



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επιδημιολογική μελέτη στελεχών χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου που απομονώθηκαν από υποκλινική μαστίτιδα στα πρόβατα»

Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Επιβλέπουσα
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Νοέμβριος 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**«Epidemiological study of *Staphylococcus aureus* strains from
sub-clinical mastitis in sheep»**

Tsilipounidaki Katerina

Three-membered examination committee:

- Petinaki Efthimia, Professor of Microbiology, Supervisor
- Germenis Anastasios, Professor of Immunology
- Simos Georgios, Professor of Biochemistry

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

Larissa, November 2017

Περιεχόμενα

ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Ταξινόμηση των Σταφυλόκοκκων.....	11
1.2. Ιστορική αναδρομή του <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3. Χαρακτηριστικά του <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.3.2. Γονιδίωμα.....	14
1.3.3. Δομή και ένζυμα.....	15
1.3.4. Τοξίνες.....	18
1.3.5. Σχηματισμός βιομεμβράνης	19
1.4. Αντοχή σε αντιμικροβιακά.....	20
1.4.1. β-λακταμικά αντιβιοτικά	21
1.4.2. Τετρακυκλίνες	23
1.4.3. Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη Β(MLS _B).....	24
1.5. Φορεία και Λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα.....	26
1.5.1. Φορεία.....	26
1.5.2. Λοιμώξεις.....	28
1.6. Διάκριση στελεχών <i>S. aureus</i> : Hospital-associated, HA/ Community-associated, CA/ Livestock-associated, LA	29
1.6.1. Hospital-associated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , HA-MRSA.....	30
1.6.2. Community-associated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , CA-MRSA.....	32
1.6.3. Livestock-associated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , LA-MRSA	34
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
I. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	41
2.1. Στελέχη βακτηρίων.....	41

2.2.	Απομόνωση στελεχών	41
2.3.	Ταυτοποίηση στελεχών <i>S. aureus</i>	42
2.3.1.	Χρώση κατά Gram.....	42
2.3.2.	Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης.....	43
2.3.3.	Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης	44
2.4.	Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2	45
II.	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
2.5.	Απομόνωση Χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)	46
2.6.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	47
2.7.	Ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	52
2.8.	Μοριακή Τυποποίηση με την μέθοδο Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	53
2.8.1.	Γονίδια της μεθόδου MLST για τον <i>S. aureus</i> , ένζυμα και αντιδράσεις	54
2.9.	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	58
2.10.	Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	59
2.11.	Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων MLST (Sequencing).....	60
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3.1.	Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά	64
3.2.	Γονίδια αντοχής	65
3.3.	Μοριακή τυποποίηση των στελεχών <i>S. aureus</i>	65
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

Staphylococcus aureus is a Gram-positive coccal bacterium and part of the natural microbiota of the nose, skin and the intestinal tract of human. Among staphylococci, it is the main human pathogen and it can cause a variety of infections. Except from human pathogen, *S. aureus* is also isolated from livestock animals and it is responsible for a variety of infections, included clinical and sub-clinical mastitis, dermatitis and urinary tract infection. These strains raising questions about their characteristics, pathogenicity, origin and their relationship with human population.

The purpose of the present study is the epidemiological study of clones of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep with subclinical mastitis from different regions of Greece and the comparison of results with similar studies to investigate the presence of specific clones in humans and the probability of transmission from animals to veterinarians and farmers and thus to the general population. First stage of the research was to determine the percentages of resistance in different antimicrobial drugs of the strains isolated from animal. Cefoxitin, Beta-lactam, MLSB group of antibiotics and tetracycline were the factors that were tested. From the 34 strains of the study the proportion of Cefoxitin (methicillin)-sensitive *S. aureus* (MSSA) was 100%. Susceptibility testing of the remaining antimicrobial resistance revealed that 3 strains were resistant to tetracycline, erythromycin and MLS_B group of antibiotics and there were isolated from different local authorities. In particular, one isolate contained the *tet(K)* and *tet(L)* genes, the second isolate contained the *tet(K)* and *erm(B)* genes and the third isolate contained the *msr(A)* gene. In the isolate with the *tet(K)* and *erm(B)* genes was performed whole genome sequencing that revealed the presence of the *nor(A)* gene. This gene provides resistance to quinolones. Although, according to the susceptibility testing this isolate was sensitive to the quinolones that were tested. The second part of the study included the identification of animal strains with MLST method. The results revealed that 19 isolates (55,9%) were ST133, a major livestock-associated clone. From the remaining strains, 4 isolates (11,8 %) were ST5, 3 isolates (8,8%) were ST2011, 2 isolates (5,9%) were ST30 and 2 isolates (5,9%) were ST2111. Also, ST7, ST130, ST581 and ST700 were detected in one isolate (2,9%) each.

