τις τρανσπεπτιδάσες (Penicillin-Binding Proteins). Στο *S. aureus* υπάρχουν τέσσερις

PBP<sub>s</sub>, PBP<sub>1</sub>, PBP<sub>2</sub>, PBP<sub>3</sub>, και PBP<sub>4</sub>. Οι PBP<sub>s</sub> υψηλού μοριακού βάρους έχουν δύο πρωτεϊνικές δομές, εκείνη που συμμετείχε στην αντίδραση τρανσπεπτιδάσης (cross-linking) και εκείνη που εμπλέκεται στην trans-γλυκοσυλίωση (επέκταση της αλυσίδας της γλυκάνης). Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία μοιάζουν με το τερματικό διπεπτίδιο D-αλανίνη-D-αλανίνη του stem πεπτιδίου, εμποδίζουν την αντίδραση τρανσπεπτιδάσης των PBP<sub>s</sub> παρεμβαίνοντας έτσι στην διασταυρούμενη σύνδεση. Χωρίς την διασταυρούμενη σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, το κυτταρικό τοίχωμα γίνεται μηχανικά αδύναμο, απελευθερώνονται κάποια από τα συστατικά του κυτταροπλάσματος και το κύτταρο πεθαίνει (*Giesbrecht et al., 1998*).



**Εικόνα 7.** Σχηματική αναπαράσταση ένωσης (cross-linking) δύο αλυσίδων γλυκάνης στην πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus*. MurNAc, N-acetylmuramic acid; GlcNAc, N-acetylglucosamine.

### 1.2.2 Αντοχή στη μεθικιλίνη

Έχει αναφερθεί ότι η αντοχή στη μεθικιλίνη σε κλινικά στελέχη προκύπτει σπανιότερα από την έκφραση β-λακταμάσης που υδρολύει τη μεθικιλίνη (*Montanari et al., 1996*) και κυρίως μέσω της έκφρασης μιας τροποποιημένης μορφής της PBP<sub>2</sub>, που έχει μικρότερη συγγένεια δέσμευσης στην πενικιλίνη και υψηλότερα ποσοστά αποδέσμευσης του δεσμευμένου φαρμάκου σε σύγκριση με τη φυσιολογική PBP<sub>2</sub> (*Hackbarth et al., 1995*). Ωστόσο, ο κύριος μηχανισμός

αντοχής στη μεθικιλίνη του *S. aureus* είναι μέσω της έκφρασης μιας επιπλέον PBP, της PBP2a, η οποία έχει χαμηλή συγγένεια με τη μεθικιλίνη και η οποία κωδικοποιείται από το *mecA* γονίδιο. Η σύνθεση της PBP2a ρυθμίζεται και διατηρείται κατά κανόνα σε χαμηλό επίπεδο, όμως το επίπεδο σύνθεσης μπορεί να ενισχυθεί αν υπάρξουν μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια.

### 1.2.3 PBP2a

Οι MRSA διαφέρουν γενετικά από τα στελέχη *S. aureus* που είναι ευαίσθητα στη μεθικιλίνη καθώς έχουν, στο χρωμόσωμα, ένα μεγάλο τμήμα ξένου DNA (40-60 Kb), που αναφέρεται ως στοιχείο *mec*, και το γονίδιο *mecA* που κωδικοποιεί την 78 KDa τρανσπεπτιδάση PBP2a (αναφέρεται επίσης ως PBP2'). Το *mecA* γονίδιο έχει προταθεί ότι προέρχεται από τον *Staphylococcus sciuri* (Wu *et al.*, 2001). Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο απέκτησε το γονίδιο από αυτό το είδος δεν είναι γνωστός, δύο γονίδια, *ccrA* και *ccrB*, που βρίσκονται στο *mec* στοιχείο από ένα στέλεχος, έχει αποδειχθεί ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες ανασυνδυασμού που είναι σε θέση να αποκόπτουν και να ενσωματώνουν του *mec* στοιχείο στο χρωμόσωμα (Katayama *et al.*, 2000). Η εξέταση ενός μεγάλου αριθμού στελεχών MRSA έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η αρχική απόκτηση του *mecA* γονιδίου έχει συμβεί μία φορά και ότι τα απομονωμένα MRSA στελέχη είναι απόγονοι του αρχικού κλώνου (Kreiwirth *et al.*, 1993). Αν και η διάταξη και η σύνθεση του *mec* στοιχείου μπορεί να ποικίλει μεταξύ στελεχών (Oliveira *et al.*, 2000), το *mecA* γονίδιο είναι πολύ συντηρημένο. Από κοινού με άλλες τις άλλες PBPs, η PBP2a έχει κοινά δομικά μοτίβα που σχετίζονται με τη δέσμευση της πενικιλίνης και η συγγένειά της με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά μειώνεται σημαντικά. Κατά συνέπεια, σε θεραπευτικό επίπεδο της μεθικιλίνης που θα εμπόδιζε τις δραστηριότητες τρανσπεπτιδάσης των άλλων PBPs, η PBP2a παραμένει ενεργή διασφαλίζοντας τη διασταυρούμενη σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης στην πεπτιδογλυκάνη.

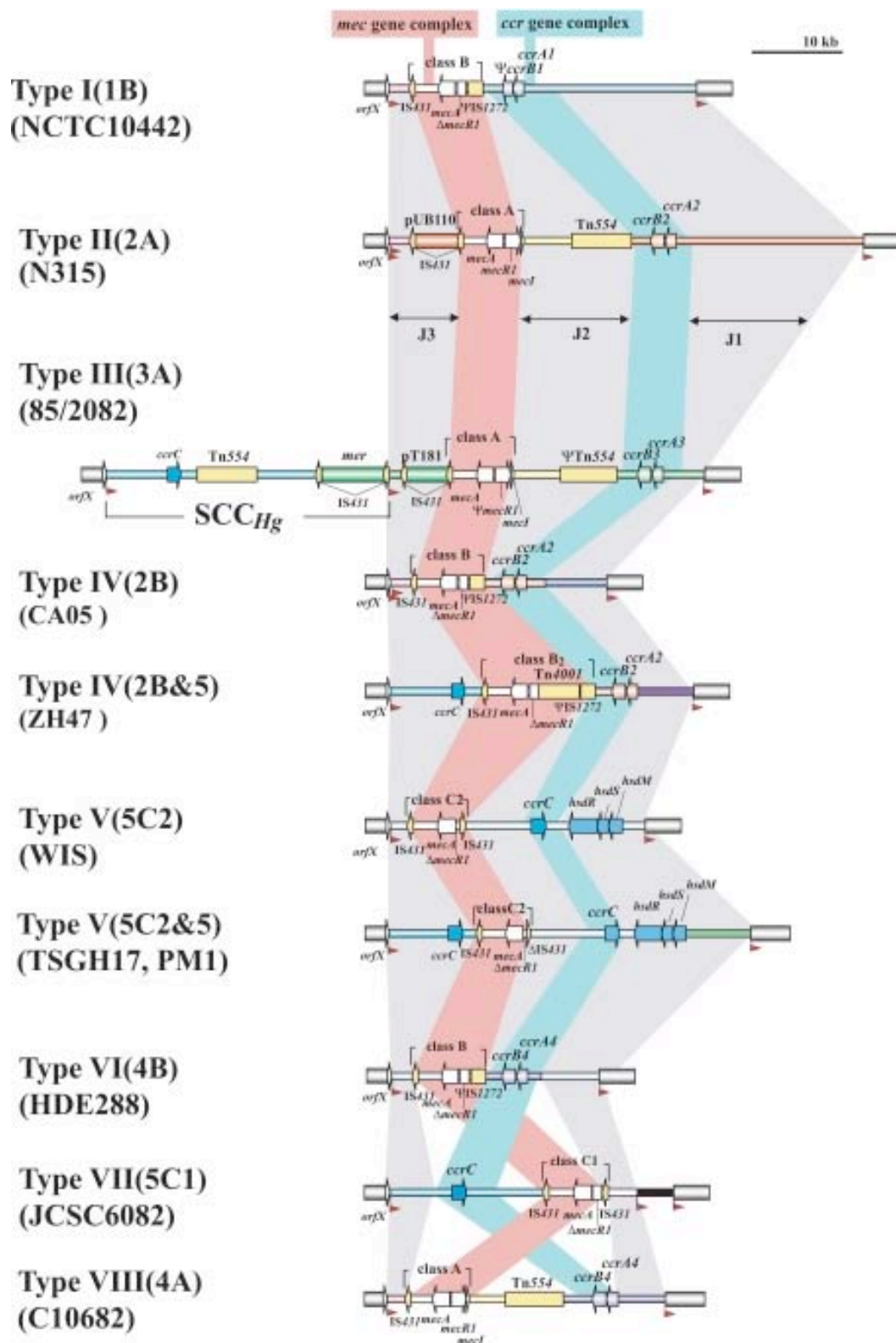
Το *mecA* γονίδιο, μεγέθους 2.1 kb, βρίσκεται σε ένα μεταθετό στοιχείο που αναφέρεται ως Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) (Ito *et al.*, 2003). Η σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασσέτα *mec* (SCC*mec*) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του MRSA, η οποία μεταφέρει τον καθοριστικό παράγοντα για την αντοχή στις ευρέως φάσματος β-λακτάμες που κωδικοποιείται

από το γονίδιο *mecA*. Η εμφάνιση των *S. aureus* με αντοχή στη μεθικιλίνη οφείλεται στην απόκτηση και εισαγωγή του στοιχείου *SCCmec* στο χρωμόσωμα των ευαίσθητων στελεχών. Τα *SCCmec* στοιχεία είναι πολύ διαφορετικά σε δομική οργάνωση και γενετικό περιεχόμενο και έχουν ταξινομηθεί σε τύπους και υποτύπους. Αποτελεί πλέον κοινή πρακτική ο καθορισμός των MRSA κλώνων από το συνδυασμό του *SCCmec* τύπου και το χρωμοσωμικό υπόβαθρο (δηλαδή, ο τύπος ST, όπως ορίζεται από την MLST τυποποίηση) στον οποίο το στοιχείο *SCCmec* βρίσκεται (Enright et al. 2002). Πολλοί τύποι, υποτύποι, και παραλλαγές των *SCCmec* στοιχείων και SCC στοιχείων που δεν φέρουν το *mecA*, έχουν αναφερθεί. Ως εκ τούτου, υπάρχουν ασάφειες και αντιφάσεις στην κατάταξη των SCC στοιχείων στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα.

Τα *SCCmec* στοιχεία ταξινομούνται από ένα ιεραρχικό σύστημα σε τύπους και υποτύπους. Οι τύποι καθορίζονται από το συνδυασμό των εξής: (i) τύπος του *ccr* (cassette chromosome recombinases) γονιδιακού συμπλόκου, το οποίο αντιπροσωπεύεται από τον αλλότυπο γονιδίου *ccr*, και (ii) την τάξη του *mec* γονιδιακού συμπλόκου. Αυτά είναι τα βασικά στοιχεία της κασσέτας που ευθύνονται για την ενσωμάτωση του *SCCmec* και του φαινοτύπου αντοχής σε β-λακτάμες (πίνακας 4 και εικόνα 8)(IWG-SCC, 2009).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4. *SCCmec* τύποι που βρέθηκαν σε *S. aureus***

<i>SCCmec</i> type	<i>ccr</i> gene complex	<i>mec</i> gene complex
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A



**Εικόνα 8.** Βασικές δομές των αντιπροσωπευτικών στοιχείων *SCCmec*. Οι δομές των *SCCmec* στοιχείων των αντιπροσωπευτικών στελεχών απεικονίζονται με βάση των ακόλουθων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων: NCTC10442 (AB033763), N315 (D86934), 85/2082 (AB037671), CA05 (AB063172), ZH47 (AM292304), WIS (AB121219), TSGH17 (AB512767), PM1 (AB462393), HDE288 (AF411935), JCSC6082 (AB373032), και C10684 (FJ390057)



Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί οκτώ SCCmec τύποι για τον *S. aureus* χρησιμοποιώντας τα κριτήρια που περιγράφονται ανωτέρω (**πίνακας 4** και **εικόνα 8**). Τα πρώτα τρία SCCmec στοιχεία ορίστηκαν ως τύποι I, II, και III (Ito et al., 1999, Ito et al., 2001). Ακολούθησαν αναφορές των SCCmec τύπων IV έως VIII (Berglund et al., 2008, Ito et al., 2004, Ma et al., 2002, Oliveira et al., 2006, Zhang et al., 2009). Αυτή η ονοματολογία θα πρέπει να διατηρηθεί, αλλά ένα πρόσθετο (πιο κατατοπιστικό) σύστημα για την ονομασία των νέων SCCmec στοιχείων, με βάση τον τύπο του *ccr* και του *mec*, προτείνεται. Για παράδειγμα, ο τύπος I (1B) SCCmec υποδεικνύει ένα SCCmec στοιχείο που φέρει ένα *ccr* τύπου 1 και ένα γονίδιο *mec* τάξης B. Οι άλλοι γνωστοί τύποι SCCmec ορίζονται ως τύπος II (2A), τύπος III (3A), τύπος IV (2B), τύπος V (5C2), τύπος VI (4B), τύπος VII (5C1), και τύπος VIII (4A). Οι τύποι III και VI των SCCmec στοιχείων έχουν αναθεωρηθεί με βάση πρόσθετων πληροφοριών αλληλουχίας. Ο τύπος III του SCCmec στοιχείου είχε αναφερθεί ότι είναι 67 kb σε μήκος και θεωρήθηκε ότι είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος στοιχείο SCCmec (Ito et al., 2001). Ωστόσο, το 2006, αναφέρθηκε ότι αυτό το στοιχείο μεγέθους 67-kb αποτελείται από δύο μικρότερα στοιχεία SCC, SCCmercury και τύπου III (3A) SCCmec (που φέρει το τύπο 3 *ccr* και το *mec* τάξης A) που ενσωματώνονται σε συνδυασμό (Chongtrakool et al., 2006).

#### 1.2.4 Ρύθμιση της έκφρασης της PBP2a

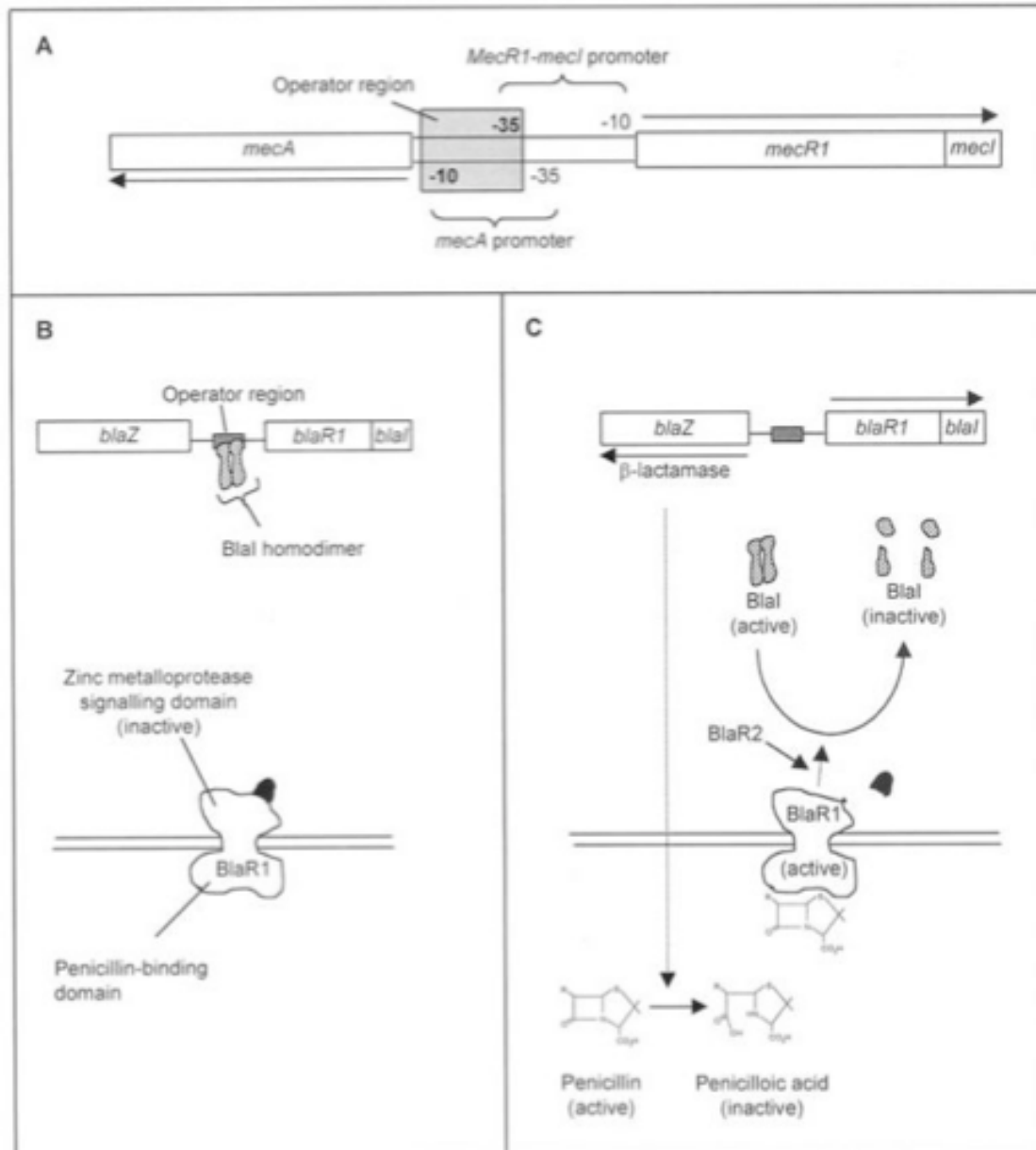
Δίπλα στο *mecA* γονίδιο, στο χρωμόσωμα του σταφυλόκοκκου, υπάρχουν δύο γονίδια, *mecR1* και *mecI*, που μεταγράφονται μαζί με το *mecA* γονίδιο (**εικόνα 9A**). Το *mecR1* γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος που δεσμεύεται στη μεμβράνη (MecR1), ενώ το *mecI* γονίδιο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα (MecI). Μεταξύ των γονιδίων *mecA* και *mecR1* είναι οι υποκινητές των γονιδίων αυτών και μια ρυθμιστική περιοχή που καλύπτει την αλληλουχία -10 του *mecA* και την αλληλουχία -35 του *mecR1* (**εικόνα 9A**) (Sharma et al., 1998). Οι MecR1 και MecI πρωτεΐνες έχουν υψηλή ομολογία στην πρωτεϊνική τους αλληλουχία με τις πρωτεΐνες BlaR1 και BlaI, αντίστοιχα, οι οποίες εμπλέκονται στην επαγωγή έκφραση του *blaZ* γονιδίου της σταφυλοκοκκικής β-λακταμάσης που μεταφέρεται μέσω πλασμιδίου. Η διάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις BlaR1 και BlaI πρωτεΐνες μοιάζει με εκείνη του *mecA* συστήματος γεγονός που

υποδηλώνει ότι το *mecA* μπορεί να έχει αποκτήσει τα ρυθμιστικά γονίδια από το *blaZ* σύστημα κάποια στιγμή στο παρελθόν (Song *et al.*, 1987). Οι ρυθμιστικές περιοχές είναι αρκετά όμοιες ώστε να επιτρέπει στη *BlaI* τη ρύθμιση της έκφρασης της PBP2a (Gregory *et al.*, 1997). Κατά συνέπεια, η παρουσία ενός πλασμιδίου που φέρει τα *blaZ* ρυθμιστικά γονίδια μπορεί να επάγει την έκφραση της PBP2a υπό τον έλεγχο των *BlaR1* και *BlaI*, κάτι που εμφανίζεται συνήθως στα κλινικά στελέχη MRSA (Hackbarth *et al.*, 1993).

Πρόσφατα έχει διευκρινιστεί η φύση του συστήματος σηματοδότησης για επαγώγιμη έκφραση της β-λακταμάσης (70). Η *BlaI*, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA, προσδένεται στην περιοχή του υποκινητή ως ομοδιμερές και καταστέλλει την μεταγραφή του *blaZ* και των *blaR1-blaI* γονιδίων (εικόνα 9B). Ως εκ τούτου, ελλείψει ενός αντιβιοτικού β-λακτάμης, η β-λακταμάση εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα. Η *BlaR1*, που βρίσκεται στην κυτταροπλάσματική μεμβράνη, ανιχνεύει την παρουσία β-λακτάμης μέσω μιας εξωκυτταρικής περιοχής που δεσμεύει την πενικιλίνη και μεταδίδει το σήμα μέσω μιας δεύτερης ενδοκυτταρικής περιοχής σηματοδότησης μεταλλοπρωτεάσης ψευδαργύρου (εικόνα 9B). Η πρόσδεση μίας β-λακτάμης στην *BlaR1*, διεγείρει την αυτοκαταλυτική μετατροπή της ενδοκυτταρικής περιοχής της μεταλλοπρωτεάσης ψευδαργύρου της *BlaR1* από μια ανενεργό μορφή στην ενεργό πρωτεάση (Zhang *et al.*, 2001). Η ενεργή μορφή της *BlaR1* άμεσα ή έμμεσα διασπά την *BlaI* σε θραύσματα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να σχηματιστούν διμερή για να προσδεθούν στο DNA (εικόνα 8C) (Gregory *et al.*, 1997). Χωρίς να δεσμεύεται πλέον η *BlaI* στην ρυθμιστική περιοχή, αρχίζει η μεταγραφή τόσο του *blaZ* γονιδίου αλλά και των *blaR1-blaI* γονιδίων, και έτσι η αντοχή σε β-λακτάμη μπορεί να επέλθει μέσω της σύνθεσης της β-λακταμάσης (εικόνα 9C). Ένα επιπρόσθετο προϊόν γονιδίου, *BlaR2*, ρυθμίζει επίσης τη σύνθεση της β-λακταμάσης, αν και ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει διευκρινιστεί. Εφόσον υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύστημα σηματοδότησης παραμένει να προσδιοριστεί.

Σε αντίθεση με τη σύνθεση της β-λακταμάσης, η έκφραση της PBP2a δεν επάγεται έντονα σε στελέχη που μεταφέρουν τα φυσιολογικά ρυθμιστικά γονίδια (*mecA* και *mecR1-mecI*) και η επαγωγή είναι πολύ αργή (15 λεπτά για την έκφραση β-λακταμάσης σε σύγκριση με έως και 48 ώρες για τη σύνθεση της PBP2a). Αυτό

συμβαίνει επειδή η *MecI* είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής της μεταγραφής του *mecA* (Kuwahara-Arai *et al.*, 1996) και τα περισσότερα αντιβιοτικά β-λακτάμης δεν ενεργοποιούν αποτελεσματικά την *MecR1*. Κατά συνέπεια, ορισμένα στελέχη, που αναφέρεται ως προ-MRSA, είναι ευαίσθητα στη μεθικιλίνη παρά το γεγονός ότι φέρουν το *mecA* γονίδιο. Ωστόσο, η επιλεκτική πίεση που επέρχεται λόγω της χρήσης αντιβιοτικών έχει προωθήσει *S. aureus* στελέχη που έχουν μεταλλάξεις ή διαγραφές στο *mecI* ή στη ρυθμιστική περιοχή/περιοχή υποκινητή του *mecA* προκαλώντας έναν ανενεργό καταστολέα και επομένως την έκφραση της PBP2a (Kobayashi *et al.*, 1998). Απομονωμένα στελέχη που μεταφέρουν αυτές τις μεταλλάξεις, μπορεί να έχουν έναν από τους δύο φαινότυπους αντοχής στη μεθικιλίνη, ομοιογενής ή ετερογενής, ανάλογα με τη δομή του πληθυσμού ενός συγκεκριμένου στελέχους. Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ακριβής μηχανισμός της ετερογένειας που παρουσιάζει ο *S. aureus*. Ως ομογενής αντοχή αναφέρεται σε κυτταρικό πληθυσμό όπου όλα τα κύτταρα είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθικιλίνης (>128 mg/L), ενώ η ετερογενής αντοχή αναφέρεται σε ένα κυτταρικό πληθυσμό όπου μόνο μια μικρή μειοψηφία των κυττάρων εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στη μεθικιλίνη. Μάλιστα ο Tomasz σε παλιά μελέτη αναφέρει και κατατάσσει τους MRSA σε τέσσερις τάξεις ανάλογα με το επίπεδο αντοχής αφενός και αφετέρου με τη συχνότητα εμφάνισης του ανθεκτικού υποπληθυσμού (Tomasz *et al.*, 2001). Η μικρή μειοψηφία των κυττάρων που παρουσιάζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στον ετερογενή πληθυσμό οφείλεται σε μια επιπλέον χρωμοσωμική μεάλλαξη (-εις), που ορίζεται *chr\**, που παρουσιάζεται έξω από το *mec* στοιχείο (Ryffel *et al.*, 1994). Η φύση των *chr\** μεταλλάξεων που δημιουργούν ομοιογενή αντοχή στη μεθικιλίνη δεν είναι γνωστή, αλλά οι μεταλλάξεις στους πρόσφατα αναφερόμενους *hmr* τόπους μπορεί να είναι υπεύθυνες σε ορισμένες περιπτώσεις (Kondo *et al.*, 2001).



**Εικόνα 9. Α.** Σχηματική αναπαράσταση της κωδικοποιούσας περιοχής των *mecA-mecR-mecI*. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση μεταγραφής του *mecA* και *mecR-mecI* γονιδίων. **Β.** Καταστολή της μεταγραφής των *blaZ* και *blaR1-blaI* γονιδίων από την *BlaI* ελλείψει ενός επαγωγέα. **Γ.** Παρουσία ενός β-λακταμικού αντιβιοτικού επάγεται η σύνθεση της β-λακταμάσης.

### 1.2.5 Διαμόρφωση της αντοχής στη μεθικιλίνη

Η σύνθεση της PBP2a ρυθμίζεται από τις MecI και MecR1 πρωτεΐνες και, όταν υπάρχουν, από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του *blaZ* συστήματος. Επιπλέον, η ομοιογενής αντοχή εξαρτάται από μεταλλάξεις σε ξεχωριστό γενετικό τόπο, *chr\**. Παράλληλα, άλλοι παράγοντες τόσο εσωτερικοί και εξωτερικοί επηρεάζουν επίσης την αντοχή στη μεθικιλίνη (Stapleton et al., 2002).

### 1.2.6 Εσωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλίνη

Δεδομένου ότι η PBP2a είναι απαραίτητη για την αντοχή στη μεθικιλίνη, κάθε παράγοντας που παρεμβαίνει στην έκφραση του *mecA* γονιδίου ή στη δραστικότητα της PBP2a θα επηρεάσει την αντοχή στη μεθικιλίνη. Γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η PBP2a έχει αυστηρές απαιτήσεις υποστρώματος. Κατά συνέπεια, οι παράγοντες που επηρεάζουν την διαμόρφωση του υποστρώματος έχουν τη δυνατότητα να διαταράσσουν ή να διαφοροποιήσουν την αντοχή στη μεθικιλίνη. Στο πλαίσιο αυτό, οι αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, όπως φωσφομυκίνη, β-χλωρο-D-αλανίνη, και D-κυκλοσερίνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την αντοχή στη μεθικιλίνη (Sieradzki et al., 1997). Μελέτες έχουν δείξει ότι η PBP2a απαιτεί:

- i. Οι αλυσίδες γλυκάνης να έχουν ορισμένα μήκη. Η PBP2a εξαρτάται από τη δραστικότητα τρανσγλυκοσυλίωσης της PBP2. Οι β-λακτάμες αναστέλλουν την περιοχή της τρανσπεπτιδάσης των υψηλού μοριακού βάρους PBPs αλλά δεν επηρεάζουν την περιοχή της τρανσγλυκοσυλίωσης. Η αδρανοποίηση της τρανσγλυκοσυλάσης της PBP2, οδηγεί σε αύξηση των αλυσίδων γλυκάνης με μικρότερα μήκη και μια σημαντική μείωση της αντοχής στη μεθικιλίνη (Pinho et al., 2001). Ως εκ τούτου, ενώσεις που στοχεύουν στην περιοχή της τρανσγλυκοσυλίωσης των PBPs θα μπορούσε να χρησιμεύσουν ως θεραπευτικοί παράγοντες.
- ii. Το stem πεπτίδιο να έχει την κανονική πεπτιδική διαμόρφωση. Η προσθήκη γλυκίνης στο μέσο ανάπτυξης οδηγεί τα stem πεπτίδια της πεπτιδογλυκάνης να καταλήγουν σε δύο κατάλοιπα γλυκίνης, αντί των δύο καταλοίπων αλανίνης. Αυτό οδηγεί σε μείωση της αντοχής στη μεθικιλίνη και τη μετατροπή ενός ιδιαίτερα ανθεκτικού ομοιογενούς στελέχους σε έναν

ετερογενή φαινότυπο (*DE Jonge et al., 1996*). Η απενεργοποίηση του *murE* (*femF*), γονίδιο που κωδικοποιεί την UDP-N-acetylmuramyl tripeptide συνθετάση, επίσης οδηγεί σε μείωση της αντοχής στη μεθικιλίνη. Αυτό προκύπτει από τη μείωση των UDP-linked muramyl πενταπεπτιδίων και τη συσσώρευση των UDP-linked muramyl διπεπτιδίων στον κυτταρικό τοίχωμα (*Ludovice et al., 1998*). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η PBP2a απαιτεί από τα stem πεπτίδια να έχουν το σωστό μήκος και να περιέχουν την κανονική σειρά των πεπτιδίων.

- iii. Απαιτεί η σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης να είναι άθικτη. Οι παράγοντες FemA, FemB και FemX (*FmhB*) εμπλέκονται στην σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης (*Berger-Bächi et al., 1998*). Ο FemX προσθέτει την πρώτη γλυκίνη, ο FemA προσθέτει τις γλυκίνες 2 και 3, και ο FemB προσθέτει τις γλυκίνες 4 και 5. Οι FemA και FemB δεν είναι συμβατοί-δηλαδή δεν μπορεί να πάρει ο ένας την θέση του άλλου, κατά συνέπεια η απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες οδηγεί σε κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει γέφυρες μονο- ή τριγλυκίνης, αντίστοιχα. Η απενεργοποίηση για οποιοδήποτε από τα γονίδια *femA* και *femB* πιστεύεται ότι είναι θανατηφόρα, αλλά αντισταθμιστικές μεταλλάξεις μπορούν να αποκαταστήσουν τη βιωσιμότητα του κυττάρου, παρόλο που η ανάπτυξη έχει επηρεαστεί σημαντικά (*Berger-Bächi et al., 1998*). Αξίζει να σημειωθεί ότι η απενεργοποίηση είτε του *femA* είτε του *femB* οδηγεί επίσης σε μια μεγάλη μείωση της αντοχής στη μεθικιλίνη. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες FemA και FemB αντιπροσωπεύουν νέους στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων (*Labischinski et al., 1999*). Η αδρανοποίηση των FemA και FemB έχει πρόσθετο πλεονέκτημα στην εν λόγω παρέμβαση του μήκους της γέφυρας, επηρεάζει επίσης την έκκριση παθογόνων παραγόντων που θα μπορούσαν να περιορίσουν την ικανότητα του κυττάρου να προκαλέσει λοίμωξη (*Ton-That et al., 1998*). Παρεμπιπτόντως, η Lif πρωτεΐνη που προσθέτει κατάλοιπα σερίνης στις γέφυρες άλλων σταφυλοκοκκικών ειδών, συμπληρώνει τη δραστηριότητα του FemB με την ενσωμάτωση καταλοίπων σερίνης στις θέσεις 4 και 5 (*Tschierske et al., 1997*). Η ενσωμάτωση καταλοίπων σερίνης στην γέφυρα

οδηγεί σε μείωση της αντοχής στη μεθικιλλίνη που υποδηλώνει ότι η PBP2a μόνο μπορεί να χειριστεί τις γέφυρες που περιέχουν γλυκίνη στις θέσεις 4 και 5 (*Tschierske et al., 1997*). Έτσι, είναι πιθανό ότι η ανάπτυξη αναστολέων των FemA και FemB, δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από την απόκτηση άλλων πρωτεϊνών που συνθέτουν γέφυρα από άλλα είδη.

Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης απαιτεί τη συντονισμένη δραστηριότητα όχι μόνο των ενζύμων βιοσύνθεσης, αλλά και των λυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της πεπτιδογλυκάνης και κυτταρική διαίρεση. Η αντοχή στη μεθικιλλίνη επηρεάζεται από την απενεργοποίηση των γονιδίων που επηρεάζουν τις δραστηριότητες των αυτολυτικών ενζύμων του κυττάρου. Η απενεργοποίηση του *llyM* γονιδίου, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, μετατρέπει ένα ομοιογενές ανθεκτικό στέλεχος σε ετερογενή φαινότυπο και σχετίζεται με αυξημένη αυτολυτική δραστηριότητα (*Maki et al., 1994*). Οι δραστηριότητες των ρυθμιστών πρωτεϊνών όπως Sar, Agr και SigmaB επίσης είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλλίνη (*Berger-Bächi et al., 1998*). Επηρεάζουν πιθανώς με τη μεσολάβησή τους στον έλεγχο των γονιδίων που εμπλέκονται στην σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος και εξωπρωτεϊνών.

### 1.2.7 Εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλλίνη

Εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή στη μεθικιλλίνη περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τη συγκέντρωση αλάτων, το pH, τη σύνθεση θρεπτικού μέσου, ωσμωτικότητα και θερμοκρασία (*Matthews et al., 1984*). Μερικές από αυτές τις εξωτερικές επιρροές χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για την ενίσχυση της αντοχής στελεχών που παρουσιάζουν ετερογενή αντοχή στη μεθικιλλίνη [στελέχη αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl (2%) και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (30-35°C)]. Δεν είναι γνωστό γιατί αυτή η συγκέντρωση NaCl και η θερμοκρασία έχουν αυτή την επιρροή.

### 1.2.8 Ενώσεις που διαμορφώνουν την αντοχή στη μεθικιλλίνη

Η baicalin, ένα φλαβονοειδές που έχει απομονωθεί από το κινέζικο βότανο Xi nan-Huangqin (*Scutellaria amoena*) (*Liu et al., 2000*) και ένα τριπεπτίδιο, LY301621 (καρβοβενζοξυδιφαινυλαλανίνη-προλίνη-φαινυλαλανίνη αλκοόλη) (*Eid et al., 1997*),

αυξάνουν την ευαισθησία των MRSA σε β-λακτάμες, αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι κατανοητός. Μερικές ενώσεις είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την έκφραση του *mecA* γονιδίου. Για ενώσεις όπως πολυοξείδια του βολφραμίου (Yamase *et al.*, 1996) και totarol (τερπένιο και φυσική φαινόλη) (Nicolson *et al.*, 1999), η σύνθεση της PBP2a μειώνεται, αλλά δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός για το πώς επιτυγχάνεται αυτό.

### **1.2.9 Σταφυλόκοκκος χρυσίζων ανθεκτικός στη μεθικιλίνη που προέρχεται από το νοσοκομείο (HA-MRSA)**

Ο MRSA αναγνωρίστηκε τη δεκαετία του 1970 ως παθογόνο που προκαλεί σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Αυτά τα στελέχη του σταφυλόκοκκου αναφέρονται ως νοσοκομειακά MRSA (Healthcare Associated MRSA ή HA-MRSA) και είναι ανθεκτικά στις περισσότερες ομάδες των αντιβιοτικών όπως οι β-λακτάμες, συνήθως στις μακρολίδες, στην κλινδαμυκίνη, στις κινολόνες και τις τετρακυκλίνες ενώ είναι ευαίσθητοι μόνο σε γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη) και σε νεότερα αντιμικροβιακά όπως η λινεζολίδη και η νταπτομυκίνη. Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί και στελέχη που παρουσιάζουν μέτρια ευαισθησία ή αντοχή στα γλυκοπεπτίδια. Παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από HA-MRSA είναι η παρατεταμένη παραμονή σε νοσοκομείο και ειδικά σε μονάδα εντατικής νοσηλείας, η χρήση αντιβιοτικών, χειρουργικές επεμβάσεις, στενή επαφή με ασθενή που είναι αποικισμένος.

### **1.2.10 MRSA που προέρχεται από την κοινότητα (CA-MRSA)**

(Ruhe *et al.*, 2007, Sdougkos *et al.*, 2008, Niniou *et al.*, 2008, Popovich *et al.*, 2008)

Ο MRSA που προέρχεται από την κοινότητα (Community Associated MRSA ή CA-MRSA), προέκυψε κατά τα τέλη του 1998 ως στελέχη με διαφορετική φυλογενετική προέλευση, επιδημιολογία, κλινική συμπτωματολογία και παράγοντες κινδύνου σε σύγκριση με τον νοσοκομειακό MRSA. Υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό των στελεχών MRSA της κοινότητας (**Πίνακας 5**).



---

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.**
**ΚΡΙΤΗΡΙΑ CDC ΓΙΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΧΡΥΣΙΖΟΝΤΑ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ (CA-MRSA)**


---

- Απομόνωση του MRSA σε εξω-νοσοκομειακό περιβάλλον ή σε νοσοκομειακό περιβάλλον μέσα σε 48 ώρες από την εισαγωγή
  - Απουσία προηγούμενου ιστορικού λοίμωξης με MRSA ή αποικισμός με MRSA
  - Απουσία εισαγωγής σε νοσοκομείο τον τελευταίο χρόνο, ή χειρουργικής επέμβασης ή στενής σχέσης με νοσηλευτικό ή ιατρικό προσωπικό
  - Όχι καθετήρες
- 

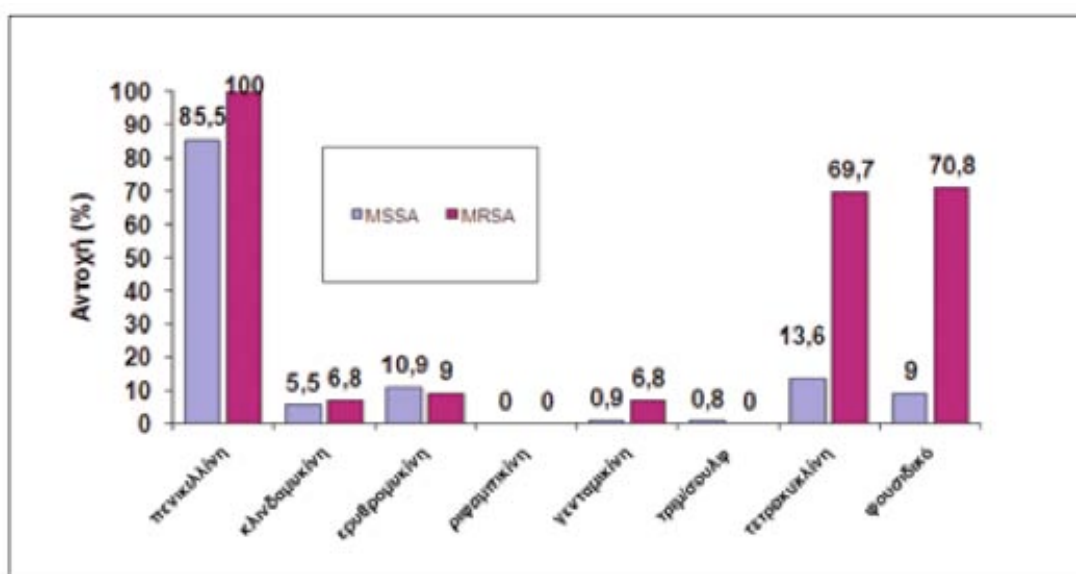
Λόγω του ότι τα στελέχη CA-MRSA φέρουν τη γονιδιακή περιοχή αντοχής SCCmec τύπου IV ή V η οποία χαρακτηρίζεται από μικρότερο μέγεθος και ως εκ τούτου περιέχει λιγότερα γονίδια αντοχής, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα μη-β-λακταμικά αντιβιοτικά σε σύγκριση με νοσοκομειακά MRSA στελέχη και απαιτούν διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση.

Σταφυλόκοκκοι MRSA της κοινότητας παράγουν σε μεγάλο ποσοστό την λευκοκτονίνη Panton-Valentine leukocidin (PVL) που σχετίζεται με αυξημένη διεισδυτικότητα, νέκρωση των ιστών και επιπλοκές.

Στελέχη CA-MRSA συνήθως σχετίζονται με λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (>90% των περιπτώσεων), μπορεί όμως να προκαλούν και σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις όπως πνευμονία, εμπυήματα ή οστεομυελίτιδα.

Παράγοντες κινδύνου για νόσηση αποτελούν η στενή δερματική επαφή, η λύση της συνέχειας του δέρματος, η φτωχή υγιεινή, η χρησιμοποίηση κοινών αντικειμένων και επιφανειών, ο συγχρωτισμός, η φορεία και η πρόσφατη λήψη αντιβιοτικών. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο για σοβαρή νόσηση αποτελούν η μικρή ηλικία, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, και άτομα που ανήκουν σε εθνικές μειονότητες ή μετανάστες. Έχουν περιγραφεί επιδημίες που αφορούν αθλητικές ομάδες, σχολεία ή και μικρές κοινότητες λόγω της μεγάλης μεταδοτικότητας που παρουσιάζουν αυτά τα στελέχη σταφυλόκοκκου.

Ελληνικά επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν παιδιά με σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις κατά τη διετία 2003-2005 στην περιοχή της Αττικής, δείχνουν ότι ποσοστό περίπου 44% ήταν CA-MRSA (Niniou et al, 2008). Από τα στελέχη αυτά 68% είχαν την τοξίνη PVL και 73% αφορούσαν λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων. Τα ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά που καταγράφηκαν ήταν για τις μακρολίδες 9%, την κλινδαμυκίνη 6,8%, την γενταμικίνη 6,8%, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη και τη ριφαμπικίνη 0%, τη σιπροφλοξασίνη 3,4% και το φουσιδικό οξύ 70,8% (**Εικόνα 10**).



**Εικόνα 10.** Αντοχή σταφυλοκόκκων της κοινότητας σε αντιβιοτικά (%) στην περιοχή της Αττικής. MSSA: *S. aureus* ευαίσθητος στη μεθικιλίνη, MRSA: *S. aureus* ανθεκτικός στη μεθικιλίνη (Niniou et al, 2008)

Σε παρόμοια μελέτη που έγινε στην περιοχή της Πάτρας καταγράφηκε αύξηση του ποσοστού MRSA λοιμώξεων στο σύνολο των λοιμώξεων από *S. aureus* από 53% το 2005 σε 71% το 2006 (Sdougkos et al, 2008).

### 1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *S. AUREUS* ΜΕ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ (MRSA)

Έχουν περάσει πενήντα χρόνια από τότε που η Patricia Jevons περιέγραψε τα πρώτα στελέχη του χρυσίζων σταφυλόκοκκου ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (MRSA), μόλις 2 χρόνια μετά την αρχική κλινική χρήση της μεθικιλλίνης (Jevons, 1961). Στο μισό αιώνα που ακολούθησε οι οργανισμοί αυτοί έχουν εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο και παρόλο που έχουμε μάθει πολλά γι' αυτούς ήταν εντελώς ανέφικτο να εξαλειφθούν ή να αποτραπούν οι σοβαρές λοιμώξεις που συνεχίζουν να προκαλούν. Ο *S. aureus* έχει πολλά χαρακτηριστικά που βοηθούν να δικαιολογήσει την τεράστια επιτυχία του ως ανθρώπινο παθογόνο. Μεταξύ αυτών είναι η παθογένειά του και οι μηχανισμοί διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (quorum sensing), που επιτρέπουν να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα σοβαρών λοιμώξεων στον άνθρωπο-ίσως περισσότερο από οποιαδήποτε άλλα είδη βακτηρίων. Η γενετική ποικιλότητα και η ικανότητα να αποκτά νέα εξωγενή γονίδια, επιτρέπουν να προσαρμοστεί σε μια ποικιλία από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και να διαμορφώνει την παθογένειά του. Έχει επίσης τη δυνατότητα να δημιουργήσει ασυμπτωματική φορεία, το οποίο προάγει την ευρεία διάδοσή του μεταξύ των ανθρώπων-ξενιστών. Τέλος, έχει δείξει μια αξιοσημείωτη τάση να αποκτήσει αντίσταση σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες και μια σειρά από άλλα χαρακτηριστικά βοηθούν να εξηγηθεί γιατί ο οργανισμός αυτός έχει αναπτυχθεί και εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο μέσα σε 50 χρόνια από την πρώτη ταυτοποίησή του, παρά τις προσπάθειες να ηττηθεί από τα καλύτερα και πιο λαμπρά μυαλά της ιατρικής στον κόσμο.

#### 1.3.1 Προέλευση του MRSA

Απολιθωμένα στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι σταφυλόκοκκοι υπήρχαν στη γη για πάνω από ένα δισεκατομμύριο χρόνια, αν και δεν είχαν αναγνωριστεί ως παθογόνα βακτήρια μέχρι τον 19ο αιώνα. Παρ'όλα αυτά, είναι σαφές ότι έχουν αναμφίβολα προκαλέσει σοβαρές μετατραυματικές και άλλες λοιμώξεις σε όλη την καταγραμμένη ανθρώπινη ιστορία (Moellering, 1995). Όταν υποβλήθηκαν σε επίσημες δοκιμές, πολλοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν από τους αρχαίους πολιτισμούς για να θεραπεύσουν πληγές, συμπεριλαμβανομένων των αλάτων χαλκού, όπως μαλαχίτη και χρυσόκολλα, και το μέλι και το μύρο, αποδείχθηκε ότι

έχουν σαφή δράση εναντίον των σταφυλόκοκκων, *in vitro* (Majno, 1975). Ωστόσο, δεν ήταν παρά μέχρι την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Αλέξανδρο Φλέμινγκ το 1928 που έγινε πραγματικά εφικτή η αποτελεσματική θεραπεία για σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Δυστυχώς, ο *S. aureus* γρήγορα ανέπτυξε αντοχή στη πενικιλίνη που οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων που παράγουν β-λακταμάσες (Murray et al., 1978), οδηγώντας στην αναζήτηση παραγόντων αντοχής σε β-λακταμάσες. Αυτή η αναζήτηση οδήγησε στη σύνθεση των ημισυνθετικών αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών, αρχίζοντας με τη μεθικιλίνη και ακολουθώντας άλλα παράγωγα, όπως η οξακιλλίνη, η κλοξακιλλίνη, η δικλοξακιλλίνη, η φλουκλοξακιλλίνη και η ναφκιλλίνη. Η βανκομυκίνη επίσης ανακαλύφθηκε στη δεκαετία του 1950, αλλά δεν χρησιμοποιήθηκε ευρέως καθώς οι πενικιλίνες θεωρήθηκαν ασφαλέστερες και ίσως πιο αποτελεσματικές (Moellering, 2006).

Η μεθικιλίνη χρησιμοποιήθηκε κλινικά για πρώτη φορά το 1959 και μόλις 2 χρόνια αργότερα εμφανίστηκε ο πρώτος MRSA (Jevons, 1961). Σε αντίθεση με την αντοχή στην πενικιλίνη των *S. aureus*, η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή β-λακταμάσης, η αντοχή στη μεθικιλίνη οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων που κωδικοποιούν μία μοναδική πενικιλινο-δεσμευτική πρωτεΐνη, που ορίζεται 2' ή 2α, η οποία έχει μειωμένη συγγένεια με τις β-λακτάμες και καταλύει αποτελεσματική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, ακόμη και παρουσία πενικιλίνης, συμπεριλαμβανομένων των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών, καθώς και κεφαλοσπορινών και καρβαπενεμών. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA*. Σε αντίθεση με τις πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες των πνευμονιοκόκκων, που είναι γονίδια μωσαϊκού (mosaic genes) που αποτελούνται από μητρικό DNA και DNA από φυσικά ανθεκτικούς στην πενικιλίνη στρεπτόκοκκους που αποκτώνται μέσω μετασχηματισμού, τα γονίδια *mecA* έχουν αποκτηθεί άθικτα, συχνά μαζί με μια ποικιλία άλλων γενετικών στοιχείων (Tsubakishita et al., 2010).

Οι MRSA δημιουργούνται όταν στελέχη *S. aureus* ευαίσθητα στη μεθικιλίνη (Methicillin Susceptible *Staphylococcus Aureus*) αποκτήσουν το γονίδιο *mecA*, το οποίο μεταφέρεται μέσα σε ένα μεταθετό στοιχείο γνωστό ως σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mecA*, που αναφέρεται επίσης ως *Staphylococcal Cassette Chromosome mecA* (*SCCmecA*). Η προέλευση του *mecA* και άλλων γονιδίων σε

αυτές τις κασέτες αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας μετά την αρχική ανακάλυψη των MRSA. Προηγούμενη εργασία πρότεινε σημαντική ομολογία των γονιδίων *mec* που βρέθηκαν σε ομάδα coagulase-αρνητικούς *Staphylococcus sciuri*, τους οποίους δεν συναντάμε συχνά σε ανθρώπους, αλλά έχουν απομονωθεί από ζώα και προϊόντα διατροφής (Couto *et al.*, 1996, Antignac *et al.*, 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι, αν και ο *Staphylococcus sciuri* περιέχει το *mecA* γονίδιο παραμένει ευαίσθητος στη μεθικιλίνη επειδή το γονίδιο δεν εκφράζεται (Antignac *et al.*, 2009). Πιο πρόσφατα, ο Hiramatsu και οι συνεργάτες του (Tsubakishita *et al.*, 2010) παρατήρησαν ότι τρεις από τις τέσσερις ομάδες ειδών *Staphylococcus sciuri* (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus vitulinus* και *Staphylococcus fleurettii*, αλλά όχι ο *Staphylococcus lentus*) περιέχουν το *mecA* γονίδιο με ποικίλους βαθμούς ομολογίας με τα *mecA* γονίδια του σύγχρονου MRSA στελέχους N315. Από τις τρεις ομάδες ειδών, μόνο ο *Staphylococcus fleurettii* παρουσιάζει in-vitro αντοχή στη μεθικιλίνη και έχει την υψηλότερη ομολογία (99,8% νουκλεοτιδική ταυτότητα) με το N315, συνεπώς προκύπτει ο *Staphylococcus fleurettii* ως πηγή του *mecA*, παρά ο *Staphylococcus sciuri*. Περιέργως, το *mecA* γονίδιο στον *Staphylococcus fleurettii* βρίσκεται στο χρωμόσωμα όπου συνδέεται με γονίδια απαραίτητα για την ανάπτυξη, αλλά δεν συνδέεται με την SCC κασέτα. Ο Hiramatsu συνεχίζει να θεωρεί ότι «τα είδη του *S. fleurettii* ανέπτυξαν το *mecA<sub>Sf</sub>* γονίδιο σε ένα περιβάλλον όπου τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συχνά χρησιμεύουν ως επιλεκτική πίεση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ειδογένεσης (Tsubakishita *et al.*, 2010). Αν και αυτό εξακολουθεί να αφήνει αμφιβολίες ως προς την απόλυτη πηγή του *mecA* γονιδίου που βρέθηκε στον *S. fleurettii*, θέτει ορισμένα άλλα σημαντικά ζητήματα. Ο Hiramatsu εικάζει ότι, υπό συνθήκες όπου τα β-λακταμικά αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε ανθρώπους και ζώα, το *mecA* γονίδιο από τον *S. fleurettii* πιθανόν σε συνδυασμό με το SCC<sub>mec</sub> στοιχείο συνυπάρχουν σε ένα είδος MSSA, από το οποίο θα μπορούσε εύκολα να μεταφερθεί σε άλλα στελέχη του ανθρώπου, αντιστρέφοντας έτσι μια εξελικτική τάση κατά την οποία πολλά από τα γονίδια μπορεί να έχουν χαθεί από τον *S. fleurettii* επειδή δεν ήταν σε πλεονεκτική θέση στον οργανισμό σε ένα περιβάλλον απαλλαγμένο από την πίεση β-λακτάμης.

### 1.3.2 Επιδημιολογία του MRSA

Από την αρχική περιγραφή τους το 1961, ένας αριθμός κλώνων του MRSA έχουν εξαπλωθεί ευρέως σε όλο τον κόσμο. Δεν είναι σαφές εάν αυτό αποτελεί διαφοροποίηση από έναν κλώνο ή εισαγωγή *SCCmecA* σε πολλούς κλώνους, μερικοί εξ αυτών είναι πιο ικανοί σε επίπεδο διασποράς από τους άλλους. Οι Enright et al (Enright et al., 2002) θεωρούν, βάσει της τυποποίησης πολλαπλών γενετικών θέσεων (MLST) με την εφαρμογή του αλγόριθμου BURST σε μία διεθνή συλλογή από 912 MRSA και MSSA στελέχη, ότι υπάρχουν 11 κύριοι MRSA κλώνοι από πέντε ομάδες συναφών γονοτύπων. Επιπλέον, τα στοιχεία τους δείχνουν ότι η αντοχή στη μεθικιλίνη εμφανίστηκε για πρώτη φορά στον ST τύπο 250, ο οποίος πιθανόν εξελίχθηκε από μια απομόνωση MRSA τύπου ST8 που απέκτησε το *mecA* γονίδιο. Μια μικρή παραλλαγή του ST250 (ST247-MRSA-I), γνωστή ως κλώνος της Ιβηρικής, είναι ένα από τα σημαντικότερα στελέχη που κυκλοφορούν στον κόσμο σήμερα (Enright et al., 2002).

Μέχρι πρόσφατα, η πλειοψηφία αυτών των MRSA κλώνων έχουν προκαλέσει νοσοκομειακές λοιμώξεις [hospital/healthcare-associated MRSA (HA-MRSA)]. Η συχνότητα των λοιμώξεων που προκαλούνται από HA-MRSA παρουσιάζει σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις, η οποία, τουλάχιστον εν μέρει, έχει σχέση με τις προσπάθειες για να μειωθεί ο εποικισμός και η εξάπλωση των οργανισμών αυτών. Η χαμηλή εξάπλωση των λοιμώξεων από MRSA στη Φινλανδία, τη Δανία, τη Νορβηγία, την Ισλανδία, τη Σουηδία και την Ολλανδία έχει θεωρηθεί ότι οφείλεται στην εφαρμογή μέτρων όπου δίνεται έμφαση στην «αναζήτηση και εξάλειψη» του σταφυλόκοκκου πριν την εισαγωγή ασθενών στο νοσοκομείο. Παρ'όλα αυτά, οι MRSA συνεχίζουν να προκαλούν σημαντικά προβλήματα στην Ευρώπη (Johnson, 2011). Στοιχεία από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Επιτήρησης της Μικροβιακής Αντοχής (EARSS), σήμερα γνωστό ως Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Μικροβιακής Αντοχής (EARSnet), κατέγραψαν ότι περισσότερο από το 25% των βακτηριαιμιών στις κεντρικές και νότιες χώρες της Ευρώπης οφείλονται σε MRSA το 1999. Μέχρι το 2008 οι προσπάθειες για τη μείωση αυτών των λοιμώξεων είχαν σημειώσει κάποια επιτυχία, ιδίως στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπου το ποσοστό των MRSA λοιμώξεων στο κυκλοφορικό σύστημα μειώθηκε από 31% το 2007 σε 19,3% το 2009, ίσως σχετίζεται με τη δράση της κυβέρνησης θέτοντας υποχρεωτική την αναφορά

βακτηριαμίας από MRSA και θέτοντας ως στόχο τη μείωση των ποσοστών της μόλυνσης κατά 50% (Johnson, 2011, Health Protection Agency, 2009). Παρ' όλα αυτά, οι MRSA εξακολούθησαν να αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 25% των λοιμώξεων του κυκλοφορικού στο ένα τρίτο των υπό μελέτη χωρών της Ευρώπης (European Centre for Disease Prevention and Control, 2011).

### 1.3.3 Επιδημιολογία του MRSA της κοινότητας (CA-MRSA)

Πριν από τη δεκαετία του 1990 τα περισσότερα στελέχη MRSA σχετίζονται με τα νοσοκομεία ή άλλες μονάδες υγείας. Εντούτοις, στις αρχές της δεκαετίας του '90, αναφέρθηκαν λοιμώξεις από MRSA σε ασθενείς χωρίς προηγούμενη υγειονομική περίθαλψη. Οι λοιμώξεις αυτές, σε αντιδιαστολή με τις νοσοκομειακές λοιμώξεις, ονομάστηκαν λοιμώξεις οφειλόμενες σε MRSA της κοινότητας (community-acquired/associated, CA-MRSA). Οι λοιμώξεις αυτές ανιχνεύτηκαν σε έξι ηπείρους, συμπεριλαμβανομένης της Αυστραλίας, όπου είχαν σημειωθεί στο παρελθόν πολλά κρούσματα στην Δυτική Αυστραλία και τη Βόρεια Επικράτεια (David *et al.*, 2010, Chua *et al.*, 2011). Πιο συχνές λοιμώξεις παρατηρήθηκαν στην Ταϊβάν, τον Καναδά και κυρίως τις ΗΠΑ, όπου η επιδημία των CA-MRSA λοιμώξεων αυξήθηκε ιδιαίτερα. Οι αρχικές λοιμώξεις στις ΗΠΑ οφείλονταν σε στελέχη που προέρχονται από τον τύπο ST1 (επίσης γνωστό ως USA400 βάσει τυποποίησης με PFGE) και αυτά φαίνεται να περιέχουν ένα στοιχείο *SCCmecA* (*SCCmec* IV) που διαφέρει από τα στοιχεία I - III τα οποία υπάρχουν στα περισσότερα νοσοκομειακά στελέχη (DeLeo *et al.*, 2010). Οι οργανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν επίσης γονίδια που κωδικοποιούν την τοξίνη Panton-Valentine λευκοκτονίνη (PVL), η οποία στοχεύει και καταστρέφει τις μεμβράνες των πολυμορφοπύρηνων. Ο USA400 αντικαταστάθηκε γρήγορα από άλλο κλώνο, ST8 (ή USA300), ο οποίος τώρα αντιπροσωπεύει >85% των απομονώσεων CA-MRSA στις ΗΠΑ (Mera *et al.*, 2011). Αν και οι λόγοι για την επιτυχία του USA300 δεν είναι εντελώς σαφείς, το γεγονός ότι περιέχει ένα *SCCmec* στοιχείο που είναι μικρότερο από το *SCCmec* I-III και φέρει λιγότερα γονίδια αντοχής πιθανότατα δικαιολογεί, τουλάχιστον εν μέρει, για την πλεονεκτική θέση έναντι των ομόλογων του που περιέχουν μεγαλύτερα *SCCmec* στοιχεία (Lee *et al.*, 2007, Diep *et al.*, 2008). Επιπλέον, η σύνδεση του μεταθετού στοιχείου καταβολισμού της αργινίνης (arginine catabolic element) με το *SCCmec* IV στον

USA300 φαίνεται να παρέχει αυξημένη επιβίωση (*Dier et al., 2008*). Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι το μεταθετό στοιχείο καταβολισμού της αργινίνης μπορεί να βοηθήσει στον αποικισμό των βλεννογόνων (*DeLeo et al., 2010*).

Πρόσφατα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι ο επιπολασμός του USA300 στις ΗΠΑ έχει τριπλασιαστεί από το 2004. Χρησιμοποιώντας δεδομένα από το Eurofins Medinet και την Nationwide Inpatient Sample, οι ερευνητές εντόπισαν τρεις ομάδες κλώνων USA300 (δύο MRSA και έναν MSSA), που αντιπροσώπευαν το 89% του συνόλου των στελεχών και οδήγησαν στον τριπλασιασμό του ποσοστού των εισαγωγών σε νοσοκομεία λόγω του USA300, μεταξύ του 2004 και του 2008 στις ΗΠΑ (*Mera et al., 2011*).

Η προέλευση των παραλλαγών του *SCCmec IV*, βρίσκεται στο USA300, το USA400 και άλλα CA-MRSA στελέχη που αποτέλεσε το αντικείμενο μιας πρόσφατης μελέτης των Barbier et al. (*Barbier et al., 2010*), οι οποίοι έχουν βρει τον τύπο *SCCmecIVa* (και άλλους υποτύπους) σε ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη coagulase-αρνητικούς σταφυλόκοκκους και δείχνουν ότι αυτοί οι οργανισμοί μπορεί να είναι η δεξαμενή για τη μεταφορά των στοιχείων *SCCmec IV* στους MSSA.

Καθώς αυτοί οι οργανισμοί έχουν εξαπλωθεί σε όλη τη Βόρεια Αμερική (ιδιαίτερα στις ΗΠΑ) και την Αυστραλία, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν εισαχθεί στην Ευρώπη και σε άλλες χώρες και προκαλούν πλέον λοιμώξεις της κοινότητας που συνδέονται με άλλους ST τύπους, όπως και ST80 και ST5 (*Robert et al., 2011, Blanco et al., 2011*), αλλά σε μικρότερες συχνότητες από ό,τι στη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία (*DeLeo et al., 2010*). Εκτός από τα προβλήματα που προκαλούνται από τις λοιμώξεις που προκαλούν, αυτοί οι MRSA θέτουν επίσης προβλήματα στον έλεγχο των λοιμώξεων, κυρίως στις σκανδιναβικές χώρες, όπου οι κατευθυντήριες οδηγίες είναι προσαρμοσμένες ώστε να προλαμβάνονται λοιμώξεις νοσοκομειακές παρά εξωνοσοκομειακές (*Holzkecht et al., 2010*).

Κλασσικά, έχει κριθεί ότι οι άνθρωποι είναι η κύρια δεξαμενή του *S. aureus*, με ασυμπτωματικό ρινικό και/ή ρινοφαρυγγικό αποικισμό χρησιμεύοντας ως σημαντικότερες περιοχές από τις οποίες οι οργανισμοί αυτοί εξαπλώνονται και προκαλούν λοιμώξεις (*Shaegren, 1984, Kluytmans et al., 1997*). Ωστόσο, τα ποσοστά ρινοφαρυγγικού αποικισμού για τους CA-MRSA που είναι σημαντικά χαμηλότερα από ό,τι για τους MSSA (*DeLeo et al., 2010*), και ο αποικισμός σε άλλες περιοχές



(ειδικά τη βουβωνική χώρα) μπορεί να είναι πιο σημαντικός για τους MRSA από ό,τι για τους MSSA (Mermel *et al.*, 2011). Αν και έχει γίνει αποδεκτό ότι ο βαρύς ρινοφαρυγγικός αποικισμός είναι ένας παράγοντας κινδύνου για αυξημένη λοίμωξη (DeLeo *et al.*, 2010, Mermel *et al.*, 2011), μια πρόσφατη μελέτη από το Λονδίνο δεν μπορούσε να βρει καμία απόδειξη ότι οι ρινικοί φορείς MSSA είχαν περισσότερες πιθανότητες να αποικιστούν από MRSA κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο (Krebes *et al.*, 2011), παρέχοντας έτσι περισσότερες αποδείξεις ότι οι MRSA δεν έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τους MSSA κατά τον αποικισμό τους στον ρινοφάρυγγα. Παρ'όλα αυτά, είναι σαφές ότι οι CA-MRSA μεταδίδονται εύκολα από την άμεση επαφή και μέσω μολυσμένων φορέων (Miller *et al.*, 2008).

#### 1.3.4 Παθογένεια των CA-MRSA

Η συνεχής εξέλιξη του MRSA φαίνεται από τις λοιμώξεις που προκαλούνται από τους CA-MRSA. Ενώ η πλειονότητα των λοιμώξεων αυτών είναι μη απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, αυτοί οι οργανισμοί είναι επίσης σε θέση να προκαλέσουν καταστροφική νόσο σε ορισμένους ασθενείς (Moellering *et al.*, 2011). Μεταξύ αυτών των λοιμώξεων είναι νεκρωτική περιτονίτιδα, σηπτική θρομβοφλεβίτιδα των άκρων, ένα «σύνδρομο πυελικής συμφόρησης» (σηπτική αρθρίτιδα στα ισχία, οστεομυελίτιδα πυέλου, πυελικά αποστήματα και σηπτική πυελική θρομβοφλεβίτιδα), σύνδρομο Waterhouse-Frederickson και ταχέως εξελισσόμενη πνευμονία (Moellering, 2006).

Σε αυτό το σημείο υπάρχουν ενδείξεις ως προς την βάση για την εμφανή αύξηση της παθογένειας των USA300 σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά δεν επιτεύχθηκε γενική συναίνεση ως προς τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο συμβαίνει αυτό. Μελέτες της παραγωγής της τοξίνης PVL σε ζώα έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα, εν μέρει επειδή τα πολυμορφοπυρήνα των αρουραίων, ποντικών, κουνελιών και ανθρώπου διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στη λύση από την τοξίνη PVL (Lowy, 2011). Αρκετές άλλες τοξίνες, συμπεριλαμβανομένης της α-τοξίνης (ή α-αιμολυσίνη) και τις φαινολ-διαλυτές μοντουλίνες, επίσης εμπλέκονται στην παθογένεια των σοβαρών λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτούς τους οργανισμούς (Bubeck *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2010). Το γεγονός ότι οι τελευταίοι μεσολαβούν χρωμοσωμικά δείχνει ότι η

διαφορετική έκφραση των γονιδίων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο, πιθανόν ως απάντηση σε ενδογενείς παράγοντες, αλλά αυτό μένει να αποδειχθεί (Loughman *et al.*, 2009). Αυτός είναι ένας σημαντικός τομέας ενεργούς έρευνας, και παράλληλα με την παροχή σημαντικών στοιχείων για την παθογένεια είναι πιθανό ότι στοχεύοντας σε μία ή περισσότερες από αυτές τις τοξίνες μπορεί να οδηγηθούμε σε βασικές θεραπευτικές εξελίξεις. Το γεγονός ότι μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να έχει αξία, αντανακλάται σε μια πρόσφατη μελέτη στην οποία στοχεύουν την α-αιμολυσίνη με ενεργητική ή παθητική ανοσοποίηση, και φαίνεται να μειώνεται η σοβαρότητα των δερματικών λοιμώξεων από USA300 σε ένα μοντέλο ποντικού (Kennedy *et al.*, 2010). Ωστόσο, όπως συμβαίνει συχνά, ο αρχικός ενθουσιασμός για μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για MRSA πρέπει να τροποποιηθεί βάσει των κλινικών στοιχείων. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπήρξαν προσπάθειες για την αντιμετώπιση ανθρώπινων σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων με αντισώματα που κατευθύνονται στην α-τοξίνη, αλλά αυτές δεν ήταν επιτυχείς (Kernodle, 2011).

### 1.3.5 MRSA, εξελισσόμενη μικροβιακή αντοχή

Είναι σχεδόν αυτονόητο ότι διεξάγονται νέες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοθεραπείας. Όταν ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1990, τα στελέχη USA300 ήταν ευαίσθητα σε σχεδόν όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, εκτός από τις β-λακτάμες (David *et al.*, 2010). Ωστόσο, καθώς η επιδημία προχώρησε στις ΗΠΑ και σε άλλα μέρη, έχουν γίνει όλο και πιο ανθεκτικά σε ορισμένα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης της ερυθρομυκίνης και τις κινολόνες (Han *et al.*, 2007). Μια πρόσφατη CDC μελέτη επιβεβαιώνει αυτό και σημειώνει την αντοχή στην τετρακυκλίνη και κλινδαμυκίνη σε 9% και 6,2% των στελεχών, αντίστοιχα, μεταξύ 823 διεισδυτικά στελέχη που έχουν πρόσφατα απομονωθεί (McDougal *et al.*, 2010). Ανησυχικό είναι το γεγονός ότι μερικοί από αυτούς τους οργανισμούς περιέχουν μεταθετά πλασμίδια αντοχής που προφανώς αποκτήθηκαν από το νοσοκομειακό στέλεχος USA100 (McDougal *et al.*, 2010).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών, η θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται σε MRSA βασιζόταν στα γλυκοπεπτίδια βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη,

αν και άλλοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της κοτριμοξαζόλης, τετρακυκλίνες, κλινδαμυκίνης και φουσιδικό οξύ, έχουν χρησιμοποιηθεί, καθώς πιο πρόσφατα έχουν κυκλοφορήσει διάφορα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης της λινεζολίδης, δαπτομυκίνης, τιγκεκυκλίνης, τελαβανκίνης και κεφταρολίνης. Ιστορικά, τα γλυκοπεπτίδια (κυρίως η βανκομυκίνη) έχουν θεωρηθεί τα χρυσά πρότυπα για τη θεραπεία σοβαρών MRSA λοιμώξεων και γι' αυτό με απογοήτευση διαπιστώσαμε την εμφάνιση αντοχής σε αυτούς τους παράγοντες στους εντερόκοκκους και ακολούθως στον *S. aureus* (Moellering, 1998, Sakoulas et al., 2008). Στους εντερόκοκκους, η αντοχή στα γλυκοπεπτίδια οφείλεται στην απόκτηση μεταθετών οπερονίων τα οποία περιέχουν γονίδια που επιτρέπουν στον οργανισμό να συνθέσει τα κυτταρικά τοιχώματα από πρόδρομα μόρια στα οποία το γαλακτικό αντικαθιστά την αμινοτελική αλανίνη, σχηματίζοντας το διπεπτίδιο D-Ala-D-γαλακτικό, καθιστώντας έτσι την βανκομυκίνη ανίκανη να δεσμευθεί στο στόχο του που είναι το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala. Παρά το γεγονός ότι αυτά τα γονίδια έχουν μεταφερθεί σε λίγα στελέχη MRSA ανθεκτικά στη βανκομυκίνη που απομονώθηκαν από ασθενείς, μέχρι στιγμής τα γενετικά αυτά στοιχεία φαίνεται να είναι ασταθή στους σταφυλόκοκκους (Courvalin, 2006). Επίσης ανησυχητική είναι η παρουσία των λεγόμενων VISA (Vancomycin-Intermediate *S. aureus*) ή GISA (Glycopeptide-Intermediate *S. aureus*) στελεχών, στα οποία οι MICs στη βανκομυκίνη είναι  $\geq 4\text{mg/L}$ , καθώς και στελέχη με MICs στη βανκομυκίνη  $\leq 2\text{mg/L}$  που εμφανίζουν ετεροαντοχή (τα λεγόμενα στελέχη hVISA). Η συχνότητα αυτών των στελεχών παρουσιάζει σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις, αλλά συχνά συνδέονται με θεραπευτική αποτυχία των γλυκοπεπτιδίων (Howden et al., 2004, Tenover et al., 2007). Επιπλέον, σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της σημασίας των hVISA, οι van Hal και Paterson ανέφεραν ότι το ποσοστό αποτυχίας σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με hVISA είναι 2,3 φορές υψηλότερο από ότι σε ασθενείς που είχαν μολυνθεί με στελέχη *S. aureus* ευαίσθητα στη βανκομυκίνη (van Hal et al., 2011). Έχει καταγραφεί παρατεταμένη βακτηριαιμία παρά τη θεραπεία με βανκομυκίνη (42 ημέρες) σε ασθενείς των οποίων τα στελέχη είχαν MIC  $4\text{mg/L}$  στη βανκομυκίνη. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς δεν υποκύψαν στην βακτηριαιμία. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι ένας αριθμός από αυτά τα στελέχη έχουν μεταλλάξεις στο σύστημα agr, το οποίο οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ενός

αριθμού σταφυλοκοκκικών τοξινών, και ενδεχομένως εξηγούν το γεγονός ότι αυτοί οι οργανισμοί εμφανίζουν μειωμένη τοξικότητα σε σκουλήκια (*Caenorhabditis elegans*), κάμπιες (*Galleria melonella*) και ποντίκια (Kennedy et al., 2008, Peleg et al., 2009). Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα μια μετάλλαξη στο *stp1* γονίδιο που κωδικοποιεί την φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης και συνδέεται με αυξημένη MIC στη βανκομυκίνη καθώς και μειωμένη τοξικότητα (Peleg et al., 2011). Παρά τις παρατηρήσεις αυτές, η σχέση των κλινικών αποτελεσμάτων σε γνωστές λοιμώξεις με την MIC στη βανκομυκίνη και ακόμη με την *agr* δυσλειτουργία παραμένει ασαφής, καθώς μια πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι η *agr* δυσλειτουργία (όπως μετράται από την παραγωγή της δ-λυσίνης) συνδέεται με μια χειρότερη έκβαση (Schweizer et al., 2011). Είναι πιθανό ότι παράγοντες, εκτός από την ευαισθησία στη βανκομυκίνη, μπορεί να παίζουν ρόλο στην επίμονη λοίμωξη παρά την επαρκή δόση της βανκομυκίνης για ασθενείς που έχουν μολυνθεί με στελέχη hVISA (και VISA) (Seidl et al., 2011).