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

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένας θετικός κατά Gram κόκκος και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου καθώς μπορεί να βρεθεί στις ρινικές κοιλότητες, στο δέρμα και στην γαστρεντερική οδό. Μεταξύ των άλλων σταφυλόκοκκων, ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα κύριο ανθρώπινο παθογόνο και μπορεί να προκαλέσει πληθώρα λοιμώξεων. Εκτός όμως από ανθρώπινο παθογόνο, ο *S. aureus* έχει επίσης απομονωθεί από ζώα κτηνοτροφίας και είναι υπεύθυνος για ένα πλήθος λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένων της κλινικής και υποκλινικής μαστίτιδας, δερματίτιδας, καθώς και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Αυτά τα στελέχη προκαλούν ερωτήματα όσον αφορά τα χαρακτηριστικά, την παθογένεια, την προέλευση και την σχέση τους με τον ανθρώπινο πληθυσμό.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επιδημιολογική μελέτη στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από πρόβατα με υποκλινική μαστίτιδα, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με παρεμφερείς μελέτες για την διερεύνηση της παρουσίας των στελεχών αυτών στους ανθρώπους καθώς και της πιθανότητας μεταφοράς τους στους κτηνοτρόφους και κατ' επέκταση στον γενικό πληθυσμό. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα ποσοστά ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων της κεφοξιτίνης, των β-λακταμικών, της τετρακυκλίνης και των MLS_B αντιβιοτικών. Από τα 34 στελέχη που εξετάστηκαν τα ποσοστά των ευαίσθητων στην κεφοξιτίνη (μεθικιλίνη) στελεχών *S. aureus* (MSSA) είναι 100%. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα εναπομείναντα αντιβιοτικά έδειξε ότι 3 στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν από διαφορετικούς νομούς, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, και τα MLS_B (Μακρολίδες/ Λινκοσαμίδες/ Στρεπτογραμμίνη Β) αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, το ένα στέλεχος έφερε τα γονίδια *tet(K)* και *tet(L)*, το δεύτερο στέλεχος έφερε τα γονίδια *tet(K)* και *erm(B)* και το τρίτο στέλεχος έφερε το γονίδιο *msr(A)*. Στο στέλεχος που έφερε τα γονίδια *tet(K)* και *erm(B)* πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος, η οποία αποκάλυψε την παρουσία του γονιδίου *nor(A)*, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στις κινολόνες. Ωστόσο, σύμφωνα με το αντιβιογράμμα το στέλεχος εμφάνιζε ευαισθησία στις κινολόνες που εξετάστηκαν. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των στελεχών με τη μέθοδο MLST. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 19 στελέχη (55,9%) ανήκαν στον κλώνο ST133, ο οποίος αποτελεί κύριο κλώνο που ανευρίσκεται στα ζώα κτηνοτροφίας. Από τα υπόλοιπα, 4 στελέχη (11,8%) ανήκαν στον κλώνο ST5, 3 στελέχη (8,8%) στον κλώνο ST2011, 2 στελέχη (5,9%) στον κλώνο ST30 και 2 στελέχη (5,9%) στον κλώνο ST2111. Επιπλέον, οι κλώνοι ST7, ST130, ST581 και ST700 ανιχνεύθηκαν σε 1 στέλεχος (2,9%) έκαστος.

Ο *S. aureus* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος επιδεικνύει εξαιρετική προσαρμοστικότητα ως μέρος της ικανότητας του για επιβίωση και διάδοση, γεγονός που εξηγεί την ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης της επιδημιολογίας του.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ταξινόμηση των Σταφυλόκοκκων

Οι σημερινές μοριακές τεχνικές (π.χ. υβριδοποίηση/ αλληλούχιση του DNA) επιτρέπουν στους επιστήμονες να αναγνωρίζουν μικροβιακές αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούν στοιχεία- κλειδιά καθώς και άλλα γενετικά στοιχεία που καθορίζουν την ύπαρξη ή μη γενετικής συγγένειας μεταξύ των μικροοργανισμών. Συνεπώς, έπειτα από γενετικές μελέτες και χημειοταξικές αναλύσεις οι σταφυλόκοκκοι ταξινομούνται στο φύλο Firmicutes, στην κλάση Bacilli, στην τάξη Bacillales, στην οικογένεια Staphylococcaceae, απαριθμώντας διάφορα είδη, μέσα στα οποία συγκαταλέγεται και ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*). [1]

1.2. Ιστορική αναδρομή του *Staphylococcus aureus*

Το 1878, ο R. Koch παρατήρησε για πρώτη φορά τους σταφυλόκοκκους ενώ, το 1883 ο σκωτσέζος χειρουργός Sir Alexander Ogston περιέγραψε τον σταφυλόκοκκο ως «μάζα που μοιάζει με τσαμπί από σταφύλια»[2]. Αργότερα, το 1884 ο γερμανός γιατρός Friedrich Julius Rosenbach διαφοροποίησε τα βακτήρια από το χρώμα των αποικιών τους σε *Staphylococcus aureus* (από την λατινική λέξη *aurum* που σημαίνει χρυσός) και σε *Staphylococcus albus* (που σημαίνει λευκός) και ο οποίος αργότερα μετονομάστηκε σε *Staphylococcus epidermidis* (λόγω της παρουσίας του στο ανθρώπινο δέρμα). [3]

Εκτός από το χρώμα των αποικιών, τα δύο αυτά είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους από την ικανότητα ή μη των στελεχών να προκαλούν πήξη του πλάσματος. Η ορολογική ταξινόμηση προτάθηκε για πρώτη φορά το 1902, από τους Kolle και Otto, που ανέφεραν ότι με μεθόδους αιματοσυγκόλλησης ήταν δυνατό να διακριθούν τα στελέχη. Ο Loeb το 1903, αποδεικνύει ότι ο *S. aureus* προκαλεί πήξη του πλάσματος μέσα σε μερικές ώρες, ενώ ο *S. albus* δεν είχε αυτή την ικανότητα [4]. Έτσι, την δεκαετία του 1930, μια μέθοδος πήξης επέτρεψε στους επιστήμονες να ανιχνεύουν το ένζυμο πηκτάση που εκκρίνεται από τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο και προκαλεί πήξη του πλάσματος και το 1954 ο Duthie απέδειξε ότι υπήρχαν δυο μορφές σταφυλοκοκκικής πηκτάσης: η συνδεδεμένη πηκτάση (clumping factor ή bound coagulase) και η ελεύθερη πηκτάση (free coagulase)[5].

Το 1941 ξεκίνησε η κλινική χρήση της πενικιλίνης για την αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Ωστόσο, η χρήση της πενικιλίνης, συμπεριλαμβανομένων της κακής χρήσης και της κατάχρησής της, είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία στελεχών ανθεκτικών σε αυτό το αντιβιοτικό [6]. Το 1944, ο Kirby πραγματοποίησε την πρώτη περιγραφή στελεχών *S. aureus* που παρήγαγαν πενικιλινάση, μια ιδιότητα που μέχρι τότε εμφανιζόταν

σπάνια [7]. Έτσι, μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1940 και κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1950 απομονώθηκαν αρκετά στελέχη ανθεκτικά στο αντιβιοτικό τα οποία είχαν την ικανότητα παραγωγής β-λακταμάσης. Το 1959, παρατηρείται ότι η πενικιλίνη δεν αποτελεί πλέον μέσο θεραπείας των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη και κλινική χρήση νέων αντιβιοτικών, των ημισυνθετικών πενικιλινών (όπως για παράδειγμα οξακιλλίνη, μεθικιλίνη κ.α.), σε λοιμώξεις από στελέχη *S. aureus* που παρήγαγαν β- λακταμάσες [8].