Μια ποικιλία μεταλλάξεων που αφορούν τα συστήματα *vraSR* και *graSR* έχουν συσχετιστεί με τη μετατροπή των ευαίσθητων MRSA στελεχών σε hVISA και των hVISA σε VISA (Neoh et al., 2008). Πιο πρόσφατα ο Hiramatsu και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο *groB* γονίδιο που επιλέγονται από τη ριφαμπικίνη προσδίδουν διπλή ετεροαντοχή στη βανκομυκίνη και δαπτομυκίνη (πιθανώς οδηγώντας σε αύξηση του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος) (Cui et al., 2010) και έχουν αποδείξει ότι αυτές οι μεταλλάξεις συχνά απαντώνται στα VISA στελέχη (71%). Επιπλέον, το 95.6% των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη μεταλλάξεων που προέρχονται από το εργαστήριο έδειξαν μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη (Watanabe et al., 2011). Καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι «η μετάλλαξη *groB*» αν και όχι αποκλειστικά, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στη αντοχή στη βανκομυκίνη στον *S. aureus*. Η χρήση της ριφαμπικίνης στη θεραπεία των MRSA λοιμώξεων θα ήταν καλύτερα εάν επαναξιολογηθούν για να αποτραπεί η περαιτέρω αύξηση των hVISA και VISA σε κλινικό περιβάλλον (Watanabe et al., 2011). Οι πιθανές κλινικές συνέπειες αυτών των παρατηρήσεων πιθανότατα μπορεί να εξηγήσουν την καθυστέρηση στην εκκαθάριση των σταφυλοκοκκικών βακτηριασμιών όταν η ριφαμπικίνη προστίθεται στη βανκομυκίνη (Levine et al., 1991) και τα φτωχά αποτελέσματα που

παρατηρούνται σε πολλές πρόσφατες μελέτες παρατήρησης ασθενών με MRSA βακτηριαίμια και ενδοκαρδίτιδα όταν θεραπεύονται με ριφαμπικίνη σε συνδυασμό με βανκομυκίνη (Riedel et al., 2008, Jang et al., 2009). Η ανωτέρω παρέκκλιση, ο MRSA παρουσιάζει πάντα δύσκολες προκλήσεις. Στην περίπτωση αυτή περιστρέφεται γύρω από τη χρήση της ριφαμπικίνης σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες για τη θεραπεία της οστεομυελίτιδας, των περιπροθετικών λοιμώξεων και άλλων λοιμώξεων που σχετίζονται με βιοφίλμ. Μελέτες σε ζώα και περιορισμένα κλινικά δεδομένα τεκμηριώνουν την αποτελεσματικότητα της ριφαμπικίνης σε αυτό το περιβάλλον (Garrigos et al., 2010, Vergidis et al., 2011). Έτσι, μπορεί να αποδειχθεί ότι οι συνδυασμοί της ριφαμπικίνης πρέπει να αποφεύγονται για την βακτηριαίμια και ενδοκαρδίτιδα, αλλά όχι για λοιμώξεις που σχετίζονται με βιοφίλμ. Σαφώς, δικαιολογημένα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές που σχετίζονται με τη δαπτομυκίνη είναι ότι η αντοχή σε αυτό το φάρμακο μπορεί να επιλεγεί μετά από έκθεση σε βανκομυκίνη (και, όπως προαναφέρθηκε, σε ριφαμπικίνη). Πρόσφατα έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση όλου του γονιδιώματος σε 11 ισογενετικά ζεύγη του MRSA που ανέπτυξαν αντοχή στη βανκομυκίνη μέσω της έκθεσής τους στο εργαστήριο ή κατά τη διάρκεια της θεραπείας κλινικών λοιμώξεων. Όλοι ανέπτυξαν μη-ευαισθησία στη δαπτομυκίνη παρόλο που δεν είχαν εκτεθεί στο φάρμακο (R.C. Moellering Jr, αδημοσίευτα δεδομένα). Όπως και με την αντοχή στη βανκομυκίνη, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι MRSA αναπτύσσουν αντοχή στη δαπτομυκίνη είναι πολύπλοκοι και δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Περιλαμβάνουν αυξήσεις στο επιφανειακό θετικό φορτίο (όπως παρατηρήθηκε σε αυτούς με *mprF* και *dltABCD* μεταλλάξεις), αυξημένο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος (όπως παρατηρήθηκε σε *groB* μεταλλάξεις) και μεταλλάξεις στο *cls* και *rgsA* που αλλοιώνουν τα μεμβρανικά λιπίδια και μπορεί να σχετίζονται με τη μειωμένη δέσμευση της δαπτομυκίνης και/ή με τις αλλαγές στο επιφανειακό φορτίο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αντοχή συνδέεται με ένα συνδυασμό αυτών των μεταλλάξεων.

Σε μια ενδιαφέρουσα αναφορά, οι Dhand et al έδειξαν ότι η προσθήκη οξακιλλίνης σε δαπτομυκίνη ήταν αποτελεσματική στη θεραπεία επτά ασθενών με MRSA βακτηριαίμια που δεν ανταποκρίνονταν στη βανκομυκίνη και δαπτομυκίνη. Οι συγγραφείς έδειξαν αυξημένη πρόσδεση της δαπτομυκίνης στην κυτταρική

μεμβράνη του MRSA παρουσία της οξακιλλίνης. Παρότι δεν έχει μελετηθεί, αυτό μπορεί να οφείλεται σε μείωση του επιφανειακού θετικού φορτίου που προκαλείται από την οξακιλλίνη και αυξάνει την πιθανότητα ότι ο συνδυασμός δαπτομυκίνης με άλλο αντιμικροβιακό, το οποίο αλλοιώνει βακτηριακό επιφανειακό φορτίο, μπορεί να είναι χρήσιμο στην αντιμετώπιση της αντοχής, τουλάχιστον σε εκείνους με *mprF* και *dlt* μεταλλάξεις. Όμως, το γεγονός ότι οι MRSA χρησιμοποιούν πολλούς μηχανισμούς για να αναπτύξουν αντοχή στα λιπογλυκοπεπτίδια, καθιστά πιο δύσκολο να προσδιοριστούν απλές μέθοδοι για να ξεπερστεί η αντοχή. Για άλλη μια φορά ο σταφυλόκοκκος αποτελεί μια δύσκολη πρόκληση για την επιστήμη της ιατρικής.

Εκτός από τα γλυκοπεπτίδια και τη δαπτομυκίνη, η λινεζολίδη έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική κατά του MRSA και μέχρι πρόσφατα δεν υπήρξε σημαντικό πρόβλημα αντοχής στην λινεζολίδη. Η αντοχή κυρίως οφείλεται σε μεταλλάξεις στο σημείο σύνδεσης της λινεζολίδης στο 23S rRNA του ριβοσώματος. Πολύ λιγότερο συχνές είναι οι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωματικές πρωτεΐνες. Επειδή τα Gram-θετικά βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου του MRSA) έχουν πολλαπλά (συνήθως τέσσερα έως έξι) αντίγραφα των 23S rRNA γονιδίων, απαιτούνται πολλαπλές μεταλλάξεις για να επιφέρουν αντοχή. Επιπλέον, στελέχη με πολλαπλές μεταλλάξεις επιδεικνύουν μειωμένη ικανότητα επιβίωσης. Συνολικά, αυτοί οι δύο παράγοντες πιθανώς διακοινογούν το γεγονός ότι μέχρι τώρα δεν αποτελούν πρόβλημα οι ανθεκτικοί στη λινεζολίδη MRSA παρά την κλινική χρήση της λινεζολίδης για πάνω από μια δεκαετία. Ωστόσο, το πρόσφατα χαρακτηρισμένο *cfr* γονίδιο που βρίσκεται σε ένα κινητό πλασμίδιο και αρχικά απομονώθηκε από coagulase-αρνητικούς σταφυλόκοκκους, βρέθηκε σε ζώα στη Γερμανία, έχει βρει τρόπο να μεταφερθεί σε MRSA. Η ριβοσωμική θέση μεθυσίωσης από το προϊόν του *cfr* γονιδίου προσδίδει αντοχή σε οξαζολιδινόνες, χλωραμφαινικόλη, πλευρομουτιλίνες, λινκοζαμίδες και στις στρεπτογραμίνες A. Μέχρι στιγμής έχουν υπάρξει μόνο σποραδικές αναφορές MRSA που φέρουν αυτό το γονίδιο σε διάφορα μέρη του κόσμου, αλλά δύο πρόσφατα κρούσματα λοίμωξης που οφείλονται σε σταφυλόκοκκους που περιέχουν το *cfr* γονίδιο στη Μαδρίτη αποτελούν αιτία για ανησυχία.

### 1.3.6 Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Από τα παραπάνω θα πρέπει να είναι σαφές ότι, παρά τα 50 χρόνια έντονης προσπάθειας για την εύρεση εμβολίων ή αντιμικροβιακών παραγόντων που μπορούν να εξαλείψουν τον MRSA, δεν έχει ακόμα επιτευχθεί αυτό. Η μάχη συνεχίζεται και ένας αριθμός νέων παραγόντων, μερικοί με μοναδικό μηχανισμό δράσης, είναι σε εξέλιξη. Ωστόσο, ακόμη και εδώ ο σταφυλόκοκκος δείχνει την «ευφυΐα» του. Αρκετά πρόσφατα παραδείγματα αποδεικνύουν αυτό το γεγονός. Μια ελκυστική προσέγγιση για την εξεύρεση νέων αντιβιοτικών είναι η εύρεση βασικών γονιδίων σε βακτήρια που δεν βρίσκονται στα κύτταρα των θηλαστικών. Τα βακτήρια αρχίζουν την πρωτεϊνσύνθεση ενσωματώνοντας πρώτα την N-φορμυλο-μεθειονίνη ως αρχικό αμινοξύ κατά τη διαδικασία της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μετά την ολοκλήρωση του πολυπεπτιδίου, η N-φορμυλ-μεθειονίνη πρέπει να υδρολυθεί (από ένα ένζυμο, γνωστό ως deformylase) ώστε να προκύψει μια λειτουργική πρωτεΐνη. Αυτό το στάδιο της πρωτεϊνσύνθεσης δεν υπάρχει στα κύτταρα των θηλαστικών και έτσι φαίνεται να αποτελεί ιδανικός αντιμικροβιακός στόχος. Έχουν συντεθεί ένας αριθμός αναστολέων της deformylase και μερικοί βρίσκονται σε πρώιμες κλινικές δοκιμές. Δυστυχώς, όμως, σε αντίθεση με τα *in vitro* αποτελέσματα, όταν πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε μοντέλο αρουραίων με ενδοκαρδίτιδα, υπήρξε ταχεία και πλήρη ανάπτυξη της αντοχής σε στελέχη *S. aureus*, παρά την αναστολή της deformylase (R.C. Moellering Jr, αδημοσίευτα δεδομένα).

Οι πλευρομουτιλίνες αποτελούν μια νέα κατηγορία αντιμικροβιακών με ένα μοναδικό μηχανισμό δράσης που αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση του ριβοσώματος με τρόπο που υπερεξίζει έναντι άλλων μηχανισμών των αναστολέων της πρωτεϊνσύνθεσης που συνδέονται με το 50S ριβόσωμα, όπως μακρολίδες, χλωραμφαινικόλη και λινκοσαμίδες. Οι πλευρομουτιλίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στην Ευρώπη στον τομέα της κτηνοτροφίας, αλλά, δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ανθρώπων. Παρά το γεγονός αυτό, όπως προαναφέρθηκε, οι πρόσφατα αναφερόμενες *cfm* μεθυλάσες που επιλέγονται από oxazolidinones και άλλα αντιβιοτικά θα μπορούσαν να μεσολαβήσουν στην διασταυρούμενη αντοχή στις πλευρομουτιλίνες πριν ακόμα τεθούν σε ευρεία κλινική χρήση. Η επιτυχία στον έλεγχο της εξάπλωσης του MRSA που περιέχει τη *cfm* μεθυλάση μπορεί να

καθορίσει την απόλυτη επιτυχία των πλευρομουτιλινών έναντι του MRSA. Μέχρι στιγμής, όπως σημειώνεται, δεν έχει υπάρξει ευρεία διάδοση αυτών των MRSA.

#### 1.4 ΕΜΦΑΝΙΣΗ MRSA ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΞΑΚΙΛΛΙΝΗ (OXACILLIN-SUSCEPTIBLE MRSA, OS-MRSA)

Στελέχη *S. aureus* με MIC στην οξακιλλίνη  $\geq 2$  mg/L ή που φέρουν το γονίδιο *mecA*, θεωρούνται ανθεκτικά στην οξακιλλίνη. Ωστόσο, τα στελέχη *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA*, μπορεί να έχουν MIC για την οξακιλλίνη που να κυμαίνεται από  $<2$  to  $>1,000$  mg/L. Είναι λοιπόν σαφές ότι η παρουσία του *mec* γονιδίου από μόνη της δεν προσδιορίζει την κλινική έκφραση της αντοχής. Η πληθυσμιακή ανάλυση αυτών των στελεχών έδειξε ότι άλλα στελέχη έχουν ετερογενή αντοχή και άλλα ομοιογενή (Tomasz *et al.*, 1991, Rohrer *et al.*, 2003, Hososaka *et al.*, 2007).

Είναι επίσης ευρέως γνωστό ότι η έκφραση της αντοχής των MRSA στην οξακιλλίνη είναι σπάνια ομοιογενής και τις περισσότερες φορές είναι ετερογενής. Η ετερογενής αντοχή στην οξακιλλίνη μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φαινοτυπικές τάξεις έκφρασης (τάξεις από 1 έως 4), με την τάξη 1 να είναι η περισσότερο ετερογενής ( $\leq 1$  in  $10^8$  των αποικιών έχουν υψηλού επιπέδου αντοχή), την τάξη 4 να είναι ομοιογενώς ανθεκτική ( $\geq 1$  in  $10^2$  ανθεκτικών αποικιών) και τις τάξεις 2 και 3 να έχουν ενδιάμεσους αριθμούς ανθεκτικών αποικιών (Tomasz *et al.*, 1991).

Κατά τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξανόμενη εμφάνιση στελεχών MRSA που έχουν χαμηλές MIC για την οξακιλλίνη ( $<2$  mg/L, OS-MRSA) ενώ φέρουν το *mecA* γονίδιο. Η πρώτη αναφορά εμφάνισης OS-MRSA στην Ελλάδα αφορά κλώνους που προέκυψαν στο κλινικό περιβάλλον του ΠΓΝΑ κατά το 2001 (Petinaki *et al.*, 2002) και διέφεραν αρκετά από στελέχη που κυρίως υπήρχαν στην περιοχή της Θεσσαλίας τα τελευταία χρόνια. Τα στελέχη είχαν κατηγοριοποιηθεί ως ευαίσθητα στην οξακιλλίνη με την μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ και την μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικού σε άγαρ, καθώς και από το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek (bioMerieux). Οι MICs για την οξακιλλίνη σε αυτά τα στελέχη κυμαίνονταν από 0.5 έως 1 mg/L. Οι πληθυσμιακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα στελέχη ήταν ετερογενώς ανθεκτικά στην οξακιλλίνη και ανήκαν στην τάξη 1. Αποικίες από 25 OS-MRSA στελέχη εξετάστηκαν με ειδική εμπορική δοκιμασία, όπου χρησιμοποιείται αντίσωμα έναντι της PBP2a (MRSA latex agglutination test)



(bioMerieux) και έδωσαν θετική συγκολλητινοαντίδραση, η οποία δείχνει ότι παρά την φαινοτυπική ευαισθησία στην οξακιλλίνη τα στελέχη παράγουν την PBP2a. Επίσης η PCR επιβεβαίωσε την παρουσία του *mecA* γονιδίου σε όλα τα στελέχη. Υπάρχει πιθανότητα ότι αυτοί οι κλώνοι προϋπήρχαν στην περιοχή αλλά δεν ανιχνεύθηκαν με συμβατικές δοκιμασίες ευαισθησίας. Τα στελέχη αυτά μπορεί να χαρακτηριστούν λανθασμένα ως ευαίσθητα στην οξακιλλίνη από τα εργαστήρια, αν δεν γίνει η μοριακή ανίχνευση του γονιδίου *mecA*.

Πιο αναλυτικά, στελέχη OS-MRSA έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία 10 χρόνια και από αρκετές άλλες περιοχές παγκοσμίως (*Hososaka et al., 2007, Forbes et al., 2008, Chen et al., 2009, Saeed et al., 2010*). Όσον αφορά τον Ελληνικό χώρο, μία άλλη μελέτη από την Ελλάδα (*Chini et al. 2008*), περιέγραψε από την περιοχή της Πάτρας, στελέχη OS-MRSA. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι ανιχνεύθηκαν στελέχη με ST τύπο 30 και 80, οι οποίοι ήταν από τους συχνότερα ανιχνευθέντες κλώνους στην περιοχή, από τα οποία το 14,3% και 8.6% αντιστοίχως, έχουν MIC στην οξακιλλίνη <2mg/L και χαρακτηρίζονται ως OS-MRSA.

Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν σε Νοσοκομείο του Βερολίνου (*Kampf et al., 2003*) επτά *mecA*-θετικά στελέχη *S. aureus* με φαινοτυπική ευαισθησία στην οξακιλλίνη, που περιγράφηκαν ως «εν υπνώσει» MRSA. Δύο από τα επτά στελέχη ήταν κλωνικά συγγενή όπως φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ενός στελέχους μάλιστα, ήταν πανομοιότυπο με εκείνο από MRSA στέλεχος.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και χαρακτηρισμός *S. aureus* στελεχών που απομονώθηκαν με συμβατικές μεθόδους μεταξύ του Σεπτεμβρίου 2004 και Ιανουαρίου 2005 στις ΗΠΑ (*Forbes et al., 2008*), με σκοπό την ανίχνευση στελεχών OS-MRSA και τον χαρακτηρισμό τους. Χρησιμοποιώντας διάφορες φαινοτυπικές μεθόδους ανιχνεύθηκαν 25 OS-MRSA στελέχη μεταξύ 832 *S. aureus* στελεχών. Αυτά τα 25 στελέχη αποτελούν το 3% των συνολικών στελεχών που μελετήθηκαν και προέκυψαν μετά από επέκταση του χρόνου επώασης σε τρυβλίο με οξακιλλίνη από 24 ώρες σε 48 ώρες.

Μετάπειτα, κατά τη διάρκεια του Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου 2010, σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, απομονώθηκαν στελέχη *S. aureus* ευαίσθητα στην οξακιλλίνη από καλλιέργειες αίματος σε τρεις διαφορετικούς ασθενείς στο Royal

Hampshire County Hospital, Winchester, Ηνωμένο Βασίλειο (Saeed *et al.*, 2010). Αυτά τα στελέχη που αργότερα αποδείχθηκε ότι ήταν θετικά για το γονίδιο *mecA* και ως εκ τούτου θεωρήθηκαν ως *mecA*-θετικά στελέχη *S. aureus* ευαίσθητα στην οξακιλλίνη (OS-MRSA). Οι αρχικές MICs για τα τρία στελέχη κυμαίνονταν από 0.5-1.99 mg/L κάτι που δείχνει ότι είναι ευαίσθητα στην οξακιλλίνη, όμως η παρουσία λίγων αποικιών που αναπτύχθηκαν κοντά στην Etest ταινία οξακιλλίνης πυροδότησαν μια υποψία ότι αποτελούν ασύνηθες φαινόμενο (εικόνα 11). Και τα τρία στελέχη επιβεβαιώθηκε



**Εικόνα 11.** Λίγες αποικίες που αναπτύσσονται κοντά στην Etest ταινία οξακιλλίνης

ότι είναι *S. aureus* και θετικά για το γονίδιο *mecA*. Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (PFGE) έδειξε ότι τα τρία στελέχη ήταν διαφορετικά, οπότε δεν αποτελούν απομονώσεις από κοινή πηγή ούτε από μεταφορά από ασθενή σε ασθενή. Επίσης, τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη, τετρακυκλίνη και λινεζολίδη.

Επίσης, η πρώτη μελέτη σύγκρισης των γενετικών προφίλ των *rnI*-θετικών MSSA και MRSA που πραγματοποιήθηκε στην Ταϊβάν έδειξε ότι τα περισσότερα στελέχη από αυτά ανήκουν στον ST59 τύπο, που κυριαρχεί στην περιοχή. Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση των γενετικών προφίλ από 51 MSSA στελέχη με 80 MRSA από τα ίδια νοσοκομεία. Τα περισσότερα *rnI*-θετικά MRSA στελέχη στην Ταϊβάν ανήκουν στον ST59 τύπο και φέρουν το *SCCmecV*. Εννέα *rnI*-θετικά MSSA με MIC στην οξακιλλίνη  $\leq 2$  mg/L, παρουσίαζαν >80% ομοιότητα σε ηλεκτροφορητικό

πρότυπο (PFGE) με 17 *pnI*-θετικά MRSA στελέχη. Περαιτέρω μελέτη αυτών έδειξε ότι 5 από τα 9 στελέχη ήταν MRSA (με δοκιμασία κεφοξιτίνης και PCR) και φέρουν το *SCCmecV*. Η επικράτηση των ST59:*SCCmecV* MRSA μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην ετερογενή αντοχή στην μεθικιλίνη, με επακόλουθη έκθεση σε β-λακτάμες που προκαλεί την εμφάνιση των πιο ανθεκτικών υποπληθυσμών (Chen et al., 2009).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε 6 *S. aureus* στελέχη που φέρουν το *mecA* γονίδιο και έχουν MIC στην οξακιλλίνη < 2 mg/L (OS-MRSA) από το σύνολο των 480 *S. aureus* στελεχών που συλλέχθηκαν από 11 νοσοκομεία σε διαφορετικές περιοχές της Ιαπωνίας από το 2003 έως 2005 (Hososaka et al., 2007). Και τα 6 OS-MRSA στελέχη ήταν *SCCmec*-θετικά και 4 από ήταν *SCCmecIII* που είναι σπάνιος τύπος για την περιοχή της Ιαπωνίας. Οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα συγκεκριμένα στελέχη είναι πιθανό να τους χορηγήθηκαν β-λακταμικά αντιβιοτικά με αποτέλεσμα τα OS-MRSA στελέχη να μετατραπούν σε high-level ανθεκτικά σε β-λακτάμες MRSA.

Τέλος, ανιχνεύθηκαν δύο στελέχη OS-MRSA από δύο διαφορετικές περιπτώσεις ασθενών με βακτηριαιμία στις ΗΠΑ (Katie et al., 2012). Τα στελέχη αυτά έχουν MICs στην οξακιλλίνη  $\leq 0.5$  mg/L και μετά από DNA ανάλυση με microarrays χαρακτηρίστηκαν ως *mecA*-θετικά με clonal complex 5 (CC5) για το pediatric στέλεχος, και clonal complex 8 (CC8) για το USA300.

Πιστευόταν παλαιότερα γενικά ότι τα περισσότερα στελέχη OS-MRSA παρουσιάζουν ετερογενή αντοχή στην οξακιλλίνη, έστω και σε χαμηλή συχνότητα αποικιών και ότι η θεραπευτική χορήγηση β-λακταμών θα μπορούσε να οδηγήσει σε θεραπευτικές αποτυχίες (Sakoulas, 2001). Καθώς όμως η αντοχή στην οξακιλλίνη πρέπει να οφείλεται και σε άλλους άγνωστους παράγοντες, πέραν του *mecA*, οι οποίοι να οδηγούν σε ποικίλα επίπεδα έκφρασης των φαινοτύπων αντοχής, είναι λογικό να υπάρχουν και μη ετερογενή, λειτουργικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη *mecA*-θετικά στελέχη *S. aureus*. Εφόσον τέτοια στελέχη υπάρχουν, οι θεραπευτικές επιλογές θα ήταν πολύ περισσότερες και θα περιλάμβαναν πενικιλλινασο-ανθεκτικές β-λακτάμες, οι οποίες είναι η καλύτερη θεραπεία έναντι των MSSA (Joukhadar, 2010).

Από τις παραπάνω αναφορές είναι εμφανές ότι στελέχη OS-MRSA υπάρχουν σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, κάτι που σημαίνει ότι είναι σύνηθες

χαρακτηριστικό μεταξύ των *mecA*-θετικών *S. aureus*. Τέτοια στελέχη μπορεί να είναι πολύ πιο διαδεδομένα και πιθανόν να μην ανιχνεύονται με τις μεθόδους ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια. Επίσης, στον Ελληνικό χώρο φαίνεται από τις προηγούμενες αναφορές να υπάρχουν αυξανόμενα στελέχη OS-MRSA. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι είναι απαραίτητος ο ενδεδειγμένος χαρακτηρισμός τους, που αποτέλεσε το κύριο έναυσμα και σκοπό της παρούσας διατριβής, όπως θα παρατεθεί παρακάτω.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μελέτη μας αυτή λοιπόν ξεκίνησε και επιχείρησε όχι μόνο τον ενδελεχή χαρακτηρισμό των υποκείμενων μηχανισμών σε μεγάλη συλλογή στελεχών OS-MRSA, σε μια περιοχή όπου το ποσοστό εμφάνισης *mecA*-θετικών *S. aureus* είναι από τα υψηλότερα στην Ευρώπη και απομονώνονται όλο και περισσότερα στελέχη OS-MRSA που προέρχονται από την κοινότητα. Ακόμη, σκοπός της μελέτης ήταν και η διερεύνηση της δραστικότητας της οξακιλλίνης, με *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι μέχρι σήμερα, η θεραπεία εκλογής κατά των MRSA λοιμώξεων είναι η βανκομυκίνη. Ωστόσο, οι πενικιλλινοάντοχες πενικιλίνες παραμένουν ως θεραπεία εκλογής για τα MSSA στελέχη λόγω της καλύτερης φαρμακοκινητικής δράσης τους σε σχέση με τα γλυκοπεπτίδια και επιπλέον επιλέγουν λιγότερη μικροβιακή αντοχή, παρουσιάστηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, που επισημάνθηκε και από κριτές του περιοδικού Antimicrobial Agents and Chemotherapy, να προσδιοριστεί η δραστικότητα των β-λακταμών αυτών έναντι των στελεχών OS-MRSA. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη περιέλαβε πειραματικές λοιμώξεις με απευθείας σύγκριση της οξακιλλίνης με τη βανκομυκίνη.

Επιπλέον, η μελέτη επικεντρώθηκε και σε παράγοντες που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην φαινοτυπική αυτή ευαισθησία. Πραγματοποιήσαμε μελέτη που αφορά την ανίχνευση τυχόν μεταλλάξεων στα FemXAB ένζυμα που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργική ακεραιότητά τους και την ομαλή σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος και ανιχνεύσαμε αμινοξικές αλλαγές που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία στην οξακιλλίνη. Απ' όσο γνωρίζουμε, δεν έχουν υπάρξει μελέτες που αναφέρουν συγκεκριμένες γονιδιακές fem μεταλλάξεις σε κλινικά OS-MRSA στελέχη.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Πραγματοποιήθηκε συλλογή βακτηριακών στελεχών αποτελούμενη από 400 κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* που απομονώθηκαν από παθολογικά δείγματα ασθενών Κλινικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, το μεγαλύτερο νοσοκομείο τριτοβάθμιας φροντίδας στην Κεντρική Ελλάδα, με περισσότερες από 600 κλίνες. Τα στελέχη αυτά συλλέχθηκαν από τον Νοέμβριο του 2006 έως και τον Ιούλιο του 2007 (πίνακας 6). Τα στελέχη έχουν απομονωθεί από διάφορα κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύονται στο ΠΓΝΛ, αλλά και εξωτερικούς ασθενείς. Στη μελέτη αυτή, επίσης, χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος ελέγχου το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Κλινικά στελέχη *S. aureus* που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

α/α	Κωδικός-Στέλεχος	Ημερομηνία απομόνωσης (μήνας/έτος)	Νοσοκομείο/Κλινική	Δείγμα
1	4666	01/11/2006	Δερμ/γική	Πύο
2	6036	14/11/2006	Παιδ/κή	Πύο
3	6083	14/11/2006	Νεογνά	Δερματική βλάβη
4	6601	19/11/2006	Τ.Ε.Π.	Πύο
5	7059	25/11/2006	Εξωτερικά Ιατρεία	Δερματική βλάβη
6	9131	14/12/2006	Νεογνά	Δερματική βλάβη
7	9132	14/12/2006	Νεογνά	Δερματική βλάβη
8	9136	14/12/2006	Παιδ/κή	Οτικό Έκκριμα
9	446	29/12/2006	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
10	959	04/01/2007	Τ.Ε.Π. Π/Δ	Δερματική βλάβη
11	970	04/01/2007	Τ.Ε.Π.	Πύο
12	1306	08/01/2007	Δερμ/γική	Πύο
13	1326	08/01/2007	Νευροχειρ/κή Παν.	Τραύμα
14	1552	09/01/2007	Παιδ/κή	Αρθρικό Υγρό
15	1512	09/01/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
16	1546	10/01/2007	Παιδ/κή	Αίμα
17	1880	13/01/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Δερματική βλάβη
18	2025	14/01/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
19	2229	16/01/2007	Γυναικ/κή	Τραύμα
20	2257	16/01/2007	Τ.Ε.Π. Π/Δ	Πύο
21	2629	19/01/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
22	3678	28/01/2007	Μ.Ε.Θ	Αίμα
23	4288	01/02/2007	Μ.Τ.Ν.	Αίμα
24	4323	01/02/2007	Μ.Τ.Ν.	Ρινικό
25	4324	01/02/2007	Μ.Τ.Ν.	Πύο
26	5710	15/02/2007	Παιδ/κή	Δερματική βλάβη
27	7393	02/03/2007	Ορθοπ/κή	Πύο



28	8818	15/03/2007	Παν. Παθολ/κή Γ	Δερματική βλάβη
29	9029	15/03/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Τραύμα
30	5305	11/05/2007	Παν. Παθολ/κή Α	Πτύελα
31	5504	14/05/2007	Δερμ/γική	Πύο
32	5505	14/05/2007	Ορθοπ/κή	Πύο
33	6774	25/05/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Οτικό Έκκριμα
34	7011	28/05/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
35	8301	04/06/2007	Ογκολογική	Πτύελα
36	9833	18/06/2007	Παν. Παθολ/κή Γ	Δερματική βλάβη
37	856	27/06/2007	Παν. Παθολ/κή Α	Πύο
38	1117	29/06/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
39	2726	13/07/2007	Ορθοπ/κή	Αρθρικό Υγρό
40	2856	15/07/2007	Ορθοπ/κή	Πύο
41	3661	23/07/2007	Μ.Τ.Ν.	Αίμα
42	3723	24/07/2007	Εξωτερικά Ιατρεία	Πύο
43	4897	25/07/2007	Δερμ/γική	Δερματική βλάβη
44	4916	25/07/2007	Μ.Τ.Ν.	Ούρα
45	5014	26/07/2007	Ουρολογική	Ούρα
46	5042	26/07/2007	Παν. Παθολ/κή Α	Αίμα
47	5114	27/07/2007	Παιδ/κή	Δερματική βλάβη
48	ATCC29213			
49	7263			

Σε επιλεγμένα στελέχη από αυτά πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* και *in vivo* διερεύνησης των πιθανών μηχανισμών που συμμετέχουν στον φαινότυπο αντοχής, με μεθοδολογίες όπως:

- προσδιορισμός του φαινοτύπου αντοχής τους σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών με τη μέθοδο της διάχυσης των αντιβιοτικών σε άγαρ και με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2
- προσδιορισμός της MIC στην οξακιλλίνη με την μέθοδο της αραιώσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και με E-τεστ
- διερεύνηση πιθανών μεταλλάξεων στα γονίδια *mecA* και *femA*, *femB*, *femX* και του επιπέδου έκφρασής τους με ποσοτική Real-Time PCR
- εκτέλεση πειραμάτων πληθυσμιακής ανάλυσης (population analysis) και θανάτωσης σε σχέση με το χρόνο (time-killing assays) για οξακιλλίνη και βανκομυκίνη σε σύγκριση μεταξύ τους και, τέλος,

- εκτέλεση πειραματικών λοιμώξεων σε επίμυες, που γίνονται ουδετεροπενικά και ακολουθεί μελέτη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με οξακιλλίνη και βανκομυκίνη.

### 2.1.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση

Η απομόνωση των συγκεκριμένων στελεχών έγινε σε κατάλληλα κοινά θρεπτικά υλικά, όπως αιματούχο άγαρ, Mueller Hinton άγαρ, Tryptic Soy άγαρ και σε κοινούς θρεπτικούς ζωμούς μετά από επώαση των εμβολιασθέντων θρεπτικών υλικών έγινε σε αερόβιες συνθήκες στους 37<sup>0</sup> C για 24 ώρες.

### 2.1.3 Μικροβιακή ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των στελεχών ως *S. aureus* στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, ο προσδιορισμός και η αρχική δοκιμή ευαισθησίας των σταφυλοκοκκικών στελεχών έγινε για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες με το σύστημα αυτό.

Τέλος, ο φαινότυπος αντοχής στα αντιβιοτικά, που ελέγχεται σε όλα τα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την προκαταρκτική ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών. Πάντως, η αξία του αντιβιογράμματος ως ταυτοποιητικής μεθόδου είναι περιορισμένη, καθώς στελέχη που δε σχετίζονται επιδημιολογικά, μπορεί να παρουσιάζουν όμοιο φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά.

### 2.1.4 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Είναι από τις πιο σημαντικές εξετάσεις που γίνεται στα Μικροβιολογικά Εργαστήρια.

#### 2.1.4.1 Παρασκευή εναιωρήματος μικροβίου

Για τον έλεγχο ευαισθησίας χρησιμοποιούμε εναιώρημα σε φυσιολογικό ορό που περιέχει περίπου 10<sup>8</sup> μικρόβια ανά ml για μεθόδους ευαισθησίας σε στερεά υλικά, με αντιβιοτικό που φέρεται σε μικρούς χάρτινους δίσκους. Οπτικά πρέπει να είναι

ίσο με το διάλυμα 0.5 της κλίμακας Mc Farland. Για μεθόδους ευαισθησίας σε σωληνάκια ή σε πλάκες μικροαραιώσεων αντιβιοτικών, αραιώνουμε το παραπάνω ελαιώρημα ώστε να πάρουμε πυκνότητα  $10^5 - 10^6$  μικρόβια / ml. Απαραίτητα χρησιμοποιούμε πρόσφατα καλλιεργήματα.