Το 1961, Βρετανοί επιστήμονες απομόνωσαν από νοσοκομείο της Αγγλίας τα πρώτα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες η πρώτη περίπτωση λοίμωξης ανθρώπου από MRSA αναφέρθηκε το 1968 [6]. Μέσα στην επόμενη δεκαετία επιδημικά στελέχη MRSA αρχίζουν να εξαπλώνονται στην Ευρώπη, την Αυστραλία και την Αμερική [8]. Τα πρώτα αυτά στελέχη ήταν ανθεκτικά μόνο στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη πολυανθεκτικά στελέχη και δεν εμφάνιζαν αυξημένη λοιμογόνο ικανότητα σε σύγκριση με τα ευαίσθητα στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA).

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 παρατηρείται μια ύφεση της συχνότητας των λοιμώξεων που οφείλονται σε στελέχη MRSA. Στην επόμενη δεκαετία όμως και μέχρι σήμερα καταγράφονται επιδημίες οφειλόμενες σε πολυανθεκτικά στελέχη MRSA στα νοσοκομεία διαφόρων χωρών. Το πρόβλημα που ανακύπτει με τα νέα αυτά στελέχη είναι ότι εμφανίζουν αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα χημειοθεραπευτικών. Το 2002 οι γιατροί στις Ηνωμένες Πολιτείες καταγράφουν τα πρώτα στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στην βανκομυκίνη (VRSA), ένα αντιβιοτικό το οποίο αποτελούσε την τελευταία επιλογή για την αντιμετώπιση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Αν και υπήρχε ο φόβος ότι τα στελέχη *S. aureus* θα εμφάνιζαν γρήγορα ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, ωστόσο τα βανκομυκίνη- ανθεκτικά στελέχη είναι σπάνια μέχρι στιγμής [6]. Μέχρι και σήμερα, πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες για την εξέλιξη των στελεχών *S. aureus*, τόσο σε επίπεδο επιδημιολογίας όσο και ανθεκτικότητας, καθώς είναι αναγκαία η εύρεση χημειοθεραπευτικών για την μείωση εξάπλωσης ή ακόμη και εξάλειψης του συγκεκριμένου μικροβίου.

1.3. Χαρακτηριστικά του *Staphylococcus aureus*

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η ονομασία σταφυλόκοκκος προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «σταφύλι» και «κόκκος» και περιγράφει τις δομές που σχηματίζουν τα βακτήρια όταν αναπτύσσονται και μοιάζουν με τσαμπιά από σταφύλια. Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, με διάμετρο 0,5 έως 1,5 μm, είναι ακίνητοι, δεν έχουν βλεφαρίδες δεν σχηματίζουν σπόρια και τα περισσότερα είδη είναι αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Μπορούν να αναπτύσσονται σε υλικά που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αλατιού και μανιτόλη (Mannitol salt agar), σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 18 έως 40°C. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση αλατιού επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των σταφυλόκοκκων και όχι άλλων οργανισμών (με εξαίρεση τους εντερόκοκκους) και επιπλέον τα στελέχη *S. aureus* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν την μανιτόλη, εμφανίζοντας μια κίτρινη ζώνη γύρω από τις αποικίες (εικ 1) [1].



Εικόνα 1 Ανάπτυξη *S. aureus* και *S. epidermidis* σε Mannitol salt agar.

Δίνουν θετική αντίδραση καταλάσης, μια διαδικασία που πραγματοποιείται για τον διαχωρισμό τους από υπόλοιπους Gram θετικούς κόκκους (στρεπτόκοκκοι, εντερόκοκκοι) (εικ. 2) [9]. Σε στερεά θρεπτικά υλικά αναπτύσσονται μέσα σε 24 ώρες σχηματίζοντας στρογγυλές αποικίες με διάμετρο 1-3mm, λείες, υπερυψωμένες, χωρίς χρώμα ή άσπρες/κιτρινοπορτοκαλί (ως αποτέλεσμα των καροτενοειδών χρωστικών που σχηματίζονται κατά την ανάπτυξή τους- εξ' ου και το όνομα του είδους *Staphylococcus aureus*), οι οποίες μπορούν να παρουσιάσουν μερικές φορές ζώνες αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ, λόγω της παραγωγής αιμολυσίνης (εικ. 3).



Εικόνα 2 Δοκιμασία καταλάσης.

Εικόνα 3 Καλλιέργεια *S. aureus* σε στερεό θρεπτικό υλικό.

1.3.2. Γονιδίωμα

Η διαδικασία αλληλούχισης του γονιδιώματος πολλαπλών στελεχών ενός βακτηριακού παθογόνου, όπως είναι και ο *Staphylococcus aureus*, έχει σημαντική επιστημονική αξία καθώς τα δεδομένα αποκαλύπτουν όχι μόνο το περιεχόμενο σε γονίδια αλλά και τη διατήρηση και μεταβλητότητα που εμφανίζεται ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη και σχετίζεται με ανθρώπινες ή ζωικές λοιμώξεις [10]. Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος έγινε για πρώτη φορά το 2001 όπου βρέθηκε ότι έχει μέγεθος περίπου 2.8 Mbp με σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε G και C και εμφανίζει έως 20% μεταβλητότητα στη γονιδιωματική αλληλουχία [9, 10]. Αποτελείται από δύο βασικά μέρη: το **βασικό** (core genome) και το **βοηθητικό** γονιδίωμα (accessory genome).

Το βασικό γονιδίωμα αποτελεί το 75% του συνολικού γονιδιώματος και αποτελείται από δύο βασικές ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από γονίδια τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα στελέχη, είναι εξαιρετικά συντηρημένα και κωδικοποιούν απαραίτητες για το βακτήριο μεταβολικές και ρυθμιστικές λειτουργίες (*housekeeping genes*). Μέσα σε αυτόν τον πυρήνα γονιδίων υπάρχει μια δεύτερη ομάδα, τα μεταβλητά γονίδια (*Core Variable regions, CV*), τα οποία είναι κατανομημένα διάσπαρτα και το πρότυπο κατανομής τους καθορίζει τις γενετικές σειρές των *S. aureus*. Η πλειοψηφία των γονιδίων CV με γνωστή λειτουργία, κωδικοποιεί επιφανειακές πρωτεΐνες και δομές, οι οποίες συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση με τον ξενιστή, καθώς και τους ρυθμιστές τους [11]. Τα γονίδια που ανήκουν στο βασικό γονιδίωμα μπορούν να εξελιχτούν μέσω μεταλλάξεων και γονιδιακών αντικαταστάσεων [12].

Το υπόλοιπο 25% του γονιδιώματος απαρτίζεται από μεταθετά γενετικά στοιχεία (*Mobile Genetic Elements, MGEs*). Τα MGEs αποτελούν μεγάλα τμήματα DNA, τα οποία κωδικοποιούν

μια ποικιλία λοιμογόνων παραγόντων και μορίων που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Κωδικοποιούν, επίσης, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά και ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του νέου ξενιστή. Έχουν την ικανότητα να μετακινούνται ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά. Η μεταφορά των γονιδίων μεταξύ των στελεχών επιτυγχάνεται μέσω των μηχανισμών της μεταγωγής, του μετασχηματισμού και σπανιότερα της βακτηριακής σύζευξης. Παρόλα αυτά κάθε μεταθετό γενετικό στοιχείο μπορεί να μεταφερθεί μόνο σε περιορισμένο αριθμό γενετικών σειρών, δηλαδή κάθε στέλεχος *S. aureus* δεν μπορεί να φέρει όλα τα MGEs. Συνεπώς, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην πλαστικότητα του γονιδιώματος, επιτρέποντας στα βακτήρια να προσαρμόζονται εύκολα σε νέες θέσεις. Οι διαφορετικές ομάδες MGEs που έχουν βρεθεί στον *S. aureus* είναι οι βακτηριοφάγοι, οι νησίδες παθογονικότητας, τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και η σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (SCC*mec*) [10, 12]. Το βοηθητικό γονιδίωμα περιλαμβάνει τα γονίδια τα οποία δεν είναι παρόντα σε όλους τους κλώνους και έχουν την δυνατότητα είτε να «χάνονται» είτε να αποκτώνται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης [12].