#### 2.1.4.2 Εκτέλεση μεθόδου ευαισθησίας

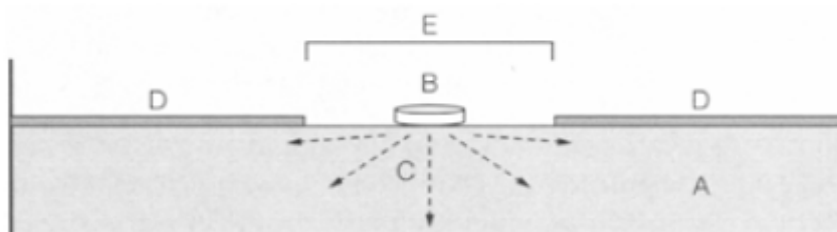
Παρακάτω αναφέρεται η αρχή της κάθε μεθόδου συνοπτικά.

#### 2.1.4.3 Μέθοδος Kirby – Bauer

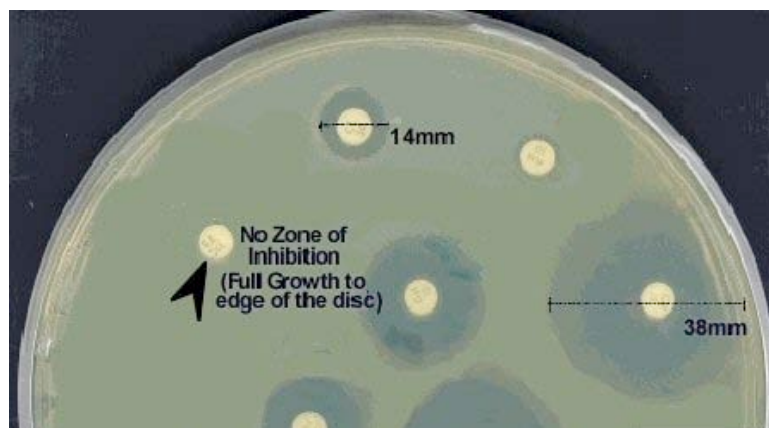
Μια πολύ απλή και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η μέθοδος δίσκου Kirby-Bauer.

Σε τρυβλία με Muller Hinton άγαρ, επιστρώνουμε με βαμβακοφόρο στυλεό το ελαιώρημα του μικροβίου. Τοποθετούμε δίσκους αντιβιοτικών με λαβίδα ή με ειδικό διανεμητή δίσκων και επωάζουμε 18 – 24 ώρες. Τα αντιβιοτικά διαχέονται στο θρεπτικό υλικό και αναστέλλουν την ανάπτυξη του μικροβίου γύρω από το δίσκο, ανάλογα με την ευαισθησία του μικροβίου σε αυτά. Η αναστολή της ανάπτυξης φαίνεται με ζώνη χωρίς μικρόβιο, γύρω από το δίσκο. Όσο πιο μεγάλη είναι η ζώνη αναστολής, τόσο πιο ευαίσθητο είναι το μικρόβιο. Υπάρχουν σε πίνακες τα όρια των ζωνών αναστολής, που διαφέρουν ανάλογα με το μικρόβιο και το αντιβιοτικό, και με βάση αυτούς χαρακτηρίζουμε το μικρόβιο ευαίσθητο, μέτρια ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής εξαρτάται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των:

- ✓ ποσότητα του αντιβιοτικού που εμπεριέχει ο δίσκος
- ✓ βαθμός ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιβιοτικό
- ✓ φυσικοχημικές ιδιότητες του αντιβιοτικού
- ✓ βάθος (σε mm) του άγαρ στο τρυβλίο
- ✓ συγκέντρωση του βακτηρίου



**Εικόνα 12.** Εμποτισμένος δίσκος με αντιβιοτικό. A: άγαρ, B: δίσκος, C: Το αντιβιοτικό διαχέεται στο άγαρ με βαθμίδωση, D: βακτηριακή



**Εικόνα 13.** Τρυβλίο που φέρει δίσκους με αντιβιοτικό. Γύρω από τον δίσκο που βρίσκεται πάνω αριστερά παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων δεν έχει ανασταλλεί από την παρουσία του αντιβιοτικού. Άρα ο κλώνος του βακτηρίου που βρίσκεται σε εκείνη την περιοχή φέρει κάποιο γονίδιο που του παρέχει αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Δεν παρατηρείται το ίδιο γύρω από τους υπόλοιπους δίσκους.

Όσο η απόσταση από τον δίσκο αυξάνεται, υπάρχει μία λογαριθμική μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού.

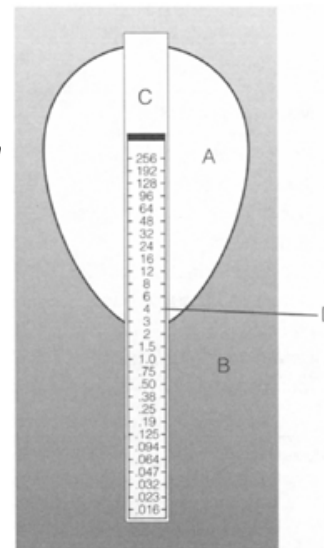
#### 2.1.4.4 Μέθοδος αραίωσης των αντιβιοτικών σε άγαρ

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου παρασκευάστηκαν τρυβλία με άγαρ και ενσωματώνουμε αντιβιοτικό σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g/ml}$  ή  $\text{mg/L}$ ). Για κάθε αντιβιοτικό έχουμε πολλά τρυβλία με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Εμβολιάζουμε το μικροβιακό ελαιώρημα στα τρυβλία και επωάζουμε. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροβίου είναι η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ ή MIC) του αντιβιοτικού. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις CLSI οδηγίες (CLSI, 2009).

#### 2.1.4.5 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) με τη μέθοδο του E-test

Σε μια ταινία πλαστική έχει προστεθεί υλικό με αντιβιοτικό, που έχει διαβαθμιζόμενη πυκνότητα από τη μία ως την άλλη άκρη της ταινίας. Σχηματίζεται ζώνη αναστολής ελλειπτική, και το σημείο (D) που αυτή τέμνει την ταινία είναι η ΕΑΠ.

**Εικόνα 14.** Καθορισμός της MIC με E-test. A: Ζώνη αναστολής, B: βακτηριακή ανάπτυξη, C: Ταινία E-test, D: Η MIC είναι το σημείο στο οποίο η άκρη της ζώνης αναστολής διασταυρώνει το E-test. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η MIC είναι 3mg/l.



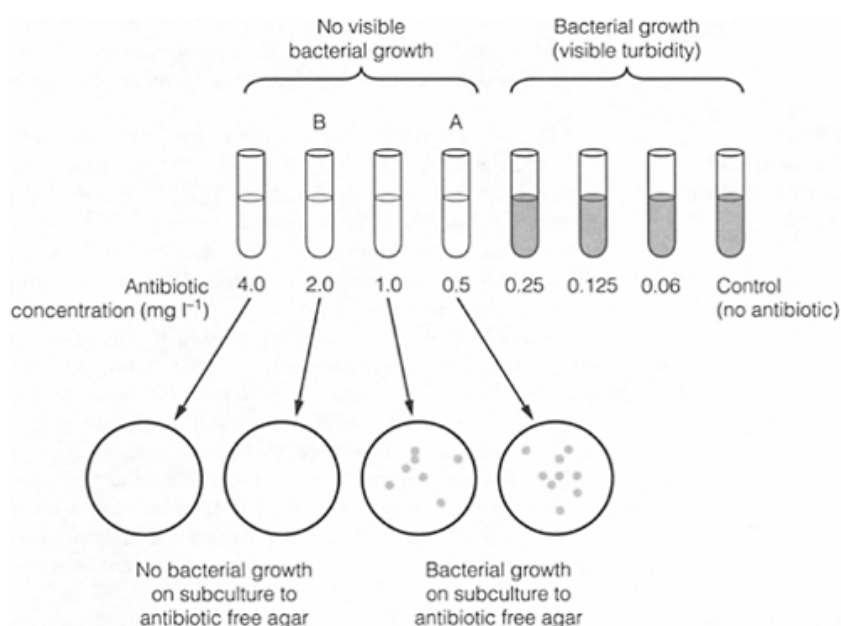
Κατά την εφαρμογή της μεθόδου E-test μεμονωμένες αποικίες μικροβίου εναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα εναιώρησης και πραγματοποιήθηκε εναιώρημα πυκνότητας ισοδύναμης με 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland (περίπου  $1.2 \times 10^8$  CFUs/mL). Η κλίμακα McFarland χρησιμοποιείται για την οπτική προσέγγιση της συγκέντρωσης των κυττάρων σε εναιώρημα. Η κλίμακα αυτή αντιπροσωπεύει συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των CFU/mL και έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων των gram αρνητικά βακτήρια όπως τα *E. coli*. Το εναιώρημα με τη βοήθεια ενός βαμβανοφόρου στειλεού επιστρώθηκε σε θρεπτικό υλικό Mueller Hinton άγαρ που περιέχει 2% NaCl, σε τρεις διευθύνσεις και στην περιφέρεια του τρυβλίου ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη σπορά του υλικού. Μετά τοποθετήθηκαν ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό. Κάθε ταινία αποτελείται από μία λεπτή πλαστική λωρίδα χωρίς πόρους πλάτους 5 mm και μήκους 60 mm. Στη μία πλευρά της λωρίδας αναγράφονται οι υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού σε mg/L και μπορούμε να διαβάσουμε την MIC, ενώ στην άλλη πλευρά είναι προσροφημένο το αντιβιοτικό με την αντίστοιχη διαβάθμιση στις συγκεντρώσεις του. Τα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 37°C και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται μετά από 24 ώρες. Η MIC του φαρμάκου, που ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού στους 37°C μετά από 18-24 h επώασης, διαβάζεται στο

σημείο που η αναστολή της ανάπτυξης του μικροβίου, υπό μορφή έλλειψης, συναντάει την ταινία.

Για τα στελέχη των σταφυλοκόκκων προσδιορίστηκε η MIC για τα αντιβιοτικά οξακιλλίνη, βανκομυκίνη και άλλες β-λακτάμες (αμπικιλλίνη, αμοξυκιλλίνη/ κλαβουλανικό, κεφαμανδόλη, κεφαλεξίνη και ιμιπενέμη) με την χρήση E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden), όπως ορίζεται από τις οδηγίες (NCCLS) και τα ερμηνευτικά κριτήρια του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2010).

#### 2.1.4.6 Μέθοδος μικροαραιώσεων σε σωληνάρια

Σε σειρά σωληναρίων παρασκευάζονται διαφορετικές (πολύ μεγάλες ως πολύ μικρές) συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Ρίχνουμε με πιπέτα την κατάλληλη ποσότητα ελαιωρήματος σε όλα τα σωληνάρια ή βυθίσματα της πλάκας και επωάζουμε 18 – 24 ώρες. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο σωληνάριο στο οποίο δεν φαίνεται ορατά η ανάπτυξη του μικροβίου χαρακτηρίζεται ως ΕΑΠ ή MIC. Όσο πιο μικρή είναι η ΕΑΠ, τόσο πιο ευαίσθητο είναι το μικρόβιο στο αντιβιοτικό. Υπάρχουν σε πίνακες τα όρια των ΕΑΠ, που επίσης διαφέρουν ανάλογα με το μικρόβιο και το αντιβιοτικό, και με βάση αυτούς χαρακτηρίζουμε το μικρόβιο ευαίσθητο, μέτρια ευαίσθητο ή ανθεκτικό.



**Εικόνα 15.** Διαδικασία της MIC. Σε αυτό το παράδειγμα, η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής του αντιβιοτικού είναι 0,5mg/l (Σωλήνας Α).

#### 2.1.4.6.1 Προσδιορισμός της MIC στην οξακιλλίνη και βανκομυκίνη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ

Σε όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκου προσδιορίστηκε η MIC της οξακιλλίνης και της βανκομυκίνης με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Μετά την παρασκευή του μητρικού διαλύματος όπου προτυποποιημένη καθαρή σκόνη αντιβιοτικού διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 2 mg/L, παρασκευάστηκαν τρυβλία Mueller Hinton άγαρ (Biolife) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού από 2 έως 32 mg/L. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L. Η MIC εκτελέστηκε με ή χωρίς την προσθήκη 2% NaCl στο θρεπτικό μέσο (στα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται οι MICs με NaCl). Η ετοιμασία του ενοφθαλμίσματος-στελέχους έγινε με την εναιώρηση αποικιών από πρόσφατη καλλιέργεια 24 ωρών σε MH άγαρ, σε H<sub>2</sub>O έως ότου επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με της κλίμακας McFarland 0.5 McF, η οποία αντιστοιχεί σε  $\sim 1.5 \times 10^8$  cfu/ml. Το εναιώρημα αραιώνεται 1/100 και στα τρυβλία ενοφθαλμίστηκε αριθμός μικροβίων περίπου  $10^4$  cfu/spot με τη βοήθεια ειδικού διανεμητή (Denley Instruments, Sussex, UK) που μεταφέρει 10 μl εναιωρήματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37<sup>o</sup> C για 24 ώρες. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεπε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθόρισε την MIC στο αντιβιοτικό. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213.

#### 2.1.5 Μικροβιακή τυποποίηση

Οι μικροβιακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να διευκρινιστεί η κλωνικότητα των μικροβιακών στελεχών (isolates) και συνεπώς η πιθανή εμπλοκή τους στην επιδημία καλείται «μικροβιακή τυποποίηση».

Ως μικροβιακή τυποποίηση (typing) καλούμε μια ομάδα μικροβιολογικών τεχνικών που:

- Μελετά τις ομοιότητες (συγγένειες) μεταξύ των μικροβιακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους ασθενείς που εμπλέκονται σε μια επιδημία
- Κατατάσσει τα μικροβιακά στελέχη στην βάση της ομοιότητας σε κλώνους
- Τεκμηριώνει την τυχόν κλωνική διασπορά του μικροοργανισμού στα κρούσματα της επιδημίας
- Διαχωρίζει τις σποραδικές λοιμώξεις από τις επιδημικές.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην μελέτη της ομοιότητας των μικροβιακών στελεχών και με βάση αυτήν την ιεραρχική ταξινόμησή τους.

### 2.1.6 Γενετική τυποποίηση των Σταφυλοκόκκων

Η ανάπτυξη και απλοποίηση των μοριακών τεχνικών που αφορούν τη μελέτη του γενετικού υλικού, σε συνδυασμό με την πρόοδο της πληροφορικής (βιοπληροφορική), έχει οδηγήσει σε μια νέα προσέγγιση στην τυποποίηση και τη μελέτη των επιδημιολογικών σχέσεων των μικροοργανισμών, που βασίζεται στην ανίχνευση, την καταγραφή και την αξιολόγηση των διαφορών του γενετικού υλικού των υπό μελέτη μικροοργανισμών.

Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης έχουν σαν στόχο τη σύγκριση του γενετικού υλικού των μικροβιακών στελεχών που εμπλέκονται σε μια επιδημία, ιδιαιτέρως δε του χρωμοσώματός τους και την ανάδειξη των μεταξύ τους γενετικών σχέσεων. Επειδή στο μικροβιακό χρωμόσωμα υπάρχουν αλληλουχίες αρκετά συντηρημένες ώστε να χαρακτηρίζουν ένα μικροβιακό είδος ή και γένος, αλλά και αλληλουχίες που παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη ποικιλομορφία, οι μέθοδοι που αναλύουν το χρωμόσωμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων αλλά και για το διαχωρισμό του είδους σε κλώνους με επιδημιολογική σημασία.

Με δεδομένη την παγκοσμιοποίηση των προβλημάτων δημόσιας υγείας που προκαλούν οι μεγάλες μετακινήσεις ατόμων, ζώων και αγαθών, οι επιδημίες αποκτούν συχνά διεθνή ή και παγκόσμια συνιστώσα και συνεπώς υπάρχει μια ολοένα και αυξανόμενη ανάγκη για ναταλλαγή δεδομένων σε διεθνές επίπεδο. Ένα σημαντικό χρήσιμο κριτήριο λοιπόν στην αξιολόγηση μίας μοριακής μεθόδου τυποποίησης είναι και η ικανότητά της να δημιουργεί δεδομένα ικανά να αποθηκευθούν, δημιουργώντας έτσι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες



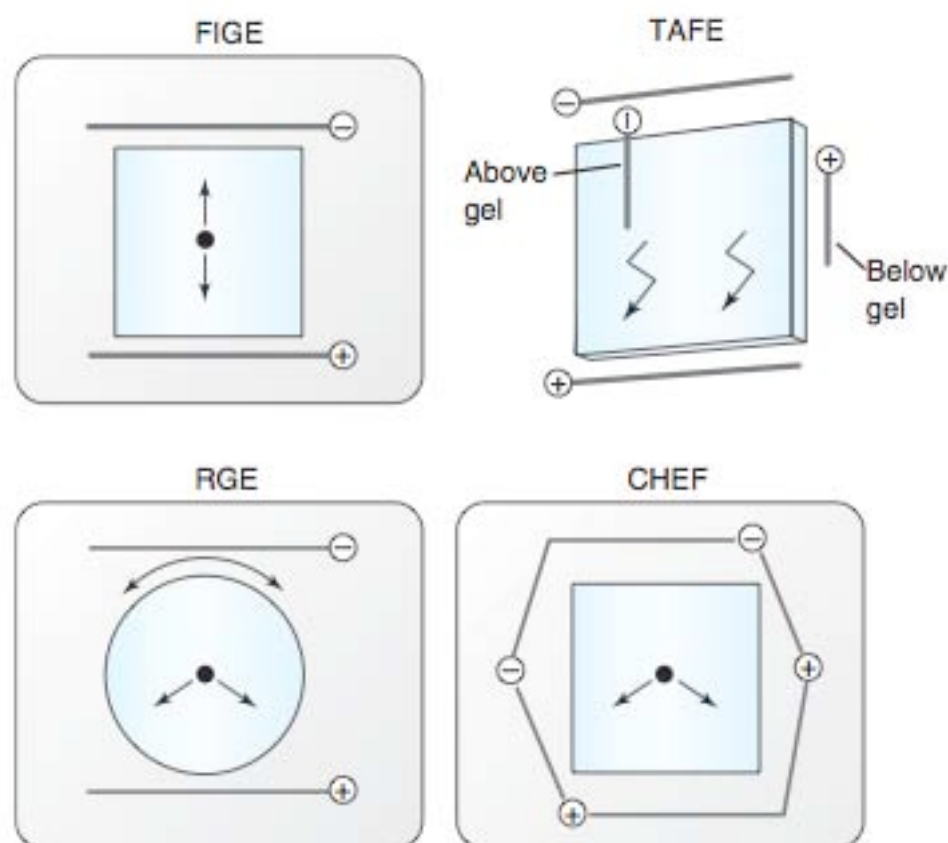
στην διεθνή επιστημονική κοινότητα. Τέτοιες είναι κυρίως οι μέθοδοι που βασίζονται στην **αλληλούχηση τμημάτων του DNA**, διότι τα δεδομένα που παράγουν είναι αναπαραγώγιμα και αποθηκεύσιμα. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα μεθόδου που βασίζεται στον προσδιορισμό νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι η MLST.

Σημειώνεται πάντως ότι η απλοποίηση και η αυτοματοποίηση της τεχνικής της αλληλούχησης, που πλέον εκτελείται από αυτόματους αναλυτές, έχει επίσης συμβάλει στην υιοθέτηση της τεχνικής αυτής ως μεθόδου τυποποίησης.

#### **2.1.6.1 Γενετική συσχέτιση των στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)**

Μια κατηγορία μοριακών μεθόδων τυποποίησης βασίζεται στην πέψη του χρωμοσώματος των υπό μελέτη μικροοργανισμών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και την ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων που προκύπτουν σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι διαφορές των ηλεκτροφορημάτων που απεικονίζουν τις διαφορετικές θέσεις που δρουν οι περιοριστικές ενδοκονουκλεάσες στο χρωμόσωμα κάθε στελέχους, είναι γνωστές ως restriction pattern length polymorphisms (RFLPs).

Οι κοινές περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν θέσεις που επαναλαμβάνονται συχνά στο μικροβιακό χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να το κόβουν σε πολυάριθμα κομμάτια και η σύγκριση ηλεκτροφορημάτων να είναι από δύσκολη έως αδύνατη. Αν όμως χρησιμοποιηθεί μια περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει σπάνιες θέσεις του χρωμοσώματος, προκύπτουν λιγότερα θραύσματα και, συνεπώς, πιο «ευανάγνωστο» ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Επειδή τα θραύσματα που προκύπτουν στην τελευταία περίπτωση είναι πολύ μεγάλα (εκατοντάδες χιλιάδες ζεύγη βάσεων), είναι αδύνατο να διαχωριστούν με συμβατική ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) επιτρέπει το διαχωρισμό τμημάτων DNA μεγαλύτερων των 1000 kb. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μοριακές δοκιμές εκτελούνται με PFGE, η οποία μπορεί να προσδιορίσει οργανισμούς με μεγαλύτερα γονιδιώματα ή πολλαπλά χρωμοσώματα (**εικόνα 16**).



**Εικόνα 16.** Field inversion gel electrophoresis (FIGE), contour-clamped homogeneous electric field (CHEF), transverse alternating field electrophoresis (TAFE), και rotating gel electrophoresis (RGE) αποτελούν όλα τα παραδείγματα ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Τα βέλη υποδεικνύουν την πορεία του DNA.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PFGE έχουν θεσπιστεί κριτήρια, με βάση τα οποία συγκρίνονται οι διαφορές στα πρότυπα πέψης διαφορετικών απομονώσεων και του πιθανού επιδημικού στελέχους και εκτιμάται η πιθανότητα να ανήκουν οι απομονώσεις αυτές στον επιδημικό κλώνο. Επειδή αναλύεται ένα μεγάλο ποσοστό, αλλά όχι ολόκληρο το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού, τα στελέχη που έχουν ίδια ηλεκτροφορητικά πρότυπα χαρακτηρίζονται ως «μη διακριτά μεταξύ τους» (indistinguishable) και όχι ως όμοια. Ο Tenover και οι συνεργάτες του επινόησαν ένα σύστημα για την ερμηνεία των προτύπων του υπό μελέτη οργανισμού σε σύγκριση με ένα επιδημικό στέλεχος. Η ερμηνεία των PFGE αποτελεσμάτων είναι αρκετά απλή και ακολουθεί τον «κανόνα των τριών» (**πίνακας 7**) (Tenover et al., 1995). Χάρη στην αναπαραγωγικότητα και τη μεγάλη διακριτική της ικανότητα, η PFGE αποτελεί μέθοδο αναφοράς σε πολλά είδη βακτηριδίων και

έχει χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση πολυάριθμων ειδών, συμπεριλαμβανομένων στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Escherichia coli*, *N. gonorrhoeae*, VRE, και MRSA.

Σήμερα, μέσω διεθνών συνεργασιών έχει επιτευχθεί πολύ υψηλή προτύπωση της τεχνικής, γεγονός που έχει επιτρέψει τη δημιουργία βάσεων δεδομένων, που βασίζονται στην σύγκριση εικόνων ηλεκτροφόρησης θραυσμάτων DNA. Τέτοια βάση δεδομένων είναι το Αμερικάνικο Pulse-NET (<http://www.dcd.gov/pulsenet/>), αλλά και το Ευρωπαϊκό (<http://www.pulsenet-europe.org>). Ένα μειονέκτημα στην εκτέλεση της PFGE είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πραγματοποίηση της ανάλυσης αυτής.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 7.

##### Κριτήρια ερμηνείας PFGE ηλεκτροφορητικού προτύπου κατά Tenover

Κατηγορία Στελεχών	Γενετικές διαφορές	Διαφορές ηλεκτροφορητικών θραυσμάτων	Επιδημιολογική ερμηνεία
Μη διακριτά	0	0	Ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο με επιδημικό στέλεχος
Στενή συγγένεια	1	2-3	Στενή επιδημιολογική συσχέτιση με επιδημικό στέλεχος
Πιθανή συγγένεια	2	4-6	Πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση με επιδημικό στέλεχος
Διαφορετικά	≥3	≥6	Καμία επιδημιολογική συσχέτιση με επιδημικό στέλεχος

Με την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο μελετήθηκε η γενετική συγγένεια των κλινικών στελεχών της μελέτης και η αναζήτηση της τυχόν κλωνικής διασποράς της αντοχής. Η μέθοδος εκτελέστηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, CHEF-DRIII (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

Το πρωτοκόλλο που ακολουθήθηκε ξεκινάει αρχικά με καλλιέργεια των στελεχών σε τρυβλία που περιέχουν Tryptic Soy άγαρ και επωάζονται στους 37 °C για 20h. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια από μία αποικία από τα τρυβλία σε 5 ml Tryptic

Soy ζωμό (Biolife) και επωάζονται στους 37°C για 20h. Κατόπιν το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) και γίνεται ανασύσταση αυτού.

Ακολουθεί η μέτρηση των εναιωρημάτων σε κλίμακα McFarland. Σε 1 ml καθαρού διαλύματος PIV προσθέτουμε ποσότητα από το προαναφερθέν διάλυμα τόσο ώστε η θολρότητα του να είναι αντίστοιχη με το βαθμό 5.0 της κλίμακας McFarland. Το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 3 λεπτά, απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση του ιζήματος σε 200 µl PIV. Κατόπιν παρασκευάζεται διάλυμα αгарόζης 2% χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) σε 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα PIV και διατηρείται σε υδατόλουτρο στους 42 °C μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη για τουλάχιστον 10 λεπτά. Όγκος 100µl πηκτής αгарόζης αναμειγνύεται με 100 µl δείγματος και τοποθετούνται 6-8 πλακίδια μείγματος αгарόζης-μικροβίου των 20 µl για κάθε στέλεχος, επάνω σε γυάλινο εκμαγείο (γυάλινη πλάκα) και καλύπτονται με αντικειμενοφόρους πλάκες.

Τοποθετείται το εκμαγείο με τις κηλίδες στις οποίες έχει εγκλωβιστεί το μικροβιακό εναιώρημα στους -20 °C για αυστηρά 5 λεπτά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Σε αποστειρωμένα σωληνάρια με 1 ml διαλύματος EC (6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium laurylsarcosine, pH 8.0) που περιέχει 100 mg/L lysozyme (Sigma-Aldrich), 50 mg/L RNaseA (Sigma-Aldrich) και 50 mg/L lysostaphin (Sigma-Aldrich) τοποθετείται η πηκτή αгарόζης με τα μικροβιακά κύτταρα και επωάζεται στους 37 °C για 20 ώρες έτσι ώστε να καταστραφεί το μικροβιακό τοίχωμα. Αφήνεται το υλικό στους 4 °C για 10 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί και πάλι η αгарόζη και στη συνέχεια αφαιρείται όλο το διάλυμα EC. Το διάλυμα EC αντικαθίσταται από 1 ml διαλύματος ESP (0.5 M EDTA, 1% sarcosyl, pH 9.0) το οποίο περιέχει 1 mg/ml πρωτεΐνωση K (Bioline), περιεκτικότητας 40 U/mg, και τα πλακίδια επωάζονται ολονύκτια στους 60 °C ώστε να γίνει η πέψη όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Αφαιρείται το διάλυμα ESP και ακολουθούν 5 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0) ανά 20 λεπτά ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα της πρωτεΐνωσης K και των πρωτεϊνικών καταλοίπων. Η αгарόζη

(κηλίδα) που περιέχει τώρα μόνο το μικροβιακό DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C σε διάλυμα TE.

Γίνεται πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο *Sma*I (10 U/μl). Για κάθε στέλεχος χρειαζόμαστε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tango 1X, που περιέχει 40 units *Sma*I. Για την πέψη του DNA απαιτείται επώαση ολονύχτια στους 30 °C. Προστίθεται σε κάθε δείγμα 10 μl χρωστικής 10X Blue Juice Loading Buffer (65% w/v sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.3% w/v Bromophenol Blue) και τοποθετείται η αγαρόζη (κηλίδες) στους 4 °C για 10 λεπτά ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση του ενζύμου. Τα κομμάτια της αγαρόζης με το γενωμικό DNA τοποθετούνται και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης (1% agarose for pulsed field electrophoresis running gel σε 0.5X TBE). Το γενωμικό DNA κάθε στελέχους, κατά την ηλεκτροφόρηση, αναλύεται σε ηλεκτροφορητικές ταινίες ανάλογα με το μέγεθος των κομματιών του που προκύπτει από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στις παρακάτω συνθήκες: T=11.3°C, V= 6Volts/cm, 120° switch angle, initial switch time 5 δευτερόλεπτα, final switch time 35 δευτερόλεπτα. Οι συνθήκες αυτές είναι κοινές για τα στελέχη εντεροκόκκων και σταφυλοκόκκων. Όμως ο συνολικός χρόνος διαφέρει στα δύο είδη. Έτσι για τους εντεροκόκκους ο συνολικός χρόνος ανέρχεται στις 18.5 ώρες ενώ στους σταφυλοκόκκους στις 20 ώρες. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PULSE MARKERTM 50-1,000 kb (Sigma-Aldrich) που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου γνωστών μεγεθών. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή της αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο και χρωματίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 1 mg/L για 30 λεπτά. Η πηκτή αποπλένεται για 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το ηλεκτροφόρημα παρατηρείται σε UV ακτινοβολία και τυπώνεται ψηφιακά.

### 2.1.6.2 Τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων (MLST-MultiLocus Sequence Typing)

Η τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων είναι τεχνική της μοριακής βιολογίας για την τυποποίηση πολλαπλών γονιδιακών τόπων. Η διαδικασία χαρακτηρίζει στελέχη των μικροβιακών ειδών χρησιμοποιώντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εσωτερικών τμημάτων των πολλαπλών συντηρημένων γονιδίων (housekeeping genes).

Η τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων, που είναι η εξέλιξη της Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), χρησιμοποιεί μεγαλύτερο, και άρα πιο αντιπροσωπευτικό, τμήμα του γενετικού υλικού από την SLST (Single Locus Sequence Typing). Ειδικότερα, η MLST συγκρίνει τις αλληλουχίες τμημάτων έξι ή επτά ή περισσότερων γονιδίων του βασικού μεταβολισμού, που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη ενός είδους. Χρησιμοποιούνται περίπου 450-500 bp των εσωτερικών τμημάτων από κάθε γονίδιο για αλληλούχηση, και οι αλληλουχίες που προκύπτουν ορίζονται ως αλλήλια. Για κάθε συντηρημένο γονίδιο, οι διαφορετικές αλληλουχίες που συναντώνται σε ένα βακτηρικό είδος ορίζονται ως διαφορετικά αλληλόμορφα και, για κάθε στέλεχος, ο συνδυασμός των αλληλίων του κάθε γονιδιακού τόπου καθορίζουν αλληλικό προφίλ και το κατατάσσει σε έναν ST (sequence type) τύπο. Η τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων (MLST) μετράει άμεσα τις ποικίλες DNA αλληλουχίες σε ένα σύνολο συντηρημένων γονιδίων και χαρακτηρίζει τα στελέχη από το μοναδικό τους αλληλικό προφίλ. Επειδή υπάρχουν πολλά πιθανά αλλήλια για κάθε γενετικό τόπο, είναι απίθανο πανομοιότυπα προφίλ αλληλίων να έχουν προκύψει τυχαία. Έτσι, στελέχη με τα ίδια αλλήλια θεωρούνται μέλη του ίδιου κλώνου.

Η αρχή της MLST μεθόδου είναι απλή: η τεχνική αυτή συνίσταται στην ενίσχυση με PCR ακολουθούμενη από την αλληλούχηση του DNA. Η μέθοδος αυτή συγκεκριμένα αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο έρευνας και μελέτης της κλωνικής εξέλιξης των MRSA και βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας τμημάτων 500 bp από επτά housekeeping γονίδια του *S. aureus*, όπως *arcC* (καρβαμيدική κινάση), *aroE* (shikimate αφυδρογονάση), *glpF* (κινάσης της γλυκερόλης), *gmk* (γουανιλική κινάση), *pta* (ακετυλοτρανσφεράση του φωσφορικού άλατος), *trpI* (τριφωσφορική ισομεράση) και *yciL* (ακετυλο συνενζύμο-A ακετυλοτρανσφεράση). Αρχικά

πραγματοποιείται ταυτόχρονη ενίσχυση των παραπάνω γονιδιακών τόπων με την μέθοδο της PCR (Enright *et al.*, 2000). Στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία των ενισχυμένων προϊόντων με αλληλούχηση και τελικά κάθε εξεταζόμενο στέλεχος αποκτά έναν κωδικό αριθμό που υποδηλώνει το αλληλόμορφο που διαθέτει για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο (τύπος ST). Ο προσδιορισμός του ST τύπου πραγματοποιείται μέσω της MLST βάσης δεδομένων (<http://www.mlst.net>). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμεύει στη φυλογενετική διάκριση των υπό μελέτη στελεχών.

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

### 2.1.7 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis)

Υγρή καλλιέργεια σταφυλόκοκκου μετά από ολονύκτια επώαση αραιώθηκε σε cation adjusted Mueller-Hinton ζωμό ώστε να αποκτήσουμε πυκνότητα ίση με 4 της κλίμακας McFarland (περίπου  $10^9$  CFUs). Έχοντας αυτό ως αρχικό εναιώρημα, διανέμουμε σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ που περιέχουν διάφορες συγκεντρώσεις δικλοξακιλλίνης (sodium dicloxacillin monohydrate, Diclocil; Bristol-Myers Squibb), τις ποσότητες 100μl (περίπου  $10^8$  CFUs), 10μl (περίπου  $10^7$  CFUs), και 1μl (περίπου  $10^6$  CFUs), σύμφωνα με το πρότυπο πρωτόκολλο των Tomasz *et al.* (Tomasz *et al.*, 1991). Η δικλοξακιλλίνη ενσωματώθηκε στα τρυβλία ώστε να έχουμε σειρά υποδιπλάσιων αραιώσεων για συγκεντρώσεις από 0.25 έως 32 mg/L, με προσθήκη 1 mg/L για συγκεντρώσεις από 1 έως 24 mg/L και προσθήκη 2 mg/L για

συγκεντρώσεις από 6 έως 16 mg/L, προκειμένου να εντοπίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλλαγές στις ευαισθησίες των ετεροανθεκτικών πληθυσμών. Οι αποικίες που αναπτύσσονται μετρώνται μετά από 48h επώασης στους 35°C. Η μέθοδος πραγματοποιείται εις τριπλούν για όλα τα στελέχη, και η μέση ανάπτυξη αποικιών (CFUs) σε κάθε συγκέντρωση μετράται και αποτυπώνεται σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα. Επίσης, το πρωτόκολλο (*Tomasz et al., 1991*) της πληθυσμιακής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε μετά την προσθήκη 2% NaCl στο θρεπτικό μέσο. Οι πληθυσμιακές αναλύσεις των υπό μελέτη στελεχών συγκρίθηκαν με εκείνες των low- και high-level MRSA απομονώσεων και του προτύπου ATCC 29213. Για τον προσδιορισμό της μοριακής σταθερότητας του γονιδίου *mecA*, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση δικλοξακιλλίνης ελέγχθηκαν με PCR για την παρουσία του γονιδίου *mecA* και επίσης για την παραγωγή της PBP2a, όπως περιγράφεται παραπάνω. Καθώς οι περισσότεροι κλινικοί γιατροί χρησιμοποιούν την βανκομυκίνη για την θεραπεία λοιμώξεων από *S. aureus* που φέρει το γονίδιο *mecA*, οι παραπάνω πληθυσμιακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης για τη βανκομυκίνη παράλληλα με την δικλοξακιλλίνη.