1.3.3. Δομή και ένζυμα

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των Gram θετικών βακτηρίων είναι η **πεπτιδογλυκάνη**, στην οποία οφείλεται το μισό βάρος του κυτταρικού τοιχώματος. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό και τα ένζυμα που καταλύουν τη δομή του στρώματος πεπτιδογλυκάνης αποκαλούνται πρωτεΐνες σύνδεσης πενικιλίνης (*Penicillin-binding proteins, PBPs*). Στο διπλό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που σχηματίζεται οφείλεται η στερεότητα (ακαμψία) του τοιχώματος του σταφυλόκοκκου. Επίσης παίζει ρόλο στην παθογόνο δράση των μικροβίων αυτών, καθώς διεγείρει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, την παραγωγή ιντερλευκίνης-1 από τα φαγοκύτταρα και τον χημειοτακτισμό για την συγκέντρωση των πολυμορφοπύρηνων [9].

Μερικά στελέχη *S. aureus* παράγουν έναν εξωκυττάριο πολυσακχαρίτη που σχηματίζει γύρω από το βακτηριακό κύτταρο, **το έλυτρο**. Το έλυτρο προστατεύει τα βακτήρια αναστέλλοντας τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών από τα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα και εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων κυττάρων. Στον *S. aureus* έχουν ταυτοποιηθεί έντεκα ορότυποι του ελύτρου με τους ορότυπους 1 και 2 να σχετίζονται με πολύ πυκνά έλυτρα και βλενώδεις αποικίες και τους ορότυπους 5 και 7 να ευθύνονται για την πλειοψηφία των λοιμώξεων στον άνθρωπο [9].

Ένα επιπλέον δομικό χαρακτηριστικό των σταφυλόκοκκων αποτελεί η **βλενώδης στοιβάδα**, η οποία αποτελεί ένα χαλαρά συνδεδεμένο υδατοδιαλυτό υμένιο το οποίο αποτελείται από πολυσακχαρίτες πρωτεΐνες και μικρά πεπτίδια. Αυτή η εξωκυττάρια ουσία συμβάλλει στην προσκόλληση των βακτηρίων στους ιστούς και τα ξένα σώματα (καθετήρες, μοσχεύματα κ.α.) και παρεμβαίνει στην φαγοκυττάρωση των βακτηρίων.

Ένα άλλο κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος αποτελούν τα **τειχοϊκά οξέα**, τα οποία συνιστούν το 30% με 50% του ξηρού του βάρους. Με τον όρο τειχοϊκά οξέα εννοούνται ειδικά πολυμερή τα οποία περιέχουν κατάλοιπα φωσφορικής ριβιτόλης τα οποία είτε συνδέονται ομοιοπολικά με τα κατάλοιπα N-ακετυλο-μουραμικού οξέος του στρώματος πεπτιδογλυκάνης είτε συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω λιπόφιλων δεσμών (λιποτειχοϊκά οξέα). Συνδέονται με την φμπρονεκτίνη (fibronectin) και προάγουν την προσκόλληση του βακτηρίου στους βλεννογόνους του ξενιστή[9].

Ένα ακόμη δομικό χαρακτηριστικό, το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων στελεχών *S. aureus* και όχι στους κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους (*Coagulase Negative Staphylococci, CoNS*) είναι η **πρωτεΐνη Α**. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται είτε με το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης είτε με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και έχει μια μοναδική συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα Fc των ανοσοσφαιρινών IgG, αποτρέποντας έτσι την εξάλειψη του *S. aureus* μέσω των αντισωμάτων. Η ιδιότητα αυτή έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές στην εργαστηριακή διάγνωση για τον εντοπισμό *S. aureus* σε κλινικά δείγματα, καθώς αποτελεί μια ειδική δοκιμασία ταυτοποίησης [9].

Άλλες βασικές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος είναι τα **επιφανειακά μικροβιακά συστατικά που αναγνωρίζουν τα προσκολλητικά μόρια του υποστρώματος** (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, MRCRAMMS*), πρωτεΐνες που συμβάλλουν επίσης στην προσκόλληση στους ιστούς του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, τα MSCRAMMs δεσμεύουν μόρια όπως το κολλαγόνο, τη φμπρονεκτίνη και το ινωδογόνο και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην έναρξη ενδοαγγειακών λοιμώξεων καθώς και λοιμώξεων των οστών και των αρθρώσεων [14].

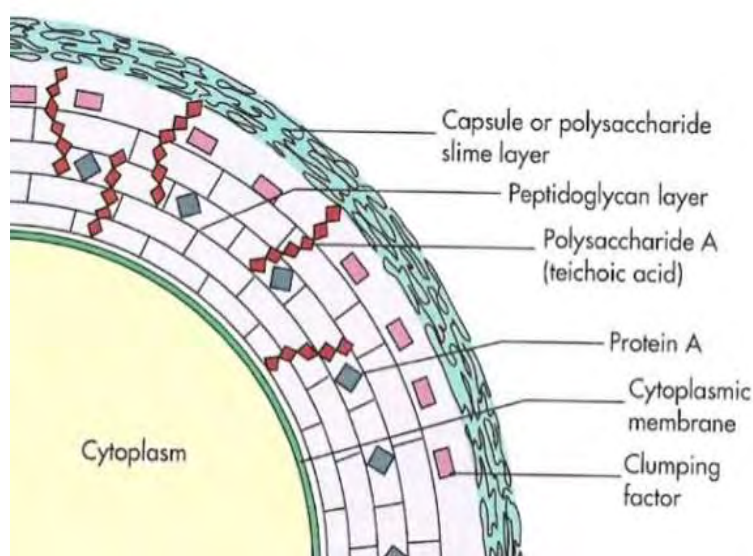
Εκτός από τα δομικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν, οι σταφυλόκοκκοι παράγουν μια ποικιλία ενζύμων που δεν παρουσιάζουν τοξική ή κυτταρολυτική δράση και τα οποία συμβάλλουν στην παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλούν. Τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν την πηκτάση, την υαλουρονιδάση, την ινωδολυσίνη, τις λιπάσες και τις νουκλεάσες.

Η **πηκτάση** (ή αλλιώς **κοαγκουλάση**) είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο που προκαλεί πήξη του πλάσματος του ανθρώπου και διαφόρων ζώων και παράγεται μόνο από στελέχη *S. aureus*. Η

παραγωγή της βοηθάει στο διαχωρισμό του *S. aureus* από την ομάδα των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλόκοκκων (CoNS). Εκτός από την ελεύθερη πηκτάση τα στελέχη *S. aureus*, παράγουν και μια άλλη πηκτάση που είναι προσκολλημένη στην επιφάνεια των μικροβιακών κυττάρων και καλείται συνδεδεμένη πηκτάση. Και οι δύο μορφές πηκτάσης συμβάλλουν στην κάλυψη των βακτηρίων με ινώδες, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να καθίστανται ανθεκτικά στην οψωνινοποίηση και την φαγοκυττάρωση [9].

Μια χαρακτηριστική ιδιότητα του *S. aureus* είναι η παραγωγή θερμοανθεκτικής **νουκλεάσης**, η οποία υδρολύει το κολλώδες DNA. Το ένζυμο αυτό αποτελεί βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό του είδους και έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή πηκτάσης για την τυποποίηση του *S. aureus* [9]. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από το γονίδιο *nuc*, του οποίου η ανίχνευση με μοριακές μεθόδους επιβεβαιώνει την παρουσία του *S. aureus* [1].