#### 2.1.8 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays)

Υγρές καλλιέργειες μικροβίων σε Mueller-Hinton ζωμό μετά από ολονύκτια επώαση, χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία εναιωρήματος σε cation-adjusted Mueller-Hinton ζωμό, και περίπου  $5 \times 10^6$  CFUs ενοφθαμίστηκαν σε Mueller-Hinton ζωμό που περιέχει 20 mg/l δικλοξακιλλίνης (*Sakoulas et al., 2001*). Το τελικό εναιώρημα με δικλοξακιλλίνη επώάζεται στους 35°C. Κύτταρα που επιβίωσαν στην παρουσία της δικλοξακιλλίνης, μετρήθηκαν αφαιρώντας 0.1 ml κάθε φορά από την υγρή καλλιέργεια σε χρόνους επώασης των 0, 1, 3, 6, 9, 14, 24, 30, 42 και 48 ωρών και διανέμοντας την ποσότητα αυτή (και αραιώσεις αυτής) σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ ώστε μετά από 24ωρη επώαση να μετρηθούν αποικίες. Η διαδικασία εκτελείται εις τριπλούν για όλα τα στελέχη, και η μέση ανάπτυξη αποικιών (CFUs) σε κάθε χρόνο επώασης μετράται και αποτυπώνεται σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε επίσης χρησιμοποιώντας Mueller-Hinton ζωμό που περιέχει 10 mg/l βανκομυκίνη (*Shelburne et al., 2004*).



### 2.1.9 Εξαγωγή του γενωμικού μικροβιακού DNA για PCR

Μεμονωμένες αποικίες από ανακαλλιέργεια μικροβίου που έγινε σε Mueller Hinton άγαρ για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του γενετικού υλικού, η οποία έγινε με την χρήση του εμπορικού kit της Qiagen που ονομάζεται Qiaamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Δύο έως τρεις μεμονωμένες αποικίες εναιωρούνται σε 180 μl λυτικού διαλύματος (ATL Buffer) με ανάδευση για 15'. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl Proteinase K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56°C για 2 ώρες και ενδιάμεση ανάδευση έτσι ώστε στο διάστημα αυτό επιτυγχάνεται η λύση. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 200 μl λυτικού διαλύματος (AL Buffer) για να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες. Σημαντική είναι η ομογενοποίηση του μείγματος με ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl απόλυτης αιθανόλης και αναδεύεται για 15'. Το ομογενοποιημένο νέο δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Spin column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε ένα σωληνάριο των 2 ml. Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 στις 8000 rpm. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται διάλυμα πλύσεως (AW1 και AW2, 500 μl έκαστο) και φυγοκεντρείται για 1 στις 8000 rpm και 3 στις 13000 rpm αντίστοιχα. Με μία επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 στις 14000 rpm απομακρύνουμε τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης. Στο τέλος της διαδικασίας στη στήλη προστίθενται 200 μl διαλύματος έκπλυσης (AE Buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5, φυγοκέντρωση για 1 στις 8000 rpm και μεταφορά σε σωληνάρια τύπου erpendorf και συντήρηση στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

### 2.1.10 Ανίχνευση της PBP2a και του *mecA* γονιδίου

Για την ανίχνευση της PBP2a, που υποδηλώνει την έκφραση του *mecA* γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε το Slidex MRSA latex test συγκόλλησης (bioMerieux). Η συγκεκριμένη δοκιμή latex είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που ανιχνεύει MRSA στελέχη εντός 15'. Η αρχή της μεθόδου αφορά στην ανίχνευση της πρωτεΐνης PBP2a που παράγουν οι MRSA, όταν φέρουν και εκφράζουν το *mecA* γονίδιο.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ειδική PCR για το *mecA* γονίδιο (Shukla 2004), ανάλυση της αλληλουχίας του *mecA* και τυποποίηση με PCR του στοιχείου *SCCmec* (Milheirico et al., 2007).

### 2.1.11 Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα υπό μελέτη γονίδια των *S. aureus* ενισχύονται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται γενωμικό DNA των βακτηρίων και ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον παρακάτω **πίνακα 8**.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.**

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος	
			PCR προϊόντων (bp)	Συνθήκες PCR
<i>mecA</i>	mecAP4	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G	162	94°C 30sec 53°C 30sec 72°C 1min
	mecAP7	CCA CTT CAT ATC TTG TTA CG		
<i>pvl</i>	luk-PV-1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG A...CCA	433	94°C 1min 52°C 1min 72°C 1min
	luk-PV-2	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC A...AGC		
<i>femX</i> cloning	FEMX FWD	GCC ATG GAA AAG ATG CAT ATC AC	1278	94°C 45sec
	NcoI			54°C 1min
	FEMX REV XhoI	CTC GAG TTT TCG TTT TAA TTT ACG AG		72°C 1min
<i>femA</i> cloning	FEMA FWD	GGA TCC ATG AAG TTT ACA AAT	1275	94°C 1min
	BamHI	T...AGC		52°C 1min
	FEMA REV	CTC GAG AAA AAT TCT GTC TTT		72°C 1min
	XhoI	A...AAG		
	FEMB FWD	GGA TCC ATG AAA TTT ACA GAG	1272	94°C 45sec

	BamHI	T...TAC		
<i>femB</i>	FEMB REV			53°C 45sec
cloning	XhoI	CTC GAG TTT CTT TAA TTT TTT A...TCG		72°C 1min
	FEMA-2F	AAC TGT TGG CCA CTA TGA GT		95°C 45sec
<i>femA</i>			306	48°C 45sec
QRT-PCR	FEMA-2R	CCA GCA TTA CCT GTA ATC TCG		72°C 45sec
	FEMB-F	GGA TGG GCG TAT TAA AAC TTG		95°C 45sec
<i>femB</i>			177	52°C 45sec
QRT-PCR	FEMB-R	CAG CAC GCT CTT CAG TTT CAC		72°C 45sec
	FEMX-1F	CCA CCG AAA TCG TAA GTT GTT G		95°C 45sec
<i>femX</i>			308	54°C 45sec
QRT-PCR	FEMX-1R	GCT AAA TGG CAG CAG AAG ATG		72°C 45sec
	ArcC up	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC		95°C 1min
			456	55°C 1min
	ArcC dn	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG		72°C 1min
	AroE up	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC		95°C 1min
MLST			456	55°C 1min
	AroE dn	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC		72°C 1min
	GlpF up	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C		95°C 1min
			465	55°C 1min
	GlpF dn	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC		72°C 1min
	Gmk up	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC		95°C 1min
			429	55°C 1min
	Gmk dn	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA		72°C 1min
	Pta up	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG		95°C 1min
			474	55°C 1min
	Pta dn	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA		72°C 1min
	Tpi up	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA	402	95°C 1min

			55°C 1min
Tpi dn	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC		72°C 1min
YqiL up	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC		95°C 1min
		516	55°C 1min
YqiL dn	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC		72°C 1min

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας, ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων κατά την ενίσχυση του γονιδίου. Η PCR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γενωμικό DNA των βακτηρίων. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την δράση της DNA πολυμεράσης, στο οποίο προστίθενται περίπου 100ng γενωμικού DNA, 0.2 mM από κάθε dNTP, 1.6 mM από κάθε εκκινητή, 5 U DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται στις συνθήκες που αναφέρονται στον **πίνακα 8**.

#### 2.1.12 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων PCR πραγματοποιούνται σε πηκτώμα αγαρόζης. 10μL από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,8% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Επίσης, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχο αιθιδίου (15μL EtBr (από αρχικό stock 10mg/ml) σε 150ml αγαρόζη). Το EtBr προστίθεται έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA στην πηκτή αγαρόζης και αυτό οφείλεται στην ιδιότητά του να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φωσφορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120-130V. Η συγκέντρωση της αγαρόζης για την προετοιμασία της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και επομένως από το μέγεθος των προϊόντων που πρέπει να διαχωριστούν. Η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X έτσι ώστε να καλύπτεται από αυτό. Στην συνέχεια, μεταφέρονται 10μL από το προϊόν της PCR, που έχουν προηγουμένως αναμιχθεί με 2μL χρωστική 6x (6x Loading Dye Solution, Fermentas), σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Η χρωστική που

χρησιμοποιείται βοηθάει το DNA να καθίσει στην βάση της υποδοχής και επίσης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την ηλεκτροφόρηση. Παράλληλα με το δείγμα ηλεκροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0.1μg/μl, Fermentas) ώστε να υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων DNA.

### **2.1.13 Καθαρισμός και αποστολή των PCR προϊόντων για νουκλεοτιδική αλληλούχηση**

Όλα τα προϊόντα PCR των υπό μελέτη γονιδίων που θα υποβληθούν στην διαδικασία της αλληλούχησης, εφαρμόστηκε καθαρισμός με το σύστημα του εμπορικού kit Purelink® PCR Purification Kit (Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA) με αποτέλεσμα την απομάκρυνση αλάτων, εκκινητών, των dNTPs και άλλων μη επιθυμητών νουκλεϊκών προϊόντων. Κατά τη διαδικασία του καθαρισμού εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο από τον κατασκευαστή. Συγκεκριμένα ακολούθησε:

Σε 40 μl προϊόντος PCR προσθέτουμε 160 μl ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού PureLink Binding Buffer με ισοπροπανόλη και αναδεύουμε ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Μεταφέρουμε το δείγμα σε μία στήλη PureLink Spin Column. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να προσδεθεί το δίκλωνο DNA στη στήλη. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη. Προσθέτουμε στη στήλη 650 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεως Wash Buffer με αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 λεπτά για να απομακρυνθούν τυχόν υπολλείματα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα σωληνάριο errendorf του 1.5 ml. Προσθέτουμε στο κέντρο της στήλης 50 μl διαλύματος έκλουσης Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα έκλουσης περιέχει το καθαρό PCR προϊόν που αποθηκεύεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Η μέθοδος της ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε για τον ακριβή εντοπισμό των μεταλλάξεων που εδράζονται σε ποικίλα γονίδια των στελεχών

εντεροκόκκου και σταφυλοκόκκου. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με ένα μηχάνημα αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των προϊόντων της PCR έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Sanger. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs). Αυτά είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές μία για κάθε βάση και στερούνται της 3-OH ομάδας, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και να εμποδίζουν την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων. Έτσι προκύπτουν αλληλουχίες DNA με ποικίλο μήκος που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θέσεις ενσωμάτωσης των ddNTPs και ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η αρχική φάση γίνεται όπως και η PCR σε θερμοκυκλοποιητή, με τη διαφορά ότι στην ανάλυση αλληλουχίας των βάσεων χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που οδηγεί σε γραμμικό πολλαπλασιασμό των προϊόντων επέκτασης. Για κάθε δείγμα γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις σε αντίστοιχα σωληνάρια που το καθένα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την *in vitro* σύνθεση του DNA, τα σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP ή ddCTP ή ddGTP ή ddTTP) και έναν εκκινητή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται 4 σημασμένα DNA θραύσματα διαφορετικού μήκους. Για την τελική ανίχνευση των θραυσμάτων του γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ανάλυση του ηλεκτροφορήματος και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των βάσεων γίνεται με αυτόματο αναλυτή (DNA sequencer). Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες πρότυπων στελεχών στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Genbank που διατίθεται από το NCBI, National Center for Biological Information.

#### 2.1.14 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες

Τον γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών ακολούθησε η διερεύνηση της δραστηρότητας της οξακιλλίνης σε ετεροάντοχα στελέχη MRSA με χαμηλά επίπεδα αντοχής, σε σύγκριση με πληθυσμούς μικροβίων με υψηλότερη αντοχή. Πραγματοποιήθηκε συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ώστε να μελετηθεί η *in vivo* δράση της οξακιλλίνης παράλληλα με την βανκομυκίνη. Όλες οι μελέτες σε ζώα

έχουν εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και είναι σύμφωνες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Σε κάθε πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν έξι εβδομάδων θυληκά Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) ποντίκια (Harlan, Indianapolis, IN, USA) απαλλαγμένα από συγκεκριμένους παθολογικούς παράγοντες, με βάρος από 23 έως 27g, σε διαφορετικές ομάδες (Hedge *et al.*, 2008). Τα ποντίκια καθίστανται ουδετεροπενικά (ουδετερόφιλα  $<100/\text{mm}^3$ ) με ενέσεις κυκλοφωσφαμίδης ενδοπεριτοναϊκά την τέταρτη ημέρα (150 mg / kg) και την πρώτη ημέρα (100 mg/kg) πριν από τη μόλυνση του μηρού με τα υπό μελέτη στελέχη (Andes *et al.*, 2002, LaPlante *et al.*, 2008). Πραγματοποιήθηκαν λοιμώξεις σε μηρό για κάθε ένα από τα στελέχη, μέσω διαμόλυνσης με ένεση 0.1 ml του βακτηριακού εναιωρήματος συγκέντρωσης  $7 \log_{10}$  CFU/ml. Οι λοιμώξεις έγιναν εις τριπλούν για δεκαεννέα ευαίσθητα στην οξακιλλίνη στελέχη (OS-MRSA) που φέρουν το *mecA* γονίδιο, καθώς και για τα στελέχη ελέγχου (control strains) ATCC 29213, SA 1610 και SA 7263. Αφού έγινε η διαμόλυνση των ποντικιών, υποβλήθηκαν σε θεραπεία ανά ομάδες είτε με οξακιλλίνη 500 mg/kg/12h ενδοπεριτοναϊκά, είτε με βανκομυκίνη 180 mg/kg/12h υποδόρια, και κάποια παρέμειναν χωρίς θεραπεία για πάνω από 24h. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε επίσης εις τριπλούν για τα ευαίσθητα στην οξακιλλίνη στελέχη (OS-MRSA) που φέρουν το *mecA* γονίδιο, τα οποία ενέθηκαν στον αριστερό μηρό των ποντικιών, αλλά δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με οξακιλλίνη για να χρησιμοποιηθούν ως controls. Τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία μετά την 24-η θεραπεία. Ακολούθως, οι μύες των μηρών αφαιρέθηκαν, ομογενοποιήθηκαν, έγιναν επανειλημμένες αραιώσεις αυτών (1/100, 1/10000) και τέλος επιστρώθηκε ποσότητα 0.1ml κάθε αραιώσης σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ ώστε να προσδιοριστούν οι αποικίες. Ο τίτλος του μηρού που προέκυψε εκφράστηκε ως  $\log_{10}$ CFU/μυό μηρού. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα t-test. Για όλα τα πειράματα η P τιμή  $\leq 0.05$  θεωρήθηκε ενδεικτική της στατιστικής σημαντικότητας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Minitab (version 13.31).

### 2.1.15 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Quantitative Real Time PCR)

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι αρχικά στο tube, θα χρειαστούν και λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ποσοτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων με ποσοτική one-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen SuperScript<sup>TM</sup> III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit



προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων FEM και του *mecA*. Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του **πίνακα 8**. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (QRT-PCR – Quantitative Real Time PCR) έγινε σε συσκευή MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) χρησιμοποιώντας τη χρωστική SYBR Green (Qiagen, Hilden, Germany). Το ενδογενές γονίδιο *recA* χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο (Pournaras et al, 2006) σταθερής έκφρασης για την ποσοτικοποίηση και οι συνθήκες της PCR ήταν: ένας κύκλος στους 50°C για 3 min, ένας κύκλος στους 95°C για 5 min, 40 κύκλοι: από 95°C για 15 sec, 60°C για 30 sec και ένας κύκλος στους 40°C για 1 min. Για την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων, οι αντιδράσεις QRT-PCR επαναλήφθηκαν χωρίς χρωστική SYBR Green και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA απομονωμένο από τα υπό μελέτη στελέχη. Η εξαγωγή του ολικού RNA έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο TRI Reagent (Ambion, Derbyshire, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία στα 260 nm. Οι ενδεχόμενες επιμολύνσεις από γενωμικό DNA απομακρύνθηκαν με τη δράση DNaseI (Fermentas). Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω **πίνακα 9**.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Συστατικά αντίδρασης qRT-PCR**

Component	μl /50μl of reaction
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (includes RNase Out)	1
2X SYBR Green Reaction Mix (includes 0.4mM of each dNTP and 6mM MgSO <sub>4</sub> )	25
Forward primer, 10 μM	1
Reverse primer, 10 μM	1
ROX Reference Dye (25 μM)	0.1
DEPC-treated water	≤10
Template (1 pg to 1 μg total RNA)	to 50

### 2.1.16 Κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδίων και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης

Σε προηγούμενη μελέτη έχει αναφερθεί ο προσδιορισμός της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *mecA*. Η ποσοτική έκφραση των γονιδίων *mecA* και *fem* προσδιορίστηκε με τη RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR), σύμφωνα με τα υπάρχοντα πρωτόκολλα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο *mecA* ήταν εκείνοι που περιγράφονται σε προηγούμενη μελέτη και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια *fem* είναι αυτοί που φαίνονται στον **πίνακα 8**. Κατά την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ενισχύθηκε για προτυποποίηση το single-copy housekeeping γονίδιο *arc*, χρησιμοποιώντας για εκκινητές τους εξής:

*arc*-F 5'-TTGATTCACCAGGGCGTATTGTC-3' και

*arc*-R 5'-AGGTATCTGCTTCAATCAGCG-3'

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ελέγχου NTC (Non template control) και no RT. Οι PCRs πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Platinum DNA πολυμεράση και Pfx πολυμεράση (invitrogen), και τα PCR προϊόντα που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pSC-A (Stratagene) και ακολούθησε αλληλούχηση αυτών εις διπλούν (Macrogen, Σεούλ, Νότια Κορέα). Τα στοιχεία αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας Chromas v.1.45 και MEGA λογισμικό V.3.1.

### 2.1.17 Γενωμική ανάλυση και μοριακή μοντελοποίηση των FemXAB πρωτεϊνών

Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των *mecA*, *femX*, *femA* και *femB* γονιδίων και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες του στελέχους MRSA252 (GenBank accession number BX571856) και εκείνες όλων των γνωστών MRSA γονιδιωμάτων ελήφθησαν από τις διαθέσιμες δημόσιες βάσεις δεδομένων ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα *mecA* και *fem* γονίδια είναι ισχυρά συντηρημένα καθώς παρουσιάζουν μόνο μερικές διαφορές μεταξύ τους στο MRSA γονιδίωμα αυτών που συγκρίναμε. Για να αξιολογήσουμε μόνο μεταλλάξεις που μπορεί να έχουν κλινική σημασία, εστίασαμε σε μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε θέσεις που διαφέρουν σε σχέση με όλα τα γνωστά MRSA γονιδιώματα και επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου με υποκαταστάσεις αμινοξέων. Οι αλληλουχίες των *mecA*, *femX*, *femA* και *femB* γονιδίων των στελεχών της μελέτης και για τη σύγκριση αυτών με το στέλεχος

MRSA252 κάναμε αντιστοίχιση με Clustal W. Αυτές οι αλλαγές εισήχθησαν στην αλληλουχία της αντίστοιχης πρωτεΐνης από το στέλεχος MRSA252. Η νέα αλληλουχία που περιέχει όλες τις μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν για κάθε παράγοντα Fem, χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής χρησιμοποιώντας τον αυτόματοποιημένο διαδικτυακό διακομιστή σύγκρισης πρωτεϊνικών μοντέλων SWISS-MODEL ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)), που βασίζεται στην μοντελοποίηση ομόλογων πρωτεϊνικών δομών. Η γνωστή κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης FemA από *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη δομή για τον προσδιορισμό των ομόλογων μοντέλων των πρωτεϊνών FemB και FemX.

Τα αλλαγμένα αμινοξέα υποδεικνύονται ως άτομα και το υπόλοιπο του μορίου ως κορδέλλες-ribbons, χρησιμοποιώντας το λογισμικό UCSF Chimera v.1. Οι δομές που προέκυψαν από μοριακή μοντελοποίηση συγκρίθηκαν με την γνωστή κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης FemA από *S. aureus* και την μοντέλο δομής που έχει αναφερθεί για την πρωτεΐνη FemX από *Weissella viridescens*.

#### 2.1.18 Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών

Οι καμπύλες ανάπτυξης καθορίστηκαν με αραίωση 0,1 mL Mueller-Hinton ζωμού, μετά από ολονύκτια επώαση, των OS-MRSA στελεχών, καθώς και του SA6083, χαμηλή αντοχή στην οξακιλλίνη, και του ιδιαίτερα ανθεκτικού στελέχους ελέγχου SA2712, σε 15 ml ζωμού και ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Η οπτική πυκνότητα της ποσότητας 1 mL κάθε καλλιέργειας προσδιορίστηκε-μετρήθηκε κάθε ώρα για τις πρώτες 10 ώρες.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Προέλευση στελεχών και αρχικός προσδιορισμός βασικών χαρακτηριστικών τους

Αρχικά, μελετήθηκαν 47 στελέχη από την συλλογή των *Staphylococcus aureus* που συλλέχθηκαν κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2006 έως Ιούλιος 2007, από τα οποία το μεγαλύτερο ποσοστό αν και έφεραν το γονίδιο *mecA*, ήταν φαινοτυπικά ευαίσθητα στη μεθικιλίνη, σύμφωνα με το σύστημα VITEK 2 αλλά και E-test με NaCl 2%, ενώ τα υπόλοιπα είχαν χαμηλή αντοχή. Συγκεκριμένα, το σύστημα VITEK 2 έδειξε ότι 27 από τα στελέχη ήταν ευαίσθητα και 20 ανθεκτικά στη μεθικιλίνη, ενώ τα αποτελέσματα από E-test σε παρουσία NaCl 2% έδειξαν ότι 41 από τα στελέχη έχουν MIC στην οξακιλλίνη  $\leq 2\text{mg/L}$  και τα υπόλοιπα 6 έχουν MIC  $>2\text{mg/L} - \leq 6\text{mg/L}$ . Επίσης, όλα τα στελέχη της μελέτης ήταν ευαίσθητα στην βανκομυκίνη. Επίσης, περιλήφθηκε 1 στέλεχος MRSA με υψηλή αντοχή στη μεθικιλίνη και ένα ευαίσθητο στη μεθικιλίνη, *mecA*-αρνητικό στέλεχος, ως στελέχη ελέγχου.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των 49 στελεχών**

α/α	Κωδικός-Στέλεχος	Susceptibility status defined by Vitek2		Etest MIC 2%NaCl	PCR για <i>mecA</i>	PCR για PVL	PFGE type
		Oxacillin	Vancomycin				
1	4666	S	S	1	+	+	Ia
2	6036	R	S	1	+	+	Ib
3	6083	R	S	6	+	+	Ib
4	6601	S	S	0.75	+	+	Ia
5	7059	S	S	0.25	+	+	Ia
6	9131	S	S	0.38	+	+	Ia
7	9132	R	S	1	+	+	Ia
8	9136	R	S	4	+	+	Ib
9	446	R	S	0.5	+	+	Ia
10	959	S	S	0.38	+	+	Ib
11	970	S	S	0.75	+	+	Ia
12	1306	S	S	0.5	+	+	Ib
13	1326	R	S	0.25	+	-	XII
14	1552	S	S	1	+	+	Id
15	1512	S	S	0.5	+	+	II
16	1546	S	S	0.75	+	+	Id
17	1880	R	S	1.5	+	+	Ia
18	2025	R	S	4	+	+	Ia
19	2229	R	S	3.5	+	+	Ia
20	2257	R	S	4	+	+	Ib
21	2629	S	S	1	+	+	Ic
22	3678	S	S	0.25	+	-	-
23	4288	R	S	0.25	+	+	Ia
24	4323	R	S	0.75	+	+	Ia
25	4324	S	S	0.75	+	+	Ia
26	5710	R	S	1.5	+	+	Ie

27	7393	S	S	0.25	+	-	XIII
28	8818	S	S	1.5	+	+	VI
29	9029	S	S	0.25	+	-	VIII
30	5305	R	S	1	+	+	Ia
31	5504	S	S	2	+	+	Ia
32	5505	R	S	1	+	+	Ia
33	6774	R	S	1	+	+	Ia
34	7011	R	S	1.5	+	+	Ia
35	8301	S	S	0.25	+	-	VII
36	9833	S	S	0.5	+	+	Ia
37	856	S	S	0.5	+	-	XII
38	1117	S	S	0.25	+	+	Ia
39	2726	S	S	0.25	+	-	XIV
40	2856	R	S	3	+	+	Ia
41	3661	S	S	0.5	+	-	IXb
42	3723	S	S	0.38	+	-	XI
43	4897	S	S	0.25	+	-	X
44	4916	S	S	0.5	+	-	IXa
45	5014	R	S	0.5	+	-	III
46	5042	S	S	1	+	-	V
47	5114	R	S	2	+	+	Ia
48	ATCC29213				-	-	
49	7263	R	S	256		+	IV

### 3.2 Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών *S. aureus* με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Στα πλαίσια του ελέγχου της μοριακής επιδημιολογικής συσχέτισης των ευαίσθητων στην οξακιλλίνη *S. aureus* στελεχών, έγινε ανάλυση του γενωμικού τους DNA με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου. Πραγματοποιήθηκε PFGE για όλα τα υπό μελέτη στελέχη και τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προέκυψαν αναλύθηκαν δια γυμνού οφθαλμού σύμφωνα με τα ερμηνευτικά κριτήρια των Tenover et al.

Η γενετική τυποποίηση με PFGE έδειξε ότι τα παραπάνω στελέχη *S. aureus* ανήκουν σε δεκατρείς διαφορετικούς κλώνους (I-XIV), δηλαδή αυτά τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα δεν έχουν καμία ηλεκτροφορητική συσχέτιση μεταξύ τους, με τον επικρατέστερο κλώνο I να συμπεριλαμβάνει 32 από τα 47 στελέχη και να παρουσιάζει πέντε υποτύπους (Ia, Ib, Ic, Id, Ie) που διαφέρουν μεταξύ τους από μία έως τρεις ζώνες. Πιο συγκεκριμένα, 22 στελέχη ανήκουν στον κλώνο Ia που είναι μη διακριτά μεταξύ τους, 6 στελέχη ανήκουν στον κλώνο Ib, 1 στέλεχος ανήκει στην κατηγορία Ic, 2 στελέχη ανήκουν στον κλώνο Id, 1 στέλεχος ανήκει στην κατηγορία Ie (όλα αυτά τα στελέχη έχουν στενή συγγένεια μεταξύ τους). Τα υπόλοιπα στελέχη

ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους, εκτός από 2 που ανήκουν στους υποτύπους IXa (SA4916) και IXb (SA3661), και 2 (SA856 και SA1326) που ανήκουν στον κλώνο XII. Στις παρακάτω εικόνες εμφανίζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (**εικόνα 17**). Επίσης, στον **πίνακα 10** παρατίθενται τα κύρια χαρακτηριστικά των υπό μελέτη στελεχών σε συσχέτιση με τα ηλεκτροφορητικά πρότυπά τους.

**A**





**B**



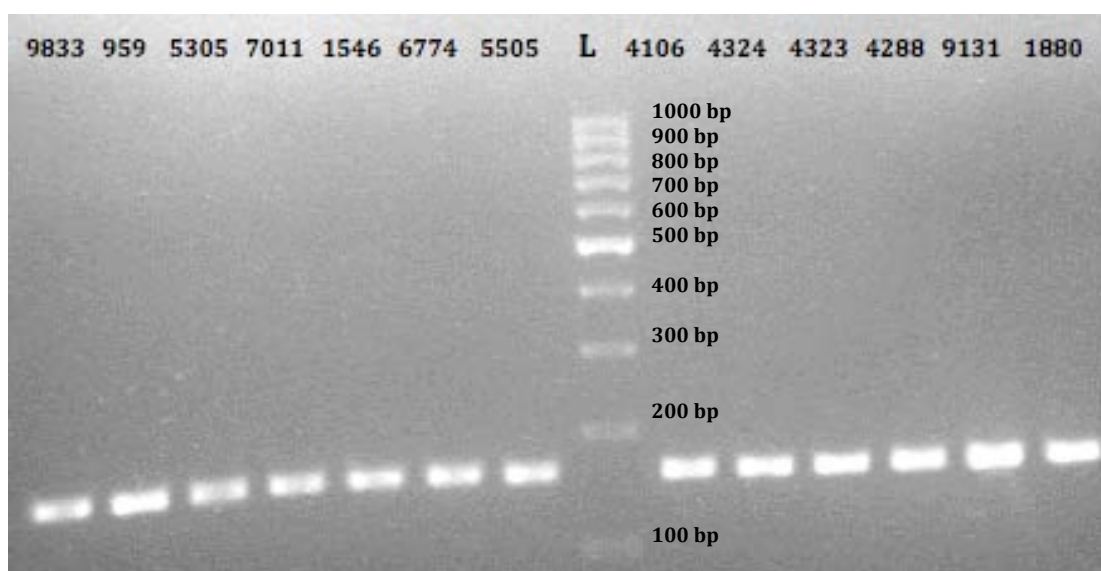
**Γ**



**Εικόνα 17.** Οι εικόνες Α, Β και Γ παρουσιάζουν τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των στελεχών *S. aureus*. L: ladder (Lambda DNA/Hind III, της Fermentas, με μοριακά μεγέθη 125-23130 bp).

### 3.3 Ενίσχυση με PCR του γονιδίου *mecA* και του γονιδίου της τοξίνης PVL των σταφυλοκόκκων

Ακολούθησε PCR για το γονίδιο *mecA* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *mecAP4/mecAP7* (προϊόν 162bp) (**εικόνα 18**), αλλά και για PVL χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *luk-PV-1/luk-PV-2* (προϊόν 433bp) (**εικόνα 19**). Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στην ανίχνευση του *mecA* γονιδίου με PCR και στην παραγωγή της PBP2a με φαινοτυπική δοκιμασία latex. Τριαντατέσσερα από αυτά ήταν PVL-θετικά και δεκατρία PVL-αρνητικά με PCR για τα γονίδια *lukPVL*. Στον παραπάνω **πίνακα 10** αναφέρονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα.



**Εικόνα 18.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *mecA* με PCR στα υπό μελέτη στελέχη. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης GeneRuler 100bp DNA Ladder (fermentas) με μοριακά μεγέθη 100-1000 bp



**Εικόνα 19.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου της τοξίνης PVL με PCR στα υπό μελέτη στελέχη. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης GeneRuler 100bp DNA Ladder (fermentas) με μοριακά μεγέθη 100-1000 bp

### 3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΩΤΑ 4 OS-MRSA ΣΤΕΛΕΧΗ

#### 3.4.1 Μικροβιακή ταυτοποίηση και έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Αρχικά, μελετήθηκαν περαιτέρω 4 στελέχη OS-MRSA. Οι MICs για την οξακιλλίνη για τα τέσσερα αυτά στελέχη (SA1306, SA1326, SA1552, SA4666) με E-test και τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ κυμαίνονται από 0.25 έως 1 mg/L. Επίσης, περιλήφθηκε σαν μάρτυρας και το στέλεχος SA6083, με MIC 6 mg/L. Δύο από τα τέσσερα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητα στην οξακιλλίνη με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 και δύο ως ανθεκτικά. Όλα αυτά τα στελέχη ήταν ευαίσθητα σε βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη, λινεζολίδη, και κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη. Δύο στελέχη ήταν επίσης ευαίσθητα σε κλινδαμυκίνη, ερυθρομυκίνη, και φουσιδικό οξύ και ένα ήταν επίσης ευαίσθητο στην τετρακυκλίνη. Επιπλέον, και τα τέσσερα στελέχη βρέθηκε με τη μέθοδο ταινιών Etest ότι είναι ευαίσθητα σε αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό, κεφαμανδόλη, κεφαλεξίνη, και ιμιπενέμη. Παράλληλα, όλα τα στελέχη ήταν θετικά στο Slidex MRSA latex test συγκόλλησης και στην PCR για το γονίδιο *mecA* με ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία με διάφορα MRSA στελέχη που έχουν προηγουμένως μελετηθεί συμπεριλαμβανομένου του στελέχους *S. aureus* COL.

### 3.4.2 Γενετική τυποποίηση

Τα τέσσερα αυτά στελέχη ανήκουν σε δύο διαφορετικούς γενότυπους (I και XII), από τους οποίους το πιο κοινό ηλεκτροφορητικό πρότυπο των στελεχών, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται και το στέλεχος SA6083, παρουσιάζει τρεις υποτύπους (Ia, Ib και Id) που διαφέρουν μεταξύ τους από μία έως δύο ζώνες (στέλεχος SA1306 τύπος Ib, στέλεχος SA1326 τύπος XII, στέλεχος SA1552 τύπος Id, στέλεχος SA4666 τύπος Ia, στέλεχος SA6083 τύπος Ib) (**πίνακας 10**). Τα αποτελέσματα τις μεθόδου MLST έδειξαν ότι όλα τα στελέχη ανήκουν στον ST-728 τύπο, με αλληλικό προφίλ 1-3-1-14-11-27-10, το οποίο έχει αλλήλιο διαφορετικό από τον τύπο ST-80. Τέλος, όλα τα στελέχη φέρουν τον *SCCmec* τύπο IV, όπως προέκυψε από τυποποίηση με PCR (**πίνακας 11**).

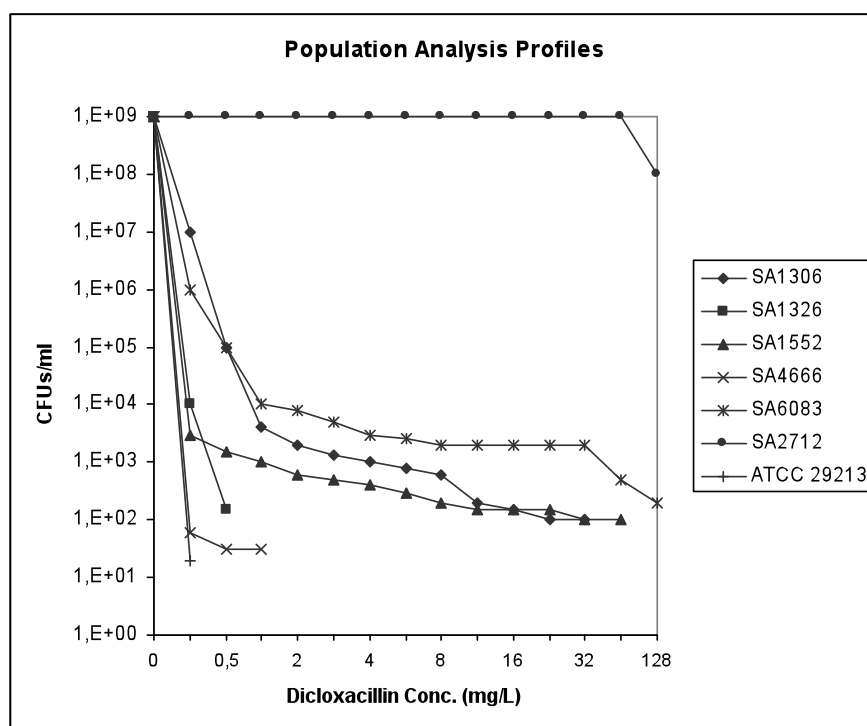
### 3.4.3 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis) και Μικροβιοκτόνες

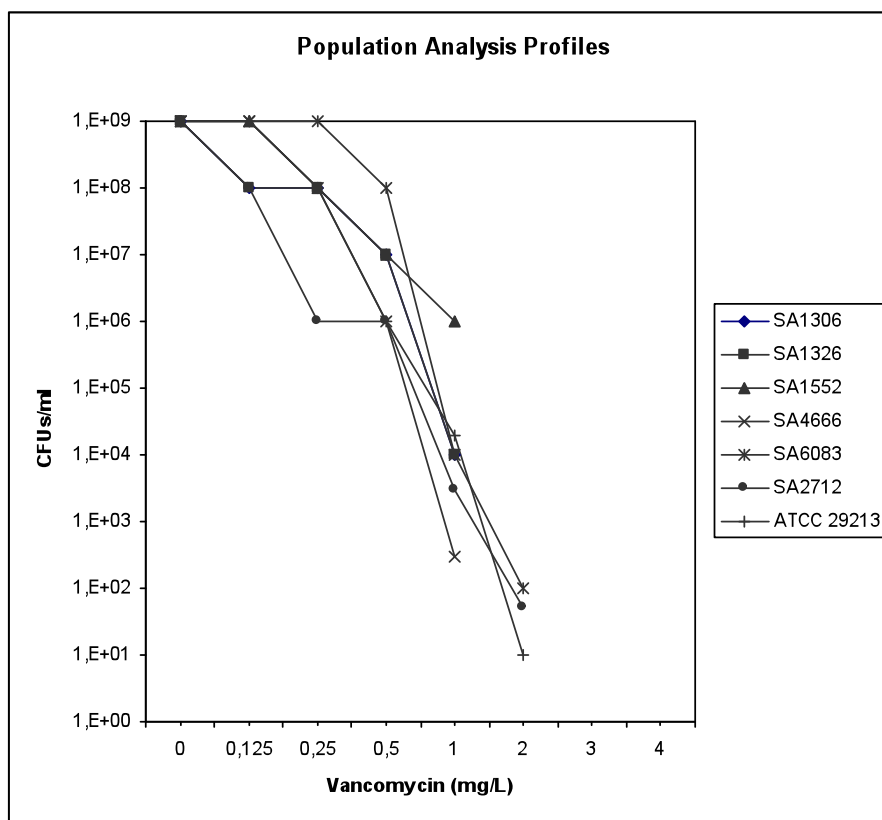
#### δοκιμασίες (Bactericidal Assays)

Ακολούθησε μελέτη των τεσσάρων αυτών στελεχών με τη μέθοδο της πληθυσμιακής ανάλυσης από την οποία προέκυψε ότι δύο από τα στελέχη (SA 1326 και SA 4666) είναι φαινοτυπικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη καθώς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οξακιλλίνης στις οποίες εμφανίστηκε μικροβιακή ανάπτυξη ήταν 0.5 και 1 mg/L, αντιστοίχως. Τα υπόλοιπα δύο στελέχη (SA 1306 και SA 1552) αναπτύχθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξακιλλίνης, 32 και 64 mg/L αντίστοιχα. Το στέλεχος SA 6083 που είναι μέτρια ανθεκτικό στην οξακιλλίνη και χρησιμοποιήθηκε ως control, αναπτύχθηκε και σε 64 mg/L συγκέντρωση οξακιλλίνης, ενώ το ανθεκτικό στέλεχος SA 2712, που χρησιμοποιήθηκε ως control στην πληθυσμιακή ανάλυση, η μικροβιακή του ανάπτυξη δεν επηρεάστηκε σε συγκέντρωση οξακιλλίνης μέχρι και 64 mg/L (**εικόνα 120Α**). Μετά από την προσθήκη 2% NaCl στο μέσο, τα στελέχη SA 1326 και SA 4666, τα οποία είναι ευαίσθητα στην οξακιλλίνη, αναπτύχθηκαν σε συγκεντρώσεις έως 1 και 2 mg/L, αντιστοίχως. Οι αποικίες αυτών που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση δικλοξακιλλίνης στην πληθυσμιακή ανάλυση ακόμη φέρουν και εκφράζουν το γονίδιο *mecA* σε όλα τα στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των μη ετερογενών στελεχών SA 1326 και SA 4666, υποδηλώνοντας έτσι τη σταθερότητα του γονότυπου *mecA*.

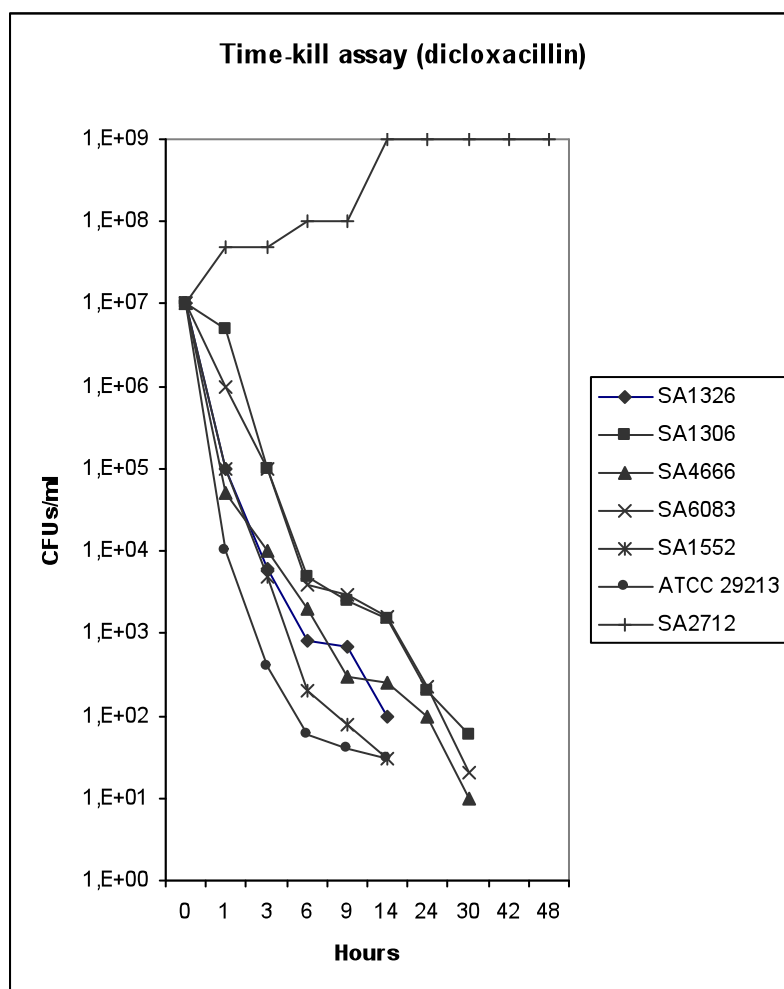
Οι μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (time-kill method) έδειξαν ότι στις 24 ώρες, η οξακιλλίνη είχε βακτηριοκτόνο δραστηριότητα για τα ευαίσθητα στην οξακιλλίνη στελέχη (SA 1306, SA 1326, SA 1552, SA 4666, και ATCC 29213) καθώς και για το μέτρια ανθεκτικό στην οξακιλλίνη στέλεχος, SA 6083, ενώ το υψηλού επιπέδου ανθεκτικό στην οξακιλλίνη στέλεχος ελέγχου, SA 2712, παρέμεινε ανεπηρέαστο (**εικόνα 21**). Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στις πληθυσμιακές αναλύσεις (**εικόνα 20B**), και οι καμπύλες που προέκυψαν από τις μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (time-kill assay) έδειξαν παρόμοια βακτηριοκτόνο δράση της βανκομυκίνης με εκείνη που έχει αναφερθεί προηγουμένως για τους MRSA που προέρχεται από την κοινότητα.

**Εικόνα 20Α.**



**Εικόνα 20B.**

**Εικόνα 20Α και 20B.** Προφίλ πληθυσμιακών αναλύσεων των υπό μελέτη στελεχών για δικλοξακιλλίνη (Α) και βανκομυκίνη (Β). Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή για τρεις επαναλήψεις.



**Εικόνα 21.** Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες με οξακιλλίνη των υπό μελέτη στελεχών. Πραγματοποιήθηκε σε ζωμό Mueller-Hinton με 20mg/L δικλοξακιλλίνης. Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή για τρεις επαναλήψεις.

### 3.4.4 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες

Οι δοκιμές αποτελεσματικότητας της οξακιλλίνης που πραγματοποιήθηκαν με πειραματικές λοιμώξεις επίμυων σε μηρό δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό μεταξύ των τεσσάρων *mecA*-θετικών, ευαίσθητων στην οξακιλλίνη απομονωμένων στελεχών και του *mecA*-αρνητικού και ευαίσθητου στην οξακιλλίνη ATCC 29213 (πίνακας 11). Για όλα τα τέσσερα υπό μελέτη στελέχη, ελήφθησαν στατιστικά σημαντικά λιγότερες αποικίες από τους επίμυες που υπέστησαν αγωγή με δικλοξακιλλίνη σε σχέση με του επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου χωρίς θεραπεία ( $P < 0,001$ ). Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από όλους τους μολυσμένους μηρούς επίσης φέρουν και εκφράζουν το γονίδιο *mecA* και είχαν προφίλ ευαισθησίας παρόμοια με εκείνα των αντίστοιχων κλινικών στελεχών.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη στελεχών και δεδομένα από πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες**

Isolate	ST type	SCCmec	Oxacillin agar dilution MIC (mg/L)	Highest oxacillin concentration (mg/L) of population analysis growth	LogCFU $\pm$ SD (%) per g thigh tissue in untreated controls	LogCFU $\pm$ SD (%) per g thigh tissue in treated animals (statistical significance with untreated controls)
1306	728	IV	0.5	32	6.55 (8.6)	4.71 (9.7) ( $P < 0.001$ )
1326	728	IV	0.25	0.5	6.6 (6.5)	4.50 (4.3) ( $P < 0.001$ )
1552	728	IV	1	64	6.25 (10.3)	3.75 (9.1) ( $P < 0.001$ )
4666	728	IV	1	1	6.53 (8.3)	3.72 (10.4) ( $P < 0.001$ )
6083	728	IV	6	128	7.45 (11.2)	5.02 (6.2) ( $P < 0.001$ )
2712	ND	ND	256	> 128	6.32 (3.6)	6.25 (8.8) (NS)
29213	ND	NA	0.125	0.5	6.70 (6.7)	1.18 (12.4) ( $P < 0.001$ )

ND, not determined

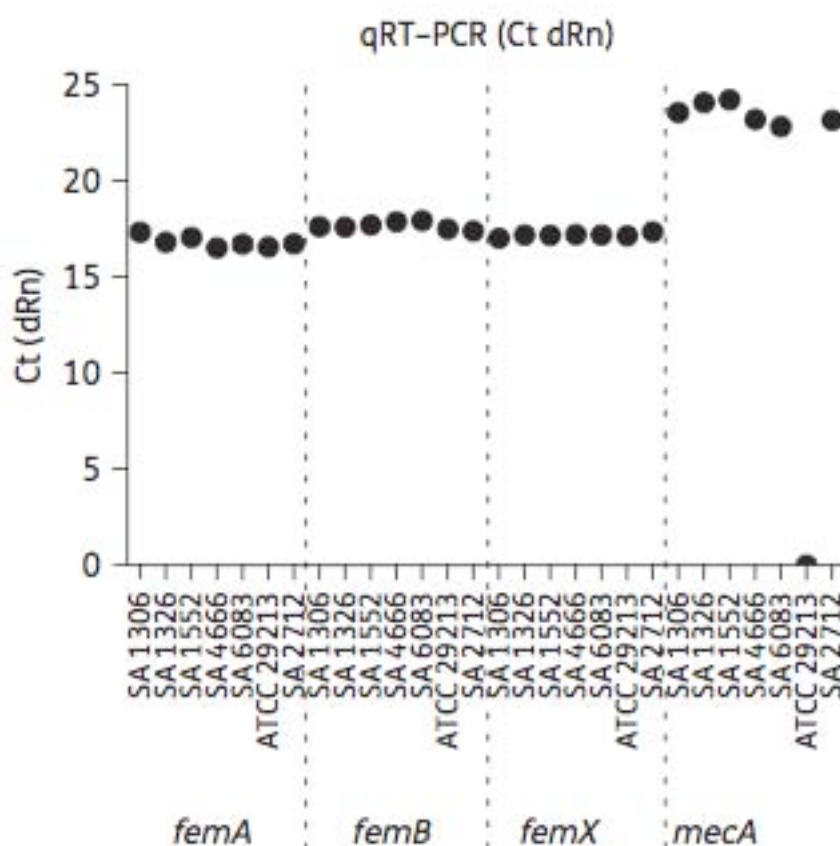
NS, not significant

NA, non applicable



### 3.4.5 qRT-PCR assays

Η qRT-PCR για το γονίδιο *mecA* έδειξε συγκρίσιμα επίπεδα έκφρασης στα τέσσερα OS-MRSA στελέχη καθώς και στα low- και high-level MRSA στελέχη ελέγχου. Επιπλέον, η qRT-PCR για την οικογένεια γονιδίων *fem* δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *femX*, *femA* και *femB* μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών και τα στελέχη ελέγχου (εικόνα 22). Οι καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves) και η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έδειξαν ένα ενιαίο προϊόν σε όλες τις περιπτώσεις (εικόνα 23). Επομένως, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των γέφυρων πενταγλυκίνης θα πρέπει να είναι παρόντα στα υπό μελέτη στελέχη.



**Εικόνα 22.** Αποτελέσματα της qRT-PCR για τα υπό μελέτη γονίδια. Φαίνεται το μέσο όριο κύκλου ( $C_t$  dRn;  $\pm SD$ ) για κάθε ένα από τα υπό μελέτη στελέχη. Δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για οποιοδήποτε από τα γονίδια.



**Εικόνα 23.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της qRT-PCR.

### 3.4.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων και alignments (αντιστοιχίσεις)

Τα PCR προϊόντα από όλα τα υπό μελέτη γονίδια των παραπάνω τεσσάρων OS-MRSA στελεχών και του ανθεκτικού στην οξακιλλίνη (χαμηλού επιπέδου) MRSA SA6083 κλωνοποιήθηκαν με τον φορέα pSC-A και αλληλουχήθηκαν. Το γονίδιο *mecA*, το οποίο έχει μελετηθεί στο παρελθόν, δεν είχε καμία μετάλλαξη. Αρκετές μεταλλάξεις για τα *femX*, *femA* και *femB* γονίδια εντοπίστηκαν, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γονίδια του MRSA252. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 23**, όταν πραγματοποιήσαμε πολλαπλές αντιστοιχίσεις, συσσωρεύθηκαν πολλές αντικαταστάσεις αμινοξέων για κάθε παράγοντα Fem. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί συνολικά ήταν οι εξής:

**FemX**, K32R, H11N, N18H, S184F, S263F και S305F;

**FemA**, N182T, D210N, A216T, E234D, E247V, K301R, Q346P, Y361F, I398F ή G, N402K και V415L; και

**FemB**, G191D, K221E, Y233C, G234K, L238I, N324Y, H344N, I388V και L410F.

Το στέλεχος SA 1326 που είναι λειτουργικά πλήρως ευαίσθητο στην οξακιλλίνη είχε 6 μεταλλάξεις για τον παράγοντα FemX, 6 για τον FemA και καμία για τον FemB (συνολικά 12) και το επίσης λειτουργικά ευαίσθητο στέλεχος SA 4666 είχε 6

μεταλλάξεις για τον παράγοντα FemX, 4 για τον FemA και 4 για τον FemB (συνολικά 14). Το ετεροανθεκτικό στέλεχος SA 1306 είχε 4 μεταλλάξεις για τον FemX, 1 για τον FemB και 5 για τον FemA (συνολικά 10) και τέλος, το στέλεχος SA 1552 είχε 4 μεταλλάξεις για τον FemX, 3 για τον FemA και 2 για τον FemB (συνολικά 9). Είναι ενδιαφέρον ότι, το ανθεκτικό στην οξακιλλίνη στέλεχος SA 6083 (χαμηλή αντοχή, MIC 6 mg/L), το οποίο ανήκει στον ίδιο ST τύπο, PFGE τύπο και SCCmec τύπο με τα υπό μελέτη στελέχη, είχε μόνο τρεις μεταλλάξεις (1 για τον FemX, 2 για τον FemA και καμία για τον FemB) (**εικόνα 24**). Αυτό παρέχει μία επιπλέον ένδειξη ότι οι μεταλλάξεις στους παράγοντες FemXAB είναι πιθανό ότι συμβάλλουν στη φαινοτυπική ευαισθησία των OS-MRSA.

Σύμφωνα με τους υπολογισμούς της απόστασης με το πρόγραμμα Mega για την πρωτεΐνη Fem, η μέγιστη απόσταση μεταξύ των ομόλογων των ανωτέρω διαθέσιμων γονιδιωμάτων MRSA είναι 0,007. Είναι ενδιαφέρον ότι οι FemX πρωτεΐνες των OS-MRSA (SA 1326 και SA 4666) παρουσιάζουν μια μέγιστη απόσταση 0.014, ενώ εκείνες των ετερογενών SA 1306 και SA 1552 μια απόσταση 0.010. Για την πρωτεΐνη FEMA, τα στελέχη SA 1326 και SA 4666 εμφανίζουν επίσης μια μέγιστη απόσταση 0.014 σε σύγκριση με τους αντίστοιχους παράγοντες από τα MRSA γονιδιώματα. Τέλος, οι FemB πρωτεΐνες παρουσιάζουν λιγότερες διαφορές και οι μέγιστες αποστάσεις, που παρουσιάζονται από τα στελέχη SA 1306 και SA 4666, είναι μικρές. Έτσι, από μια εξελικτική άποψη, φαίνεται ότι η αύξηση της ευαισθησίας των κλινικών στελεχών συσχετίζεται σταθερά με την αυξανόμενη απόσταση μεταξύ των μεταλλαγμένων παραγόντων Fem και των ομολόγων τους στα γνωστά γονιδιώματα MRSA.

**Εικόνα 24.** Πολλαπλή αντιστοίχιση των πρωτεϊνών FemA (a), FemB (b) και FemX(c) των υπό μελέτη OS-MRSA στελεχών και του *S. aureus* MRSA252.

(a)

FemA MRSA	MKFTNLTAKE FGAFDTSMPY SHFTQTVGHY ELKLAEGYET HLVGIKNNNN	[ 50]
FemA 1326	.....	[ 50]
FemA 4666	.....	[ 50]
FemA 1306	.....	[ 50]
FemA 1552	.....	[ 50]
FemA 6083	.....	[ 50]
FemA MRSA	EVIAACLLTA VPVMKVFKEYF YSNRGPVIDY ENQELVHFFF NELSKYVKKH	[100]
FemA 1326	.....	[100]
FemA 4666	.....	[100]
FemA 1306	.....	[100]
FemA 1552	.....	[100]
FemA 6083	.....	[100]

FemA	MRSA	RCLYLHIDPY	LPYQYLNHDG	EITGNAGNDW	FFDKMSNLGF	EHGTFHKGFD	[150]
FemA	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemA	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemA	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemA	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemA	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemA	MRSA	PVLQIRYHSV	LDLKDKTADD	IIKNMDGLRK	RNTKKVKKNG	VKVRYLSEEE	[200]
FemA	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemA	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemA	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemA	1552	.....	.....	.....	.T.....	.....	[200]
FemA	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemA	MRSA	LPIFRSFMED	TSESKAFADR	DDKFYNNRLK	YKERVVLVPL	AYINFDEYIK	[250]
FemA	1326	.....N	.....T....	.....	...D.....	.....V...	[250]
FemA	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FemA	1306	.....	.....	.....	...D.....	.....	[250]
FemA	1552	.....	.....	.....	...D.....	.....	[250]
FemA	6083	.....	.....	.....	...D.....	.....	[250]
FemA	MRSA	ELNEERDILN	KDLNKKALKDI	EKRPNKKAH	NKRDNLQQQL	DANEQKIEEG	[300]
FemA	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemA	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemA	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemA	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemA	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemA	MRSA	KRLQEEHGNE	LPISAGFFFI	NPFEVYYAG	GTSNAFRHFA	GSYAVQWEMI	[350]
FemA	1326	R.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemA	4666	.....	.....	.....	.....	.....P....	[350]
FemA	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemA	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemA	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemA	MRSA	NYALNHGIDR	YNFYGVSGKF	TEDAEDAGVV	KFKKGYNAEI	IEYVGDFIKP	[400]
FemA	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemA	4666	.....	F.....	.....	.....	.....F..	[400]
FemA	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemA	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemA	6083	.....	.....	.....	.....	.....G..	[400]
FemA	MRSA	INKPVYAAAT	ALKKVKDRIF	-----	--	[432]	
FemA	1326	.....	....L....	-----	--	[432]	
FemA	4666	.K.....	.....	-----	--	[432]	
FemA	1306	.....	.....	-----	--	[432]	
FemA	1552	.....	....L....	-----	--	[432]	
FemA	6083	.....	.....	-----	--	[432]	

(b)

FemB	MRSA252	MKFTTELTVTE	FDNFVQNPSL	ESHYFQVKEN	IVTRENDGFE	VLLGIKDDN	[ 50]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FemB	MRSA252	NKVIAASLFS	KIPTMGSYVY	YSNRGPVMDF	SDLGLVDYYL	KELDKYLQQH	[100]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FemB	MRSA252	QCLYVKLDPY	WLYHLYDKDI	VPFEGREKND	ALVNLFKSHG	YEHGFTTEY	[150]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[150]

FemB	MRSA252	DTSSQVRWMG	VLNLEGKTPE	TLKKTFDSQR	KRNINKAINY	GVKVRFLERD	[200]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	D.....	[200]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FemB	MRSA252	EFNLFLLDLYR	ETEERAGFVS	KTDDYFYNFI	DTYGDKVLVP	LAYIDLDEYV	[250]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....I..	[250]
FemB	1306	.....	.....	E.....	..CK.....	.....	[250]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FemB	MRSA252	LKLQQLNDK	ENRRDQMMAK	ENKSDKQMKK	IAELDKQIDH	DQHELLNASE	[300]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FemB	MRSA252	LSKTDGPILN	LASGVYFANA	YEVNYFSGGS	SEKYNQFMGP	YMMHWFMINY	[350]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemB	4666	.....	.....	...Y.....	.....	.....	[350]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	...N.....	[350]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FemB	MRSA252	CFDNGYDRYN	FYGLSGDFTE	NSEDYGVYRF	KRGFNVQIEE	LIGDFYKPIH	[400]
FemB	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemB	4666	.....	.....	.....	.....V..	.....	[400]
FemB	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemB	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemB	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FemB	MRSA252	KVKYWLFTTL	DKLRKKLKK	[419]			
FemB	1326	.....	.....	[419]			
FemB	4666	.....F.....	.....	[419]			
FemB	1306	.....F.....	.....	[419]			
FemB	1552	.....F.....	.....	[419]			
FemB	6083	.....	.....	[419]			

(c)

FEMX	MRSA252	MEKMHITNQE	HDAFVKSNPN	GDLLQLTKWA	ETKKLTGWYA	RRIAVGRDGE	[ 50]
FEMX	1326	.....	N.....H..	.....	.....	.....	[ 50]
FEMX	4666	.....	N.....H..	.....	.....	.....	[ 50]
FEMX	1306	..R.....	N.....H..	.....	.....	.....	[ 50]
FEMX	1552	.....	N.....H..	.....	.....	.....	[ 50]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[ 50]
FEMX	MRSA252	IQGVAQLLFK	KVPKLPYTLC	YISRGFVVDY	SNKEALNALL	DSAKEIAKAE	[100]
FEMX	1326	V.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FEMX	4666	V.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FEMX	1306	V.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FEMX	1552	V.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FEMX	6083	V.....	.....	.....	.....	.....	[100]
FEMX	MRSA252	KAYAIDPD	VEVDKGTDAL	QNLKALGFKH	KGFKEGLSKD	YIQPRMTMIT	[150]
FEMX	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FEMX	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FEMX	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[150]
FEMX	MRSA252	PIDKNDELL	NSFERRNSK	VRLALKRGTT	VERSDREGLK	TFAELMKITG	[200]
FEMX	1326	.....	.....	.....	...F.....	.....	[200]
FEMX	4666	.....	.....	.....	...F.....	.....	[200]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[200]
FEMX	1552	.....	.....	.....	...F.....	.....	[200]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[200]

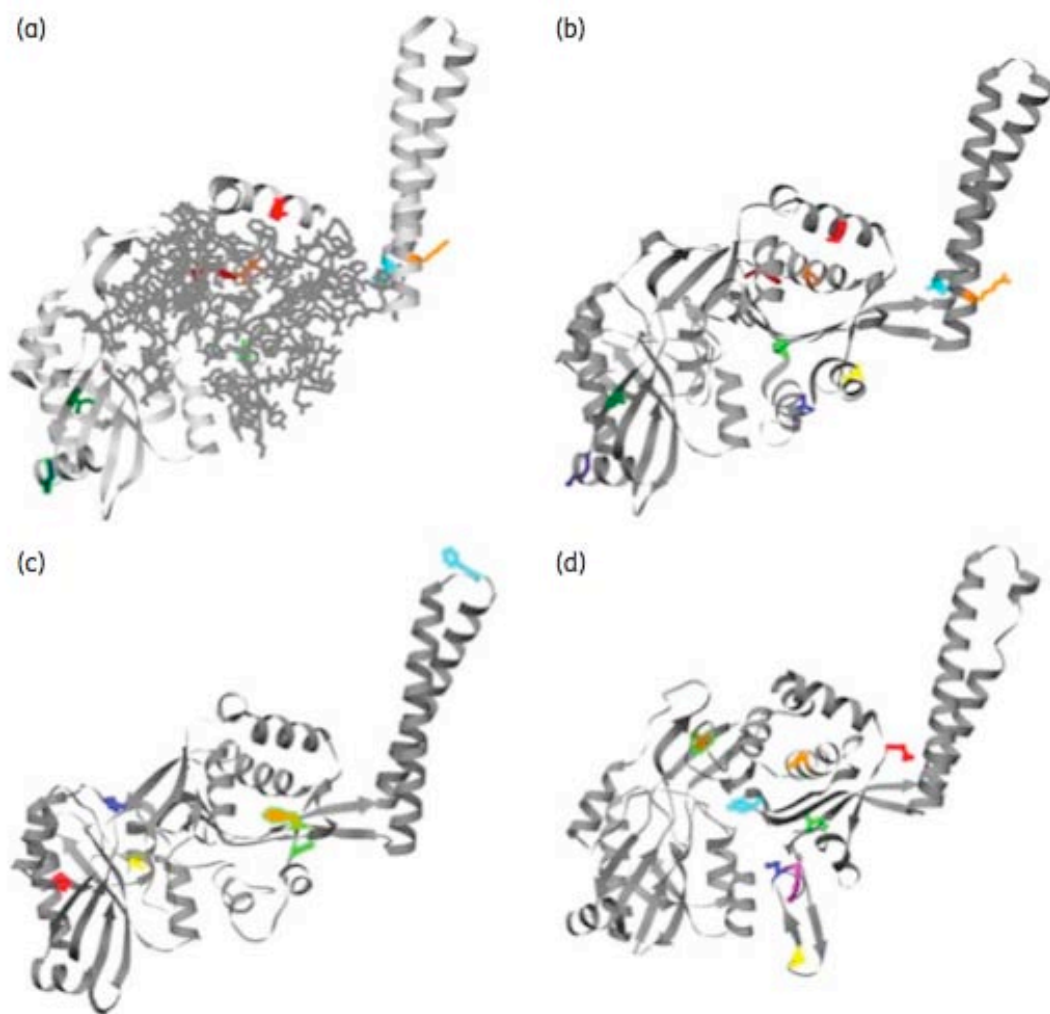
FEMX	MRSA252	ERDGFILTRDI	SYFENIYDAL	HEDGDAELFL	VKLDPKENIA	KVNQELNELH	[250]
FEMX	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FEMX	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FEMX	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[250]
FEMX	MRSA252	AEIAKWQQKM	ETSEKQAKKA	QNMINDAQNK	IAKNEDLKR	LEALEKEHPE	[300]
FEMX	1326	.....	..F.....	.....	.....	.....	[300]
FEMX	4666	.....	..F.....	.....	.....	.....	[300]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FEMX	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[300]
FEMX	MRSA252	GIYLSGALLM	FAGSKSYLY	GASSNEFRDF	LPNHMHQYTM	MKYAREHGAT	[350]
FEMX	1326	....F.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FEMX	4666	....F.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FEMX	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[350]
FEMX	MRSA252	TYDFGGTDND	PKDSEHYGL	WAFKKVWGTY	LSEKIGFDY	VLNQPLYQLI	[400]
FEMX	1326	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FEMX	4666	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FEMX	1306	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FEMX	1552	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FEMX	6083	.....	.....	.....	.....	.....	[400]
FEMX	MRSA252	EQVKPRLTKA	KIKISRKLKR	K			[421]
FEMX	1326	.....	.....	.			[421]
FEMX	4666	.....	.....	.			[421]
FEMX	1306	.....	.....	.			[421]
FEMX	1552	.....	.....	.			[421]
FEMX	6083	.....	.....	.			[421]

### 3.4.7 *In silico* ανάλυση της δομής των παραγόντων Fem

Λόγω της σημασίας των παραγόντων FemXAB για τη βιωσιμότητα των στελεχών και την ευαισθησία στην οξακιλλίνη, μελετήσαμε τη θέση των μεταλλάξεων στο δομικό επίπεδο, ώστε να προβλέψουμε αν θα μπορούσαν να παραβιάσουν τη δομή και τη λειτουργία των παραγόντων FemXAB στα στελέχη αυτά. Έτσι, πραγματοποιήσαμε *in silico* ανάλυση των τριών παραγόντων, σε σύγκριση με τις γνωστές κρυσταλλικές δομές του παράγοντα FemA των *S. aureus* για να αξιολογήσουμε την πιθανή επίδραση των μεταλλάξεων αυτών. Παράχθηκαν, με αλγόριθμους διαθέσιμους στον κυβερνοχώρο, μοντέλα με καλή συμφωνία με τα δομικά μοντέλα που έχουν προκύψει από κρυσταλλογραφικές μελέτες (εικόνα 25). Όλες οι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές, και από άλλα είδη μικροβίων, λήφθηκαν υπόψη σε σύγκριση με την ανάλυσή μας.

Τα μοντέλα που παρουσιάζονται στην **εικόνα 25**, δείχνουν ότι όλοι οι παράγοντες Fem στους *S. aureus* θα πρέπει να έχουν παρόμοια δομή, λόγω των υψηλά συντηρημένων πρωτογενών δομών. Όπως φαίνεται από τη σύγκριση των δομών των παραγόντων Fem των στελεχών μας με τη δομή του FemA των *S. aureus* (**εικόνα 25**), η πλειονότητα των μεταλλάξεων συσσωρεύονται στα κανάλια σχήματος L που βρίσκονται στον πυρήνα της πρωτεΐνης, ο οποίος περιέχει αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα Gly-tRNA<sup>Gly</sup> και δρουν ως δότες γλυκίνης κατά τη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης. Επίσης, μεταλλάξεις που βρίσκονται στην περιοχή υπερέλικας των πρωτεϊνών FemX και FemA μπορούν να βλάψουν το ρόλο της περιοχής αυτής στη σύνδεση και σταθεροποίηση των tRNA υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις αφορούν σημαντικές αλλαγές αμινοξέων, όπως οι S184F, S263F και S305F στον FemX. Λόγω των σημαντικών αλλαγών αμινοξέων σε σημεία που επηρεάζουν άμεσα των ικανότητα των παραγόντων Fem να αναγνωρίζουν και να συνδέουν τη λιπιδική αλυσίδα, είναι πιθανό η συσώρευση τους να παραβλάπτει των ομαλή σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και να συμβάλλει στην ευαισθησία των στελεχών αυτών στην οξακιλλίνη, παρότι φέρουν και εκφράζουν κανονικά το γονίδιο *mecA*.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι τόσο τα στελέχη OS-MRSA με χαμηλή και υψηλή αντοχή στην οξακιλλίνη είχαν παρόμοιους ρυθμούς ανάπτυξης, κάτι που δείχνει ότι οι μεταλλάξεις στους παράγοντες FemXAB δεν επηρέασαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των στελεχών.



**Εικόνα 25.** (α) Τριτοταγής δομή του FemA των *S. aureus* (1lrz, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Τα έγχρωμα αμινοξέα αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένες θέσεις του FemA των κλινικών στελεχών (182N, κόκκινο; 234D, πράσινο; 247E, κυανό; 301K, πορτοκαλί; 346Q, σιένα; 361Y, σκούρο κόκκινο; 398I, σκούρο πράσινο; και 402N, σκούρο μπλε). Τριτοταγείς δομές των FemA (b), FemB (c) και FemX (d). Όλες οι μεταλλάξεις έχουν επισημανθεί σε σχέση τους παράγοντες FemXAB του MRSA252. Τα έγχρωμα αμινοξέα αντιστοιχούν στις εξής θέσεις [(b): 182T, κόκκινο; 210N, κίτρινο; 216T, μπλε; 234D, πράσινο; 247V, κυανό; 301R, πορτοκαλί; 346P, σιένα; 361F, dark red; 398F, σκούρο πράσινο; and 402K, σκούρο μπλε. (c): 191D, κόκκινο; 221E, κίτρινο; 233C, μπλε; 234K, μωβ; 238I, πράσινο; 324Y, κυανό; 344N, πορτοκαλί; and 388V, σιένα. (d): 3R, κόκκινο; 11N, κίτρινο; 18H, μπλε; 184F, πράσινο; 263F, κυανό; and 305F, πορτοκαλί].



### 3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ 15 OS-MRSA ΣΤΕΛΕΧΗ

#### 3.5.1 Μικροβιακή ταυτοποίηση και έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Δεκαπέντε επιπλέον ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στελέχη OS-MRSA (με MICs για την οξακιλλίνη και τη βανκομυκίνη  $\leq 1$  mg/L) μελετήθηκαν μετέπειτα με πληθυσμιακή ανάλυση (PAs), μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (bactericidal assays) και πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες, ώστε να προσδιοριστεί ο φαινότυπος αντοχής τους και η θεραπευτική ανταπόκριση στην οξακιλλίνη και στην βανκομυκίνη. Τα στελέχη αυτά έχουν αρχικά χαρακτηριστεί ως ευαίσθητα με το σύστημα VITEK2. Όλα τα στελέχη φέρουν το γονίδιο *mecA* και παράγουν την PBP2a. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213 που δεν φέρει το γονίδιο *mecA* και ένα στέλεχος *S. aureus* που φέρει το γονίδιο *mecA* και έχει υψηλή αντοχή στην οξακιλλίνη. Στα στελέχη αυτά βρέθηκε, με E-test και μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ, ότι οι MICs για οξακιλλίνη κυμαίνονται από 0.25 έως 1  $\mu\text{g/ml}$  και αντιστοίχως για τη βανκομυκίνη  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ . Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στην ανίχνευση του *mecA* γονιδίου με PCR και στην παραγωγή της PBP2a με φαινοτυπική δοκιμασία latex. Δεκατέσσερα από αυτά ήταν PVL-θετικά και ένα PVL-αρνητικό με PCR για τα γονίδια *lukPVL*. Συνοπτικά, στον **πίνακα 12** παρουσιάζονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των 15 OS-MRSA.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ 15 OS-MRSA**

Isolate	PVL	MLST type	PFGE type	OXA MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	VAN MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
446	+	80	Ia	0.5	0.5
959	+	80	Ia	0.25	2
970	+	728	Ib	0.25	1
1117	+	80	Ib	0.5	1
1512	+	30	Ic	0.25	1
1546	+	80	Ic	0.25	1
2629	+	80	Ib	0.25	1
4324	+	80	Ib	0.25	1
5014	—	80	II	0.5	1
5505	+	80	Ib	1	1
6036	+	80	Ia	0.5	1
6601	+	80	Ib	0.25	1
7059	+	80	Ib	0.25	1
9131	+	80	Ib	0.25	1
9833	+	80	Ib	0.5	1
ATCC 29213	—	ND	III	0.25	1
7263	+	ND	IV	256	1

<sup>a</sup> OXA, oxacillin; VAN, vancomycin; ND, not determined.

### 3.5.2 Γενετική τυποποίηση των 15 OS-MRSA

Επίσης, τα στελέχη τυποποιήθηκαν γενετικά με τις μεθόδους PFGE και MLST. Προσδιορίστηκαν δύο διαφορετικοί PFGE τύποι με τον επικρατέστερο τύπο δηλαδή το πιο κοινό ηλεκτροφορητικό πρότυπο των στελεχών να περιλαμβάνει τα 14 από τα απομονωμένα στελέχη και παρουσιάζει τρεις υποτύπους που διαφέρουν μεταξύ τους από μία έως δύο ζώνες. Δεκατρία στελέχη ανήκαν στον τύπο ST-80, ένα στον ST-728 και ένα στον ST-30. Συνοπτικά τα χαρακτηριστικά των 15 στελεχών παρουσιάζονται στον παραπάνω **πίνακα 12**.

#### 3.5.2.1 Αναλυτικά αποτελέσματα MLST τυποποίησης

**Πρότυπες αλληλουχίες για κάθε αλληλίο, από τη βάση δεδομένων του MLST:**

**arc:** 456 bp (carbamate kinase)

TTATTAATCCAACAAGCTAAATCGAACAGTGACACAACGCCGCAATGCCATTGGATACTTGTGGTGCAATGTC  
ACAGGGTATGATAGGCTATTGGTTGGAACTGAAATCAATCGCATTTTAACTGAAATGAATAGTGATAGAACTG  
TAGGCACAATCGTTACACGTGTGGAAGTAGATAAAGATGATCCACGATTCAATAACCCAACCAACCAATTGGT  
CCTTTTATACGAAAGAAGAAGTTGAAGAATTACAAAAAGAACAGCCAGACTCAGTCTTTAAAGAAGATGCAG  
GACGTGGTTATAGAAAAGTAGTTGCGTCACCACTACCTCAATCTATACTAGAACACCAGTTAATTCGAACTTTAG  
CAGACGGTAAAAATATTGTCATTGCATGCGGTGGTGGCGGTATTCCAGTTATAAAAAAAGAAAATACCTATGA  
AGGTGTTGAAGCG

**aro:** 456 bp (shikimate dehydrogenase)

AATTTTAATTCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAAG  
AAATTATTTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAG  
ATCATGTTGATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGG  
GTATAATACAGATGGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTT  
AATTTTGGGCGCAGGTGGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAAATTTGTAAAGCCCAAATTAAGTG  
TTGCGAATAGAACGATGGCTCGTTTTGAATCTTGGAATTTAAATATAAACCAAAATTCATTAGCAGATGCTGAAA  
AGTATTTA

**glp:** 465 bp (glycerol kinase)

GGTGCTGATTGGATTGTCATCACAGCTGGATGGGGATTAGCGGTACAATGGGTGTGTTTGTCTGCGGTCAATT  
CTCAGGTGCACATTTAAACCCAGCGGTGTCTTTAGCTCTTGCATTAGACGGAAGTTTTGATTGGTCATTAGTTCC  
TGGTTATATTGTTGCTCAAATGTTAGGTGCAATTGTCGGAGCAACAATTGTATGGTTAATGTACTTGCCACATTG  
GAAAGCGACAGAAGAAGCTGGCGCGAAATTAGGTGTTTTCTCTACAGCACCGGCTATTAAGAATTACTTTGCCA  
ACTTTTAAAGTGAGATTATCGGAACAATGGCATTAACTTTAGGTATTTTATTTATCGGTGTAAACAAAATTGCCG  
ATGGTTTAAATCCTTTAATTGTCGGAGCATTAATTGTTGCAATCGGATTAAGTTTAGGCGGTGCTACTGGTTATG  
CAATCAACCCAGCACGT

**gmk:** 429 bp (guanylate kinase)

CGAATATTTGAAGATCCAAGTACATCATATAAGTATTCTATTTCAATGACAACACGTCAAATGCGTGAAGGTGA  
 AGTTGATGGCGTAGATTACTTTTTTAAACTAGGGATGCGTTTGAAGCTTAAATCAAAGATGACCAATTTATAGA  
 ATATGCTGAATATGTAGGCAACTATTATGGTACACCAGTTCAATATGTTAAAGATACAATGGACGAAGGTCATG  
 ATGTATTTTTAGAAATTGAAGTAGAAGGTGCAAAGCAAGTTAGAAAGAAATTTCCAGATGCGCTATTTATTTCT  
 TAGCACCTCCAAGTTTAGAACACTTGAGAGAGCGATTAGTAGGTAGAGGAACAGAATCTGATGAGAAAATACA  
 AAGTCGTATTAACGAAGCGCGTAAAGAAGTTGAAATGATGAATTTATACGATTACGTT

**pta:** 474 bp (phosphate acetyltransferase)

GCAACACAATTACAAGCAACAGATTATGTTACACCAATCGTGTTAGGTGATGAGACTAAGGTTCAATCTTTAGC  
 GCAAAAACCTTGATCTTGATATTTCTAATATTGAATTAATTAATCCTGCGACAAGTGAATTGAAAGCTGAATTAGT  
 TCAATCATTTGTTGAACGACGTAAAGGTAAAGCGACTGAAGAACAAGCACAAGAATTATTAACAATGTGAAC  
 ACTTCGGTACAATGCTTGTATGCTGGTAAAGCAGATGGTTTAGTTAGTGGTGCAGCACATTCAACAGGAGAC  
 ACTGTGCGTCCAGCTTTACAAATCATCAAAACGAAACCAGGTGTATCAAGAACATCAGGTATCTTCTTTATGATT  
 AAAGGTGATGTACAATACATCTTTGGTGATTGTGCAATCAATCCAGAAGTTGATTCACAAGGACTTGCAGAAAT  
 TGCAGTAGAAAGTGCAAAATCAGCATT

**tpi:** 402 bp (triosephosphate isomerase)

CACGAAACAGATGAAGAAATTAACAAAAAGCGCACGCTATTTTCAAACATGGAATGACTCCAATTATTTGTGT  
 TGGTGAAACAGACGAAGAGCGTGAAGGTGTTAAAGCTAACGATGTTGTAGGTGAGCAAGTTAAGAAAGCTGT  
 TGCAGGTTTATCTGAAGATCAACTTAAATCAGTTGTAATTGCTTATGAGCCAATCTGGGCAATCGGAAGTGGTA  
 AATCATCAACATCTGAAGATGCAAATGAAATGTGTGCATTGTACGTCAAACATTTGCTGACTTATCAAGCAAA  
 GAAGTATCAGAAGCAACTCGTATTCAATATGGTGGTAGTGTTAAACCTAACAAACATTAAAGAATACATGGCACA  
 AACTGATATTGATGGGGCATTAGTAGGTGGCGCA

**yqiL:** 516 bp (acetyl coenzyme A acetyltransferase)

GCGTTTAAAGACGTGCCAGCCTATGATTTAGGTGCGACTTAAATAGAACATATTATTAAGAGACGGGTTTGAA  
 TCCAAGTGAGATTGATGAAGTTATCATCGGTAACGTACTACAAGCAGGACAAGGACAAAATCCAGCACGAATT  
 GCTGCTATGAAAGGTGGCTTGCCAGAAACAGTACCTGCATTTACAGTGAATAAAGTATGTGGTTCTGGGTAA  
 GTCGATTCAATTAGCATATCAATCTATTGTGACTGGTGAAGTATGACATCGTGCTAGCTGGCGGTATGGAGAATA  
 TGTCTCAGTCACCAATGCTTGTCAACAACAGTCGCTTCGGTTTTAAATGGGACATCAATCAATGGTTGATAGCA  
 TGGTATATGATGGTTTAAACAGATGTATTTAATCAATATCATATGGGTATTACTGCTGAAAATTTAGTGGAGCAAT  
 ATGGTATTTCAAGAGAAGAACAAGATACATTTGCTGTAAACTCACAAACAAAAGCAGTACGTGCACAGCAA

**Εικόνα 26.** Αλληλγία των 15 υπό μελέτη στελεχών *OS-MRSA* μετά από την αλληλούχηση:Στέλεχος 959 (*ST* τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

Στέλεχος 970 (*ST* τύπος 728):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	27
yqil	10

Στέλεχος 1512 (*ST* τύπος 30):

arcc	2
aroe	2
glpf	2
gmk_	2
pta_	6
tpi_	3
yqil	2

Στέλεχος 1546 (*ST* τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 6036 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	Please enter a sequence

## Στέλεχος 6601 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 446 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 7985 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 1117 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 2629 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 4324 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 5505 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 7059 (ST τύπος 80):

arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 9131 (ST τύπος 80):

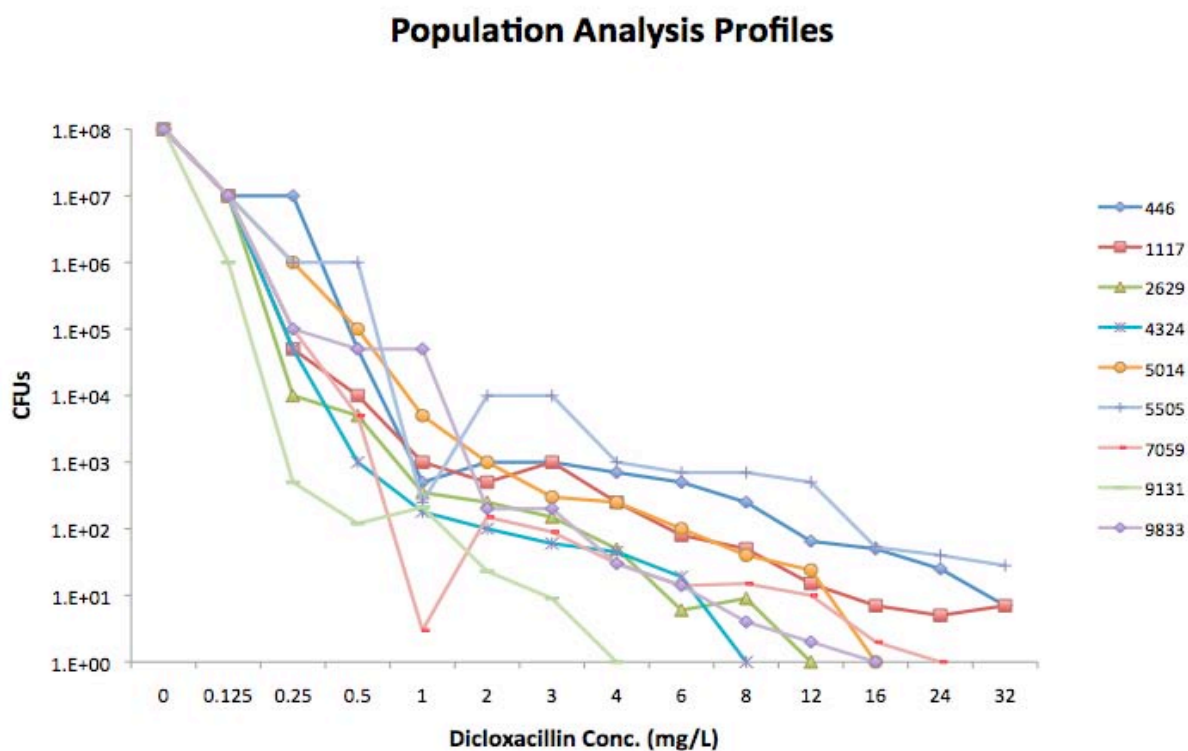
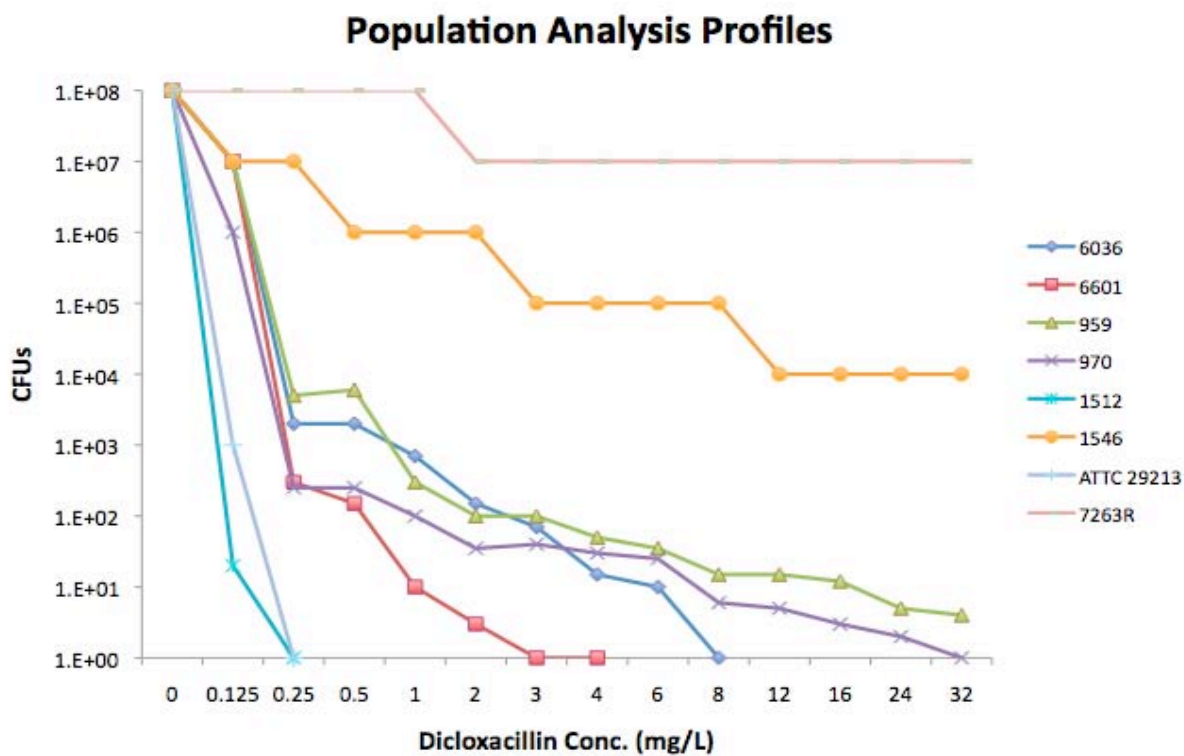
arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

## Στέλεχος 9833 (ST τύπος 80):

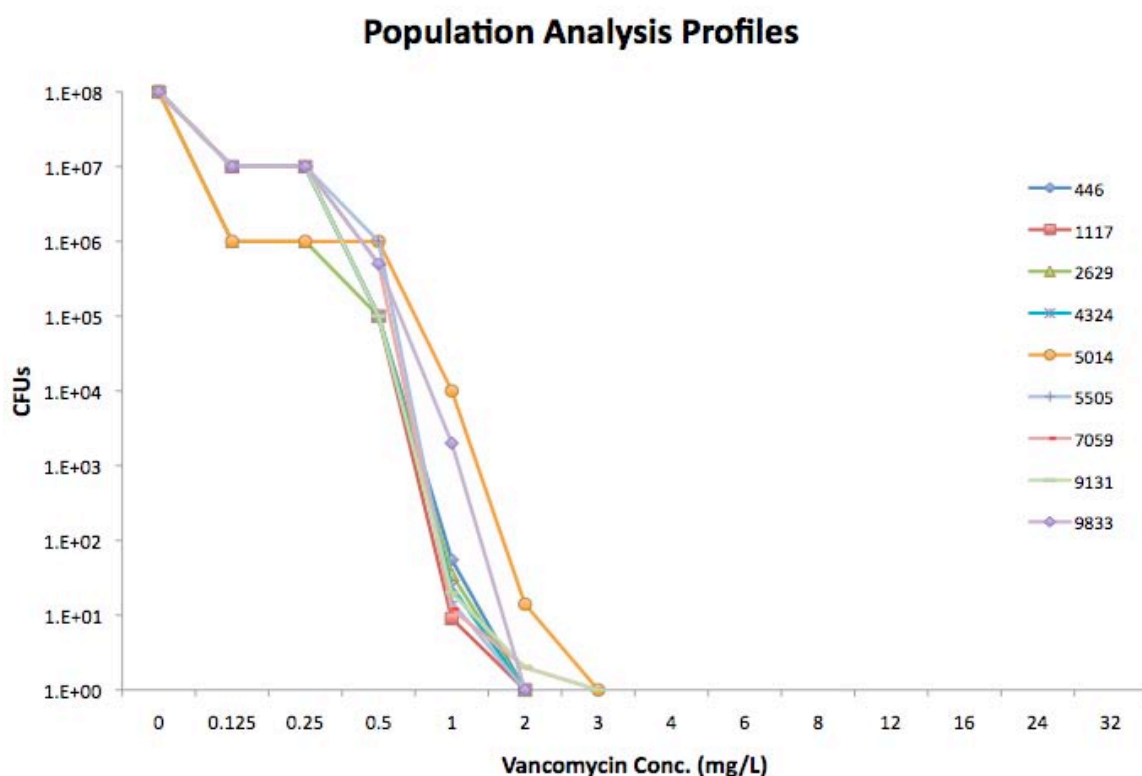
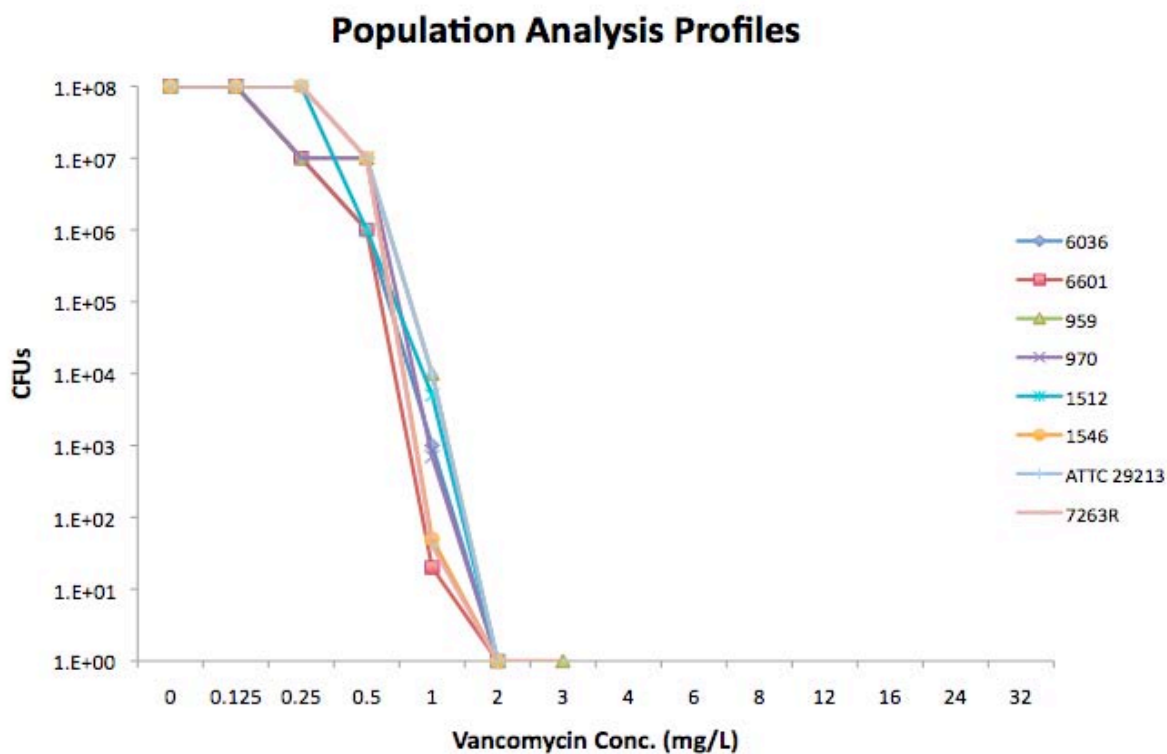
arcc	1
aroe	3
glpf	1
gmk_	14
pta_	11
tpi_	51
yqil	10

### 3.5.3 Πληθυσμιακή ανάλυση (Population Analysis) και Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays)

Στην πληθυσμιακή ανάλυση έξι στελέχη OS-MRSA αναπτύχθηκαν μέχρι 8 mg/L συγκέντρωσης οξακιλλίνης ενώ τα υπόλοιπα 9 αναπτύχθηκαν σε συγκεντρώσεις από 12 έως >32 mg/L, ενώ όλα τα στελέχη ήταν σαφώς ευαίσθητα στην βανκομυκίνη καθώς αναπτύχθηκαν μέχρι 2 mg/L συγκέντρωσης βανκομυκίνης. Τα αποτελέσματα από τις πληθυσμιακές αναλύσεις παρουσιάζονται στην **εικόνα 27**.

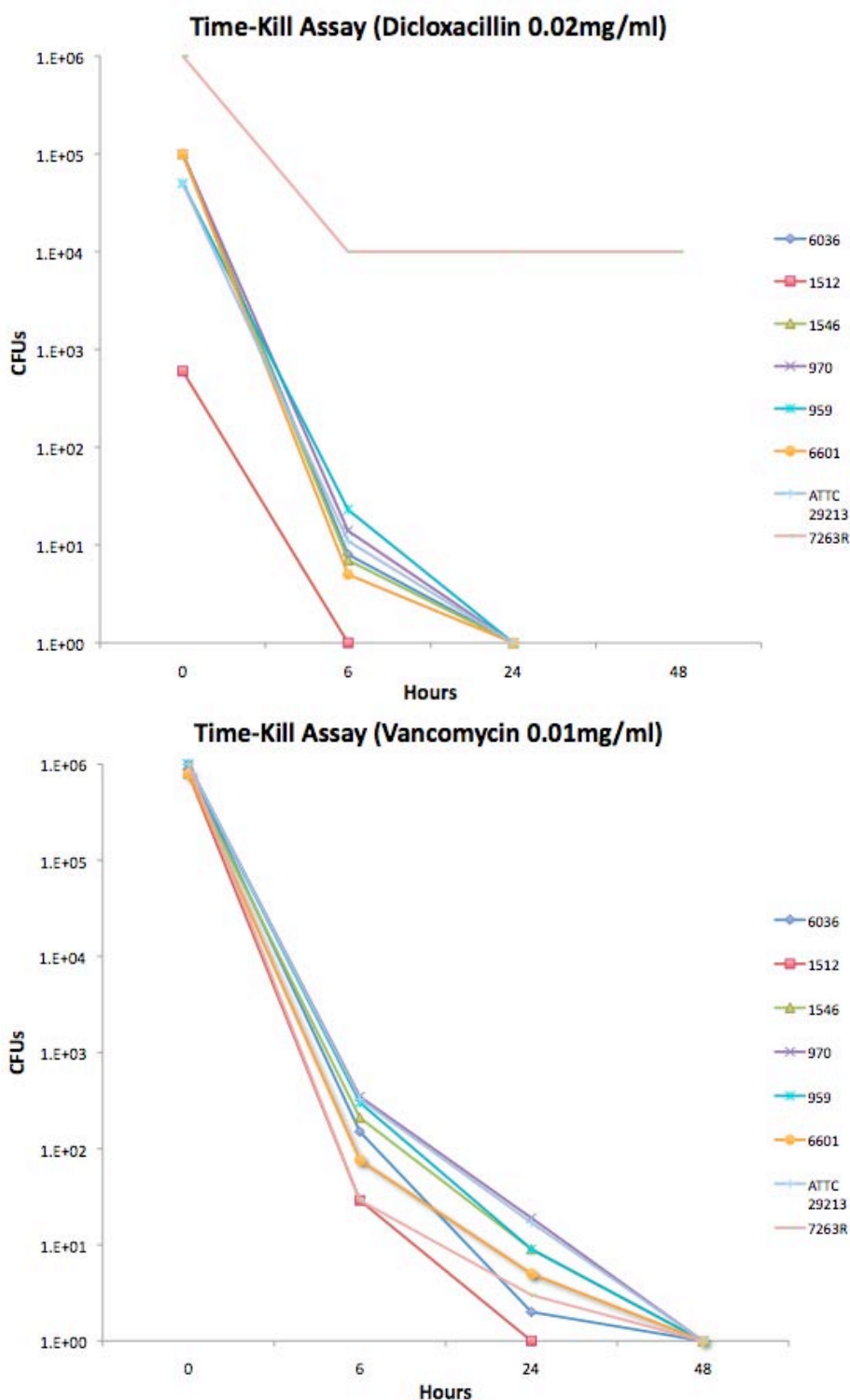


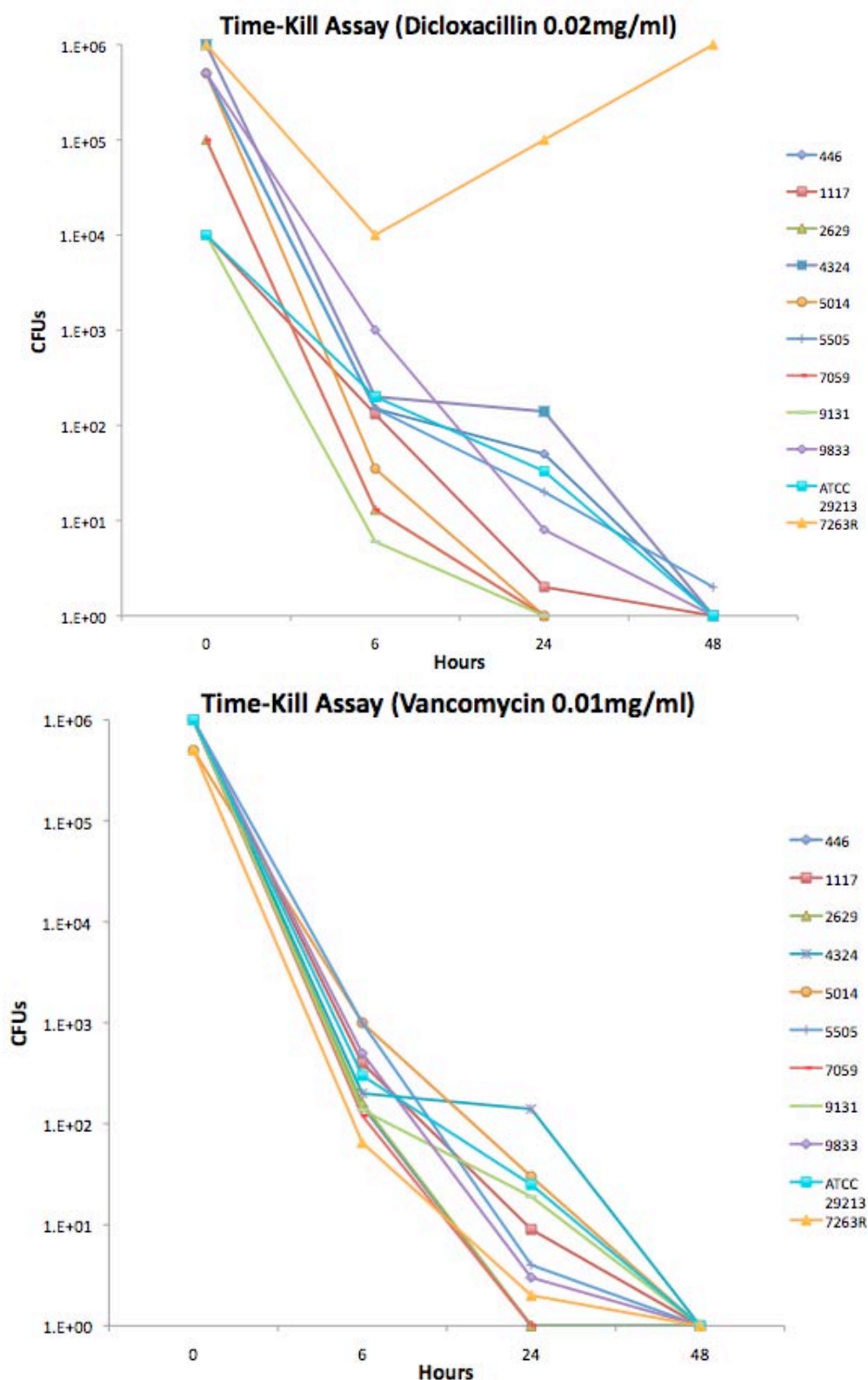




**Εικόνα 27.** Δοκιμασίες πληθυσμιακής ανάλυσης για 15 OS-MRSA υπό μελέτη στελέχη και τα στελέχη ελέγχου (ATCC29213 και SA7263R) χρησιμοποιώντας τα αντιβιοτικά δικλοξακιλλίνη και βανκομυκίνη

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μικροβιοκτόνες δοκιμασίες σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill assays). Σε δέκα OS-MRSA στελέχη παρατηρήθηκε μικροβιοκτόνος δράση της δικλοξακιλλίνης στις 6-24 ώρες, ενώ τα υπόλοιπα πέντε στελέχη θανατώθηκαν μετά από 24-48 ώρες. Η βανκομυκίνη επέδειξε αργή *in vitro* μικροβιοκτόνο δράση καθώς τα περισσότερα στελέχη θανατώθηκαν μετά από 24-48 ώρες (εικόνα 28).





**Εικόνα 28.** Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες για 15 OS-MRSA υπό μελέτη στελέχη και τα στελέχη ελέγχου (ATCC29213 και SA7263R) χρησιμοποιώντας τα αντιβιοτικά δικλοξακιλλίνη και βανκομυκίνη

Πιο συγκεκριμένα, η κινητική των μικροβιοκτόνων δοκιμασιών έδειξε μια μείωση  $\geq 3 \log_{10}$  των αποικιών ανά ml, υποδεικνύοντας την αποτελεσματική βακτηριοκτόνο δράση της δικλοξακιλλίνης και της βανκομυκίνης σε 24 ώρες για όλα τα OS-MRSA στελέχη (**πίνακας 13**). Σε 10 στελέχη, η βακτηριοκτόνος δράση της δικλοξακιλλίνης μετά από 6 ώρες επώασης ήταν υψηλότερη από εκείνη της βανκομυκίνης. Συνολικά, η βανκομυκίνη παρουσίασε χαμηλή μικροβιοκτόνο δράση, θανατώνοντας τους περισσότερους βακτηριακούς πληθυσμούς μεταξύ 24 και 48 ωρών, σε σύγκριση με τη δικλοξακιλλίνη η οποία θανάτωσε τους περισσότερους πληθυσμούς στις 6 έως 24 ώρες για 10 στελέχη και μεταξύ 24 και 48 ωρών τα υπόλοιπα 5 στελέχη. Το *mecA*-αρνητικό στέλεχος ελέγχου ATCC29213 θανατώθηκε γρήγορα, και το ισχυρά ανθεκτικό MRSA στέλεχος ελέγχου 7263R παρέμεινε ανεπηρέαστο από την παρουσία της δικλοξακιλλίνης. Στγκεντρωτικά τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον παρακάτω **πίνακα 13**.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 13. ΛΟΓΑΡΙΘΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΤΟΝΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ**

Isolate	$\Delta \log_{10}$ CFU reduction at:			
	6h in dicloxacillin time-kill assays	24h in dicloxacillin time-kill assays	6h in vancomycin time-kill assays	24h in vancomycin time-kill assays
446	3.8	4.2	3.8	5.8
959	4.6	5.8	3.5	5.1
970	4.9	5.9	3.5	4.7
1117	2.4	4.4	3.4	4.9
1512	5.4	5.4	4.4	5.9
1546	5	5.8	3.6	5.0
2629	4.9	6	3.8	6
4324	3.6	4.7	3.7	3.8
5014	4.2	5.7	2.7	4.2
5505	3.6	4.4	3	5.4
6036	5.1	6	3.8	5.8
6601	5	5.4	4	5.2
7059	4.9	5.0	3.9	6
9131	3.5	4.3	3.9	4.7
9833	2.7	4.8	3.3	5.5
ATCC 29213	5	6	3.5	6
7263	2	2	4.5	5.8

### 3.5.4 Πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες. Πραγματοποιήθηκε συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ώστε να μελετηθεί η *in vivo* δράση της οξακιλλίνης παράλληλα με την βανκομυκίνη. Παρατηρήθηκε ότι η θεραπευτική ικανότητα της οξακιλλίνης, που αντικατοπτρίζεται σε αποικίες στελεχών που επιβιώνουν υπό θεραπεία, σε σύγκριση με controls χωρίς θεραπεία, ήταν σημαντική στα 10 από τα 15 OS-MRSA στελέχη ( $P < 0.05$ ), ενώ η θεραπευτική ικανότητα της βανκομυκίνης, σε σύγκριση με controls χωρίς θεραπεία, ήταν αποτελεσματική για τα 12 στελέχη. Είναι ενδιαφέρον ότι, λοιμώξεις με 3 OS-MRSA στελέχη, στις οποίες η βανκομυκίνη δεν ήταν αποτελεσματική, η θεραπευτική ικανότητα της δικλοξακιλλίνης ήταν σημαντική. Επίσης, η θεραπευτική ικανότητα της οξακιλλίνης ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της βανκομυκίνης για 8 από τα στελέχη. Συμπερασματικά, η θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με δικλοξακιλλίνη σε ένα σημαντικό μέρος των OS-MRSA στελεχών ενδέχεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα (πίνακας 14) υποδεικνύουν ότι κάποια από αυτά τα στελέχη πιθανόν απαντούν στην οξακιλλίνη με τρόπο συγκρίσιμο με τη βανκομυκίνη και πιθανώς να έχουν σημαντικές θεραπευτικές εφαρμογές επί λοιμώξεων από στελέχη OS-MRSA, που θα μπορούσαν ίσως να αντιμετωπιστούν με β-λακτάμες. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από τους επιμολυσμένους μηρούς μελετήθηκαν εκ νέου και βρέθηκε ότι φέρουν και εκφράζουν το *mecA* γονίδιο.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Θεραπευτική ικανότητα δικλοξακιλλίνης και βανκομυκίνης**

Isolate	Avg log CFU $\pm$ SD per thigh muscle in untreated controls	Avg log CFU $\pm$ SD per thigh muscle in DCX treatment	DCX treatment efficiency ( <i>P</i> value)	Avg log CFU $\pm$ SD per thigh muscle in VAN treatment	VAN treatment efficiency ( <i>P</i> value)	DCX vs VAN activity in mouse thigh infections ( <i>P</i> value)
446	7.6 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.4	0.016	6.3 $\pm$ 0.4	0.058	0.776
959	7.6 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 1.9	0.502	3.6 $\pm$ 1.8	0.011	0.009
970	8.7 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.6	0.037	5.8 $\pm$ 1.9	0.021	0.815
1117	7.9 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.4	0.062	6.3 $\pm$ 0.4	0.003	0.157
1512	8.7 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.6	0.034	4.3 $\pm$ 0.4	0.007	0.007
1546	8.9 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.8	0.208	3.9 $\pm$ 0.5	0.006	0.009
2629	8.3 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 1.1	0.058	3.4 $\pm$ 0.4	<0.001	0.015
4324	8.8 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.01	0.001	3.6 $\pm$ 0.4	<0.001	0.078
5014	7.2 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.8	0.488	4.0 $\pm$ 0.5	0.001	0.023
5505	7.7 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 1.1	0.04	3.5 $\pm$ 1.1	<0.001	0.981
6036	8.8 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.3	0.033	5.7 $\pm$ 0.3	0.025	0.014
6601	8.8 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.3	0.015	4.2 $\pm$ 0.8	0.003	0.005
7059	8.9 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 1.9	0.026	3.2 $\pm$ 0.3	<0.001	0.208
9131	8.7 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.4	0.001	3.3 $\pm$ 0.4	<0.001	0.273
9833	8.9 $\pm$ 0.2	6.2 $\pm$ 1.4	0.035	5.1 $\pm$ 1.6	0.020	0.476
ATCC 29213	8.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.6	0.001	3.8 $\pm$ 0.5	<0.001	0.771
7263	8.6 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.2	0.33	3.3 $\pm$ 0.5	<0.001	<0.001



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά το σχεδιασμό της παρούσας μελέτης, συγκρίναμε τα ποσοστά OS-MRSA στελεχών που έχουν προηγουμένως αναφερθεί σε άλλες περιοχές (*Sakoulas G et al., 2001, Hososaka Y et al., 2007*) με τις δικές μας αναλογίες OS-MRSA και αυτές από τον λοιπό Ελληνικό χώρο (*Chini E et al., 2008*). Παρατηρήσαμε τότε ότι αυτά τα στελέχη είναι αρκετά συχνά στην Ελλάδα. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια του 1 έτους από την περίοδο του Αυγούστου 2006 - Ιουλίου 2007, 26 από τα 167 (15,5%) *mecA*-θετικά στελέχη ήταν OS-MRSA (MICs στην οξακιλλίνη από Etest σε 2% NaCl, <2mg/L). Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα για να εστιάσει η μελέτη μας στους OS-MRSA.

Πιο αναλυτικά, κλινικά στελέχη *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA* αλλά εμφανίζονται φαινοτυπικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη έχουν πρόσφατα αναφερθεί όλο και περισσότερο (*Petinaki E et al., 2002, Kampf G et al., 2003, Hososaka Y et al., 2007, Forbes BA et al., 2008, Ikonomidis et al., 2008, Saeed K et al., 2010*). Έχει προταθεί ότι τέτοια στελέχη θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως ένα νέο MRSA είδος, οριζόμενο ως OS-MRSA, τα οποία μπορεί να έχουν ταξινομηθεί εσφαλμένα ως MSSA στην καθημερινή ρουτίνα, εάν πραγματοποιούνται μόνο δοκιμές ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά. Γενικά πιστεύεται ότι κατά τη θεραπεία OS-MRSA λοιμώξεων, πρέπει να λαμβάνουμε προφυλάξεις, επειδή η αγωγή με β-λακταμικά αντιβιοτικά μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση εξαιρετικά ανθεκτικών MRSA, στο οποίο αποδίδεται η παρουσία του γονιδίου *mecA* (*Sakoulas G et al., 2001*). Ωστόσο, έχουν πρόσφατα παρατηρηθεί σε νοσοκομεία νέοι τύποι ετερο-MRSA στελεχών που είναι φαινοτυπικά ευαίσθητα σε στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες και την ιμιπενέμη (*Kishii K et al., 2008*). Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε *S. aureus* κλινικά στελέχη που ήταν *mecA* θετικά αλλά παρουσίασαν MICs οξακιλλίνης  $\leq 1$  mg/L και ήταν ευαίσθητα σε διάφορες β-λακτάμες. Αρχικά, δύο από τα πρώτα στελέχη της μελέτης είχαν ταξινομηθεί εσφαλμένα ως MSSA από το πολύ ευαίσθητο σύστημα Vitek 2 (*Sakoulas G et al., 2001*). Κατά τη διάρκεια της πληθυσμιακής ανάλυσης στη μελέτη μας, αυτά τα στελέχη αναπτύχθηκαν μόνο μέχρι χαμηλές συγκεντρώσεις οξακιλλίνης.

Οι παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης εγείρουν την ανάγκη για προσδιορισμό των πρόσθετων πιθανών γενετικών παραγόντων που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ένα σημαντικό ρόλο σε αυτό το επίπεδο ετεροαντοχής. Είναι



προφανές ότι οποιοσδήποτε παράγοντας παίζει ρόλο στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν πιθανό τέτοιο παράγοντα. Για παράδειγμα, η έντονη διαταραχή του μεταβολισμού του κυτταρικού τοιχώματος που συνδέεται με την αντοχή στη βανκομυκίνη έχει προηγουμένως συσχετισθεί με την καταστολή του επιπέδου αντοχής στη μεθικιλίνη σε αυτά τα βακτήρια («seesaw» effect) (Sieradzki K and Tomasz A, 1997). Επιπλέον, δεδομένου ότι η αντοχή στην οξακιλλίνη εξαρτάται από περιβαλλοντικές συνθήκες, θεωρείται ότι πρέπει να υπάρχουν ειδικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην έκφραση της ετερογένειας και των οποίων η ενεργοποίηση ή η καταστολή προκαλεί πλειοτροπικές δράσεις και τελικά την εμφάνιση «ευαίσθητων» ή υψηλά ανθεκτικών υποπληθυσμών (Rohrer S et al., 2003). Επίσης, οι μεταβολές στη δραστηριότητα της αυτολυσίνης, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το επίπεδο της αντοχής στη μεθικιλίνη, θα πρέπει να διερευνηθούν περισσότερο (Rohrer S et al., 2003). Μια πρόσφατη αναφορά έδειξε ότι η διαγραφή των σημαντικών (αλλά όχι απαραίτητων για τη βιωσιμότητα) FemA και FemB παραγόντων, οι οποίοι συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια γενική μεταγραφική αναδιάταξη στους *S. aureus* που να συμμετέχει στην απόκριση στην οξακιλλίνη. Στο πλαίσιο αυτό, ανάλυση του DNA με συστοιχίες έδειξε ότι συγκεκριμένα γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται ή υπερεκφράζεται σε μεταλλαγμένα στελέχη που έχουν υποστεί διαγραφή των FemA-FemB, συμμετέχουν σε κύρια, μη συνδεδεμένα μεταξύ τους, μεταβολικά μονοπάτια. Τέλος, είναι δυνατόν οι τυχαίες γονιδιακές αναδιατάξεις μέσω τρανσποζονίων ή εισαγωγή αλληλουχιών μπορεί να οδηγήσουν σε σταθερές γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ετερογενή έκφραση της αντοχής στην οξακιλλίνη.

Σε αυτό το πλαίσιο, οι *in vitro* και *in silico* αναλύσεις μας για τους παράγοντες Fem δείχνουν ότι η φαινοτυπική ευαισθησία στην οξακιλλίνη θα μπορούσε να αποδοθεί σε συσσωρευμένες μεταλλάξεις στις Fem πρωτεΐνες. Τα λειτουργικά πλήρως ειαίσθητα στην οξακιλλίνη OS-MRSA στελέχη SA 1326 και SA 4666 είχαν 12 και 14 μεταλλάξεις αντίστοιχα στους παράγοντες Fem, τα ετεροανθεκτικά στελέχη SA 1306 και SA 1552 10 και 9 μεταλλάξεις, ενώ το ανθεκτικό στην οξακιλλίνη (χαμηλού επιπέδου) MRSA στέλεχος ελέγχου SA6083, το οποίο ήταν πολύ παρόμοιο

με τα υπό μελέτη OS-MRSA στελέχη διαφέροντας μόνο στην υψηλότερη MIC οξακιλλίνης, είχε σημαντικά λιγότερες μεταλλάξεις (τρεις) στις πρωτεΐνες FemXAB. Έτσι, φαίνεται ότι η αύξηση της ευαισθησίας των κλινικών στελεχών συσχετίζεται σταθερά με την αυξανόμενη απόσταση μεταξύ των μεταλλαγμένων παραγόντων Fem.

Συνολικά, είναι προφανές από την μελέτη μας ότι η έκφραση του *mecA* γονιδίου δεν αποτελεί απόλυτα καθοριστικό παράγοντα για την αντοχή στην οξακιλλίνη. Οι προσπάθειες για τη διαλεύκανση των αιτίων της ετεροαντοχής θα πρέπει να επεκταθούν και στην ανίχνευση και ταυτοποίηση νέων μοριακών στόχων, που ενδεχομένως συνδέονται με την άτυπη ευαισθησία των OS-MRSA και που μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην ανακάλυψη νέων στόχων για αντιβιοτικά. Είναι προφανές ότι κάθε παράγοντας που παίζει ρόλο στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και τη συναρμολόγηση, όπως οι παράγοντες Fem, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πιθανό γενετικό παράγοντα που συμβάλλει στον OS-MRSA φαινότυπο και ίσως ένα στόχο για αντιβιοτικά.

Περνώντας από το μοριακό στο λειτουργικό τμήμα της μελέτης, από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι η απόκριση των υπό μελέτη στελεχών στην οξακιλλίνη βρίσκεται μεταξύ αυτής του πλήρως ευαίσθητου στελέχους (ATCC 29213) και εκείνης ενός ιδιαιτέρως ανθεκτικού στελέχους MRSA. Δεδομένου ότι σταδιακά εμφανίζονται σε όλο τον κόσμο όλο και περισσότεροι "ευαίσθητοι" κλώνοι MRSA, η έρευνα για τη δραστικότητα της οξακιλλίνης (σε σύγκριση με τη θεραπεία εκλογής βανκομυκίνη) κατά των OS-MRSA στελεχών, μπορεί να παρέχει κάποιες πληροφορίες σχετικά με πιθανές εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές. Ωστόσο, με βάση την ισχύουσα παραδοχή ότι ορισμένα στελέχη γίνονται πιο ομοιογενώς ανθεκτικά στην οξακιλλίνη όταν εκτίθενται σε αυτή *in vitro* και *in vivo*, σαφώς απαιτούνται πρόσθετα πειράματα σε ζωικά μοντέλα προκειμένου να τεκμηριωθούν παρόμοιες υποθέσεις.

Στο πλαίσιο αυτό, προχωρήσαμε σε πειράματα που αφορούν άμεσες συγκρίσεις της δραστικότητας της οξακιλλίνης έναντι της βανκομυκίνης. Πραγματοποιήσαμε άμεση σύγκριση των *in vitro* και *in vivo* δραστικοτήτων της δικλοξακιλλίνης σε σύγκριση με της βανκομυκίνης έναντι 15 OS-MRSA κλινικών στελεχών. Σε *in vitro* βακτηριοκτόνες δοκιμασίες (time-kill assays) η βανκομυκίνη

επέδειξε χαμηλότερη βακτηριοκτόνο δράση από την δικλοξακιλλίνη για τα περισσότερα στελέχη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι προηγουμένως η βανκομυκίνη φαινόταν πράγματι να θανατώνει στελέχη MSSA λιγότερο γρήγορα από αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (*Small PM et al., 1990*). Αυτή η χαμηλή *in vitro* βακτηριοκτόνος δράση της βανκομυκίνης επέφερε πιθανώς τα μέτρια αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων του *S. aureus* (*Small PM et al., 1990, Levine DP et al., 1991*). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η βακτηριοκτόνος δράση των β-λακταμών κατά των MSSA μπορεί να είναι καλύτερη από εκείνη της βανκομυκίνης (*Joukhadar C et al., 2010*).

Σε σχέση με τα παραπάνω, δεν αποτελεί έκπληξη ότι τα στελέχη που απομονώσαμε και φέρουν το γονίδιο *mecA*, τα οποία λειτουργικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη, ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά σε θεραπεία οξακιλλίνης και *in vivo*. Ειδικότερα, η δικλοξακιλλίνη θεράπευσε επιτυχώς το 66,7% των λοιμώξεων με στελέχη OS-MRSA σε επίμυες, ομοίως με τη βανκομυκίνη, η οποία έδρασε επιτυχώς έναντι του 75% των στελεχών, ενώ η δικλοξακιλλίνη ήταν αποτελεσματική σε λοιμώξεις όπου η βανκομυκίνη απέτυχε. Επιπλέον, η άμεση σύγκριση των δραστηριοτήτων της δικλοξακιλλίνης και της βανκομυκίνης έδειξαν ότι η δικλοξακιλλίνη ήταν ομοίως αποτελεσματική με τη βανκομυκίνη σε περισσότερο από τα μισά στελέχη OS-MRSA που μελετήθηκαν.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα στελέχη OS-MRSA της μελέτης μας ομοιάζουν λειτουργικά αρκετά με τους MSSA. Αν τα στελέχη αυτά γίνουν συχνότερα στο μέλλον, θα υπάρχουν λοιπόν εύλογες ευνοϊκές θεραπευτικές συνέπειες, με αυξανόμενη χρήση β-λακταμών στις αντίστοιχες λοιμώξεις.



## ABSTRACT

Depending on the genetic background of the strain that carries *mecA*, resistance levels range from phenotypically susceptible to highly resistant. Characteristic for most MRSA is the heterogeneous expression of resistance, which is due to the segregation of a more highly resistant subpopulation upon challenge with methicillin. Maximal expression of resistance by PBP2' requires the efficient and correct synthesis of the peptidoglycan precursor. Genes involved in cell-wall precursor formation and turnover, regulation, transport, and signal transduction may determine the level of resistance that is expressed. At this stage, however, there is no information available on the functionality or efficacy of such factors in clinical isolates in relation to methicillin resistance levels.

Community-type *Staphylococcus aureus* strains that are positive for *mecA* and PBP2a but appear phenotypically susceptible to oxacillin are increasingly reported worldwide. For this reason, four *S. aureus* clinical isolates carrying the *mecA* gene with oxacillin MICs of <2 microg/ml were tested for oxacillin efficiency by population analyses and experimental thigh infections. These isolates harbored staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV and belonged to two genotypes. Two of the four isolates were found by population analysis to be truly oxacillin susceptible. All four isolates exhibited significant reductions in the numbers of colonies grown after dicloxacillin treatment of experimental thigh infections, as also did a *mecA*-negative *S. aureus* control strain. These observations indicate that some of the phenotypically oxacillin susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates may be at least partially responsive to oxacillin.

In parallel, in order to gain molecular and functional insights on this observation, we focused on additional factors possibly contributing to phenotypic susceptibility. The nucleotide content of *mecA*, *femA*, *femB* and *femX* genes, which are considered essential for methicillin resistance, was determined in four SCC*mec*-IV type OS-MRSA clinical isolates. Gene expression was quantified compared with the low- and a high-level MRSA (MIC 256 mg/L) control. The tertiary structure of Fem proteins was predicted based on protein structure homology modelling, using web-based automated comparative protein modelling. Growth kinetics were tested for the study and control isolates, to determine whether FemXAB mutations lead to reduced fitness. Genes *mecA*, *femA*, *femB* and *femX* were expressed similarly in the

study and the control isolates. Mutations in the gene *mecA* were not present in any isolate. However, several mutations leading to amino acid substitutions in positions possibly affecting Fem enzyme activity were detected in all fem genes. Two OS-MRSA that had no oxacillin heteroresistance, had more mutations in the Fem proteins compared with the remaining isolates that were heteroresistant. The low-level MRSA control had considerably fewer mutations. No differences between growth rates of the OS-MRSA and the MRSA controls were observed. Accumulation of amino acid changes in Fem proteins might affect intact cell wall synthesis, even though not causing reduced viability, thus contributing to atypical oxacillin responsiveness.

Finally, we compared the activity of dicloxacillin with that of vancomycin against 15 oxacillin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) clinical isolates. By population analyses, we found that 6 OS-MRSA isolates were able to grow in the presence of up to 8 mg/L dicloxacillin and 9 isolates were able to grow in 12 to >32 mg/L dicloxacillin; all isolates grew in up to 2 mg/L vancomycin. Both drugs exhibited similar bactericidal activities. In experimental infections, the therapeutic efficacy of dicloxacillin was significant ( $P < 0.05$  versus untreated controls) in 10 OS-MRSA isolates and vancomycin was effective ( $P < 0.05$ ) against 12 isolates; dicloxacillin had an efficacy that was comparable to that of vancomycin ( $P > 0.05$ ) in 8 isolates. The favorable response to dicloxacillin treatment might suggest that antistaphylococcal penicillins could be used against OS-MRSA infections.





## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. (2002) *In vivo* pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3484 – 3489
2. Antignac A, Tomasz A. (2009) Reconstruction of the phenotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by replacement of the staphylococcal cassette chromosome mec with a plasmid-borne copy of *Staphylococcus sciuri* pbpD gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 435–41
3. Appelbaum PC. (2007) Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 45 Suppl 3:S165-70
4. Araki Y, Nakatani T, Hayashi H, Ito E. (1971b) Occurrence of non-N-substituted glucosamine residues in lysozyme-resistant peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42(4): 691–697
5. Araki Y, Nakatani T, Makino R, Hayashi H, Ito E. (1971a) Isolation of glucosaminyl- $\beta$ (1-4)-muramic acid and phosphoric acid ester of this disaccharide from acid hydrolysates of peptidoglycan of *Bacillus cereus* ahu 1356 cell walls. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 42: 684-690
6. Arbeti RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. 1997: 253-86
7. Barbier F, Ruppe E, Hernandez D et al. (2010) Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 202: 270 – 81
8. Bennet IL, PB Beeson (1954) Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. *Medicine*; 26:241-62
9. Berger-Bächi B, and Tschierske M. (1998) Role of fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist. Updat.* 1: 325-335
10. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, and Hiramatsu K. (2008) Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3512–3516

11. Blanco R, Tristan A, Ezpeleta G et al. (2011) Molecular epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. *J. Clin. Microbiol.* 49: 433–6
12. Boyce JM. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: K. B. Crossley, G. L. Archer (1997) eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 309-29
13. Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M. et al. (2007) Poring over pores: a-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.* 13: 1405–6
14. Bumsted RM, Dahl JL, Söll D. and Strominger JL. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243(4):779–782
15. Chambers HF. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev* 10: 781–791
16. Chambers HF. (1999) Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *The Journal of Infectious Diseases.* 179: 353-359
17. Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH, Lauderdale TL. (2009) Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:351–357
18. Chini S. et al., (2008) Clonal evolution and antibiotic resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece during a five-year period, abstr C2-231, p 156. Abstr. 48th Annu. Intersci. Conference Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC). American Society for Microbiology, Washington, DC
19. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, and Hiramatsu K. (2006) Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a

- new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1001–1012
20. Chua K, Laurent F, Coombs G et al. (2011) Not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician's guide to community MRSA—its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. *Clin. Infect. Dis.* 52: 99–114
  21. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  22. Courvalin P. (2006) Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42 Suppl 1: S25–34
  23. Couto I, de Lencastre H, Severina E et al. (1996) Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug. Resist.* 2: 377–91
  24. Cui L, Neoh HM, Shoji M et al. (2010) An *rpoB* mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 5222–33
  25. Daum RS. (2007) Clinical practice. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 357: 380-90
  26. David MZ, Daum RS. (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 616–87
  27. DE Jonge BLM, Chang Y-S, Xu N, Gage D. (1996) Effect of exo-genous glycine on peptidoglycan composition and resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1498–1503
  28. De Lencastre H. and Tomasz A. (1994) Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2590-2598
  29. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN et al. (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 375: 1557–68

30. Diep BA, Stone GG, Basuino L et al. (2008) The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 197: 1523 – 30
31. Eid CN, Halligan NG, Nicas TI, Mullen DL, Butler TF, Loncharich RJ, Paschal JW, Schofield CJ, Westwood NJ, Cheng L. (1997) Tripeptide LY301621 and its diastereomers as methicillin potentiators against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot.* 50:283–285
32. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1008 –1015
33. Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7687–92
34. European Centre for Disease Prevention and Control. EARSS Annual Reports. <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/Documents.aspx> (22 August 2011, date last accessed)
35. Forbes BA et al. (2008) Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61:387–395
36. Fournier JM, Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. In: T Wardström, I. Eliason, I. Holder, A. Ljungh (1990) eds. Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections. London: Springer-Verlag; 533-45
37. Frenay HME, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Molkenboer MJCH, Verhoef J. (1992) Long-term carriage, and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after discharge from hospital. *J Hosp Infect*; 22:207-15
38. Garrigos C, Murillo O, Euba G et al. (2010) Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin versus alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 5251–6
39. Ghuysen JM (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32: 425-464

40. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. (1998) Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 62:1371–1414
41. Gorwitz RJ. (2008) A review of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:1-7
42. Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG. (1997) Studies of the repressor (Blal) of  $\beta$ -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol* 24: 1025–1037
43. Hackbarth CJ, Chambers HF. (1993) *blal* and *blaR1* regulate  $\beta$ -lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 37:1144–1149
44. Hackbarth CJ, Kocagoz T, Kocagoz S, Chambers HF. (1995) Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 103–106
45. Han LL, McDougal LK, Gorwitz RJ et al. (2007) High frequencies of clindamycin and tetracycline resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsed-field type USA300 isolates collected at a Boston ambulatory health center. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1350–2
46. Hart D. (1937) Operation room infections. *Arch. Surg. (Chicago)* 34:874-96
47. Health Protection Agency. Voluntary Reporting of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia in England, Wales and Northern Ireland, 2009. [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1281952718651](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1281952718651) (22 August 2011, date last accessed)
48. Hegde SS and Shrader TE (2001) FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J. Biol. Chem.* 276: 6998-7003
49. Hegde SS, Reyes N, Skinner R, Difuntorum S. 2008. Efficacy of telavancin in a murine model of pneumonia induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:169–172.

50. Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H and Berger-Bächi B. (1993) Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 175(6): 1612–1620
51. Hollis RJ, Barr JL, Doebbeling BN, Pfaller MA, Wenzel RP. (1995) Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. *Clin. Infect. Dis.* 21:328-32
52. Holzknecht BJ, Hardardottir H, Haraldsson G et al. (2010) Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iceland from 2000 to 2008: a challenge to current guidelines. *J. Clin. Microbiol.* 48: 4221–7
53. Hososaka Y, et al. (2007) Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J. Infect. Chemother.* 13:79 – 86
54. Howden BP, Ward PB, Charles PG et al. (2004) Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 38: 521–8
55. Hughes RC. (1970) Autolysis of isolated cell walls of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C. 6346 and *Bacillus subtilis* Marburg Strain 168. Separation of the products and characterization of the mucopeptide fragments. *Biochem. J.* 119(5): 849–860.
56. Ikonomidis A, et al. (2008) Investigation of oxacillin efficacy among oxacillin-susceptible, *mecA* positive, *Staphylococcus aureus* clinical isolates by population analyses, bactericidal assays and experimental thigh infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3905–3908
57. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4961-4967
58. Ito T, Katayama Y, and Hiramatsu K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1449–1458
59. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tienasitorn C, and Hiramatsu K. (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal

- cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1323–1336
60. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Update* 6: 41–52
61. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, and Hiramatsu K. (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2637–2651
62. Jang HC, Kim SH, Kim KH et al. (2009) Salvage treatment for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: efficacy of linezolid with or without carbapenem. *Clin. Infect. Dis.* 49: 395 – 401
63. Jevons MP. (1961) Celbenin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1: 124–5
64. Johnson AP. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 Suppl 4: iv43–8
65. Joukhadar C, Pillai S, Wennersten C, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. (2010) Lack of bactericidal antagonism or synergism in vitro between oxacillin and vancomycin against methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(2):773-7
66. Kampf G, Adena S, Ruden H and Weist K. (2003) Inducibility and potential role of *MecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J. Hosp. Infect.* 54:124-9
67. Kamiryo T, and Matsushashi M. (1972) The biosynthesis of the cross-linking peptides in the cell wall peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247: 6306-6311
68. Karakawa WW. (1992) The role of capsular antigens in *Staphylococcus aureus* immunity. *Zentralbl. Bakteriol.* 277:415
69. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. (2000) A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1549–1555



70. Katie AS, Monecke S, Slaughter S, Forrest G, Pfeiffer C, Ehricht R, and Oethinger M. (2012) Genotypic Resistance Testing Creates New Treatment Challenges: Two Cases of Oxacillin-Susceptible MRSA (OS-MRSA). *J. Clin. Microbiol.*
71. Kauffman CA, Bradley SF. Epidemiology of community acquired infection. In: K.B. Crossley, G. L. Archer eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 287-308
72. Kennedy AD, Bubeck Wardenburg J, Gardner DJ et al. (2010) Targeting of a-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 202: 1050–8
73. Kennedy AD, Otto M, Braughton KR et al. (2008) Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 1327 – 32
74. Kernodle DS. (2011) Expectations regarding vaccines and immune therapies directed against *Staphylococcus aureus* a-hemolysin. *J. Infect. Dis.* 203: 1692–3
75. Kishii K, Ito T, Watanabe S, Okuzumi K, Hiramatsu K (2008) Recurrence of heterogeneous methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among the MRSA clinical isolates in a Japanese university hospital. *J Antimicrob Chemother* 62: 324–328
76. Kloos W. (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. New York: Churchill Livingstone; 113-37
77. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 505 – 20
78. Kluytmans JA, Mouton JW, IJzerman EP, et al. (1995) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor wound infections after cardiac surgery. *J Infect Dis*; 171:216-9
79. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. (1998) Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:717–720

80. Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. (2001) Eagle-type methicillin resistance: New phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 45:815–824
81. Krebs J, Al-Ghusein H, Feasey N et al. (2011) Are nasal carriers of *Staphylococcus aureus* more likely to become colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on admission to a hospital? *J. Clin. Microbiol.* 49: 430–2
82. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novick RP. (1993) Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 259: 227– 230
83. Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. (1996) Suppression of methicillin resistance in *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2680– 2685
84. Labischinski H, Johannsen L. (1999) Cell wall targets in methicillin-resistant staphylococci. *Drug Resistance Updates* 2:319–325
85. LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. (2008) Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and *in vitro* pharmacodynamic models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2156– 2162.
86. Lee SM, Ender M, Adhikari R et al. (2007) Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1497–9
87. Lee MC, Rios AM, Aten MF, et al. (2004) Management and outcome of children with skin and soft tissue abscesses caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 123-7
88. Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. (1991) Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 115: 674–80

89. Li M, Cheung GYC, Hu J et al. (2010) Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Infect. Dis.* 202: 1866–76
90. Ling B, and Berger-Bächi B. (1998) Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB null mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 936-938
91. Liu IX, Durham DG, Richards RME. (2000) Baicalin synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other  $\beta$ -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 52:361–366
92. Liu TY and Gotschlich EC (1967) Muramic acid phosphate as a component of the mucopeptide of gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 242: 471-476
93. Livermore DM. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Intl. J. Antimicrob. Agents* 16: S3–S10
94. Loughman JA, Fritz SA, Storch GA et al. (2009) Virulence gene expression in human community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 199: 294–301
95. Lowy FD. (2011) How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N. Engl. J. Med.* 364: 1987–90
96. Ludovice AM, Wu SW, DE Lencastre H. (1998) Molecular cloning and DNA sequencing of the *Staphylococcus aureus* UDP-*N*-Acetylmuramyl tripeptide synthetase (*murE*) gene, essential for the optimal expression of methicillin resistance. *Microbial Drug Resistance*, 4:85–90
97. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, and Hiramatsu K. (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1147–1152
98. Maidhof H, Reinicke B, Blumel P, Berger-Bächi B, and Labischinski H. (1991) *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol.* 173(11): 3507–3513.

99. Majno G. The Healing Hand. Man and Wound in the Ancient World. Cambridge, MA: Harvard University Press, (1975)
100. Maki H, Yamaguchi T, Murakami K. (1994) Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176:4993–5000
101. Matsushashi M, Dietrich CP, and Strominger JL. (1967) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls III. The role of soluble ribonucleic acid and of lipid intermediates in glycine incorporation in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 242: 3191-3206
102. Matthews PR, Stewart PR. (1984) Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22:161–166
103. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A et al. (2010) Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 3804–11
104. Mera RM, Suaya JA, Madsen HA et al. (2011) Disproportionate increase from 2004–2008 in *S. aureus* associated US hospitalisation rates in children. In: Abstracts of the Twenty-first European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/Twenty-seventh International Congress of Chemotherapy, Milan, Italy, Abstract P1219, p. 129. Basel: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
105. Mermel LA, Cartony JM, Covington P et al. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1119–21
106. Mevissen-Verhage EAE, Marcelis JH, Harmsen-van Amerongen WCM, de Vos NM, Berkel J, Verhoef J. (1997) Iron affects the intestinal flora. I. Development of the neonatal gut flora during the first week of life. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4:14-8
107. Milheiri co, C., Oliveira DC, and de Lencastre H. (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3374–3377.

108. Miller LG, Diep BA. (2008) Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46: 752–60
109. Moellering RC Jr, Abbott GF, Ferraro MJ. (2011) Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 2-2011. A 30-year-old woman with shock after treatment of a furuncle. *N. Engl. J. Med.* 364: 266 – 75
110. Moellering RC Jr. (1995) Past, present and future of antimicrobial agents. *Am. J. Med.* 99 Suppl 6A: 11S–8S
111. Moellering RC Jr. (1998) The specter of glycopeptide resistance: current trends and future considerations. *Am. J. Med.* 104: 3S–6S
112. Moellering RC Jr. (2006) The growing menace of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* 144: 368 – 70
113. Moellering RC Jr. (2006) Vancomycin: a 50-year reassessment. *Clin. Infect. Dis.* 42 Suppl 1: S3 – 4
114. Montanari MP, Massidda O, Mingoia M, Varaldo PE. (1996) Borderline susceptibility to methicillin in *Staphylococcus aureus*: a new mechanism of resistance? *Microb. Drug Resist.* 2: 257–260
115. Murray BE, Moellering RC Jr. (1978) Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. *Med. Clin. North. Am.* 62: 899 – 923
116. Nameki N, Tamura K, Asahara H, and Hasegawa T. (1997) Recognition of tRNA (Gly) by three widely diverged glycyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* 268: 640-647
117. Neoh HM, Cui L, Yuzawa H et al. (2008) Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 45–53
118. Nicolson K, Evans G, O'Toole PW. (1999) Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol. Lett*; 179:233–239

119. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, et al. (2008) Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 831-7
120. Niyomporn B, Dahl JL, and Strominger JL. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. IX. Purification and properties of glycyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243(4): 773–778
121. Ofengand J, and Henes C. (1969) The function of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid. II. Inhibition of amino acyl transfer ribonucleic acid-ribosome complex formation by ribothymidylyl-pseudouridylyl-cytidylyl-guanosine 3'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6241–6253
122. Ogston A. (1881) Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br. Med. J.* 1:369-75
123. Oliveira DC, Wu SW, DE Lencastre H. (2000) Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1906–1910
124. Oliveira DC, Milheiri C, and de Lencastre H. (2006) Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3457–3459
125. Osborn MJ. (1969) Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annual Review of Biochemistry* 38: 501-538
126. Peleg AY, Cameron D, Ward D, et al. (2011) A novel mechanism of reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. In: Abstracts of the Twenty-first European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/Twenty-seventh International Congress of Chemotherapy, Milan, Italy. Abstract P1050, p. 120. Basel: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
127. Peleg AY, Monga D, Pillai S et al. (2009) Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 199: 532–6

128. Petinaki E, Kontos F, and Maniatis AN. (2002) Emergence of two oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clones in a Greek hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 6. 1090-1091
129. Petit JF, Strominger JL, and Söll D. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* 243: 757-767
130. Pinho MG, DE Lencastre H, Tomasz A. (2001) An aquired and native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *PNAS* 98:10886–10891
131. Popovich KJ, Hota B. (2008) Treatment and prevention of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Dermatol. Ther.* 21:167-79
132. Riedel DJ, Weekes E, Forrest GN. (2008) Addition of rifampin to standard therapy for treatment of native valve infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2463–7
133. Robert J, Tristan A, Cavalie L et al. (2011) Panton-Valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 1734–9
134. Roberts RJ. (1972) Structures of two glycyl-tRNAs from *Staphylococcus epidermidis*. *Nature New Biol.* 237: 44-45
135. Roberts RJ. (1974) Staphylococcal transfer ribonucleic acids. II. Sequence analysis of isoaccepting glycine transfer ribonucleic acids IA and IB from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* 249: 4787-4796
136. Roberts WSL, Petit JF, and Strominger JL. (1968a) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VIII. Specificity in the utilization of L-alanyl transfer ribonucleic acid for interpeptide bridge synthesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. *J. Biol. Chem.* 243: 768-772
137. Roberts WSL, Strominger JL, and Söll D. (1968b) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VI. Incorporation of L-threonine into interpeptide bridges in *Micrococcus roseus*. *J. Biol. Chem.* 243: 749-756

138. Rogers HJ, Perkins HR, and Ward JB. (1980) Biosynthesis of Peptidoglycan; Chapman and Hall, Ltd.: London
139. Rohrer S, Maki H, Berger-Bächi B. (2003) What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J. Med. Microbiol.* 52:605– 607
140. Rohrer S, and Berger-Bächi B. (2003a) FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 837-846
141. Rohrer S, and Berger-Bächi B. (2003b) Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology* 149: 2733-2738
142. Rohrer S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H, and Berger-Bächi B. (1999) The essential *Staphylococcus aureus* gene fmhB is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9351-9356
143. Rosenbach FJ. (1884) Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden: JF Bergmanns Verlag
144. Ruhe JJ, Smith N, Bradsher RW, Menon A. (2007) Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: impact of antimicrobial therapy on outcome. *Clin. Infect. Dis.* 44:777-84
145. Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bächi B. (1994) Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:724–728
146. Saeed K, Dryden M, Parnaby R. (2010) Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? *J. Hosp. Infect.* 76:267–268
147. Sakoulas G, et al. (2001) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:3946 –3951
148. Sakoulas G, Moellering RC Jr. (2008) Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Infect. Dis.* 46 Suppl 5: S360–7
149. Schleifer KH, and Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* 36: 407-477



150. Schneider T, Senn MM, Berger-Bächi B, Tossi A, Sahl HG, and Wiedemann I. (2004) *In vitro* assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 53(2): 675-685
151. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G et al. (2011) Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 1082 – 7
152. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, et al. (2008) Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:995-1001
153. Seidl K, Bayer AS, Fowler VG et al. (2011) Combinatorial phenotypic signatures distinguish persistent from resolving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 575–82
154. Shaegren JN. (1984) *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 310: 1368 – 73
155. Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, Archer GL. (1998) Interaction of native and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin-binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* 180: 2160–2166
156. Shelburne SA, Musher DM, Hulten K, Ceasar H, Lu MY, Bhaila I, and Hamill RJ. (2004) *In vitro* killing of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with drug combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4016–4019
157. Sieradzki K, Tomasz A. (1997) Suppression of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through synergic action of early cell wall inhibitors and some other antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39(Suppl A):47–51
158. Small PM, Chambers HF. (1990) Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1227–1231

159. Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsushashi M. (1987) Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett* 221: 167–171
160. Stapleton PD, and Taylor PW. (2002) Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progress*, 85(1):57-72
161. Stewart TS, Roberts RJ, and Strominger JL. (1971) Novel species of tRNA. *Nature* 230: 36-38
162. Stranden AM, Ehlert K, Labischinski H, and Berger-Bächi B. (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 179(1): 9–16
163. Strominger JL, and Ghuysen JM. (1967) Mechanisms of enzymatic bacteriaolysis. Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* 156(3772): 213–221
164. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239
165. Tenover FC, Moellering RC Jr. (2007) The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 44: 1208–15
166. Tomasz A, Nachman S, and Leaf H. (1991) Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:124–129
167. Ton-That H, Labischinski H, Berger-Bächi B, Schneewind O. (1998) Anchor structure of staphylococcal surface proteins. *J. Biol. Chem.* 44:29143–29149
168. Tschierske M, Ehlert K, Stranden AM, Berger-Bächi B. (1997) Lif, the lysostaphin immunity factor, complements FemB in staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge formation. *FEMS Microbiol. Lett*; 153:261–264
169. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T et al. (2010) Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4352–9

170. van Hal SJ, Paterson DL. (2011) Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 405–10
171. van Heijenoort, J. (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* 18: 503-519
172. van Heijenoort, J. and Gutmann, L. (2000) Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation, and susceptibility to beta-lactams. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5028-5030
173. Vergidis P, Rouse MS, Euba G et al. (2011) Treatment with linezolid or vancomycin in combination with rifampin is effective in an animal model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* foreign body osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 1182–6
174. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D et al. (2007) Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 13: 1510–4
175. Watanabe Y, Cui L, Katayama Y et al. (2011) Impact of rpoB mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2680–4
176. Wilkinson BJ, Biology. In: KB Crossley, GL Archer (1997) eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 1-38
177. Wu SW, DE Lencastre H, Tomasz A. (2001) Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183: 2417–242
178. Yamase T, Fukuda N, Tajima Y. (1996) Synergistic effect of polyoxotungstates in combination with  $\beta$ -lactam antibiotics on antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull* ;19:459–465
179. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. (2001) A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to  $\beta$ -lactams in staphylococci. *Science.* 291:1962–1965
180. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, and Conly JM. (2009) Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring

class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:531–540