Τα υπόλοιπα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης και της νουκλεάσης, υδρολύουν συστατικά του ιστού του ξενιστή και βοηθούν στην επέκταση των βακτηρίων. Η **υαλουρονιδάση** είναι ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει τα υαλουρονικά οξέα, που βρίσκονται στο ακυτταρικό στρώμα του συνδετικού ιστού, προάγοντας την εξάπλωση των σταφυλόκοκκων στους ιστούς. Η **ινοδολυσίνη**, που ονομάζεται επίσης **σταφυλοκινάση** μπορεί να διαλύει τους θρόμβους ινικής. Τέλος, όλα τα στελέχη *S. aureus* παράγουν διάφορες **λιπάσες** που υδρολύουν τα λιπίδια και αυτό είναι μια σημαντική λειτουργία που εξασφαλίζει την επιβίωση των σταφυλόκοκκων στις σμηγματογόνες περιοχές του σώματος [9].



Εικόνα 4 Δομή του κυτταρικού τοιχώματος του σταφυλόκοκκου.

1.3.4. Τοξίνες

Η παθογόνος δράση των σταφυλόκοκκων εξαρτάται από την ικανότητα των βακτηρίων να αποφεύγουν την φαγοκυττάρωση και να παράγουν επιφανειακές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην προσκόλληση των βακτηρίων στους ιστούς του ξενιστή καθώς και από τη διεργασία παραγωγής ειδικών τοξινών και υδρολυτικών ενζύμων.

Ο *S. aureus* παράγει μεγάλη ποικιλία τοξινών, που είναι υπεύθυνες για πολλές διαταραχές που προκαλεί στον άνθρωπο. Αυτές είναι οι κυτταροτοξίνες α, β, γ, δ και η λευκοκτονίνη P-V και η οικογένεια των υπεραντιγόνων, που περιλαμβάνει την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1*), τις εντεροτοξίνες (SEA-E και SEG-I) και τις επιδερμολυτικές τοξίνες (ETA, B).

Οι κυτταρολυτικές τοξίνες μπορούν να προκαλέσουν λύση των ουδετερόφιλων έχοντας ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λυσοσσωματικών ενζύμων τα οποία στη συνέχεια βλάπτουν τους περιβάλλοντες ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η **άλφα τοξίνη** παράγεται από τα περισσότερα στελέχη *S. aureus* που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο καθώς διαταράσσει τις λείες μυϊκές ίνες στα αιμοφόρα αγγεία και είναι τοξική για πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροκυττάρων, των λευκοκυττάρων, των ηπατοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Η **βήτα τοξίνη** (ή αλλιώς σιγγιγομυελινάση C) είναι μια θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη, η οποία επίσης παράγεται από τα περισσότερα στελέχη *S. aureus* που είναι υπεύθυνα για νόσο σε ανθρώπους και ζώα. Είναι τοξική για μια ποικιλία κυττάρων συμπεριλαμβανομένων ερυθροκυττάρων, ινοβλαστών, λευκοκυττάρων και μακροφάγων. Η **δέλτα τοξίνη** παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S. aureus* και από άλλους σταφυλόκοκκους, δρα ως επιφανειοδραστικός παράγοντας διαταράσσοντας τις κυτταρικές μεμβράνες και έχει ένα ευρύ φάσμα κυτταρολυτικής δράσης επιδρώντας στα ερυθροκύτταρα, σε πολλά κύτταρα των θηλαστικών και σε ενδοκυττάρια μεμβρανικές δομές. Η **γάμμα τοξίνη** επίσης παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S. aureus* και καταστρέφει τα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών. Αντιθέτως, η **λευκοκτονίνη P-V** (*Panton-Valentine leukocidin, PVL*) παράγεται από λιγότερο από το 5% των στελεχών *S. aureus* και καταστρέφει τα λευκά αιμοσφαίρια. Η συγκεκριμένη τοξίνη έχει προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ανευρίσκεται σε πολύ μικρό ποσοστό MRSA που κυκλοφορούν στο νοσοκομείο και αντιθέτως είναι παρούσα σχεδόν σε όλα τα στελέχη του MRSA τα οποία σχετίζονται με λοιμώξεις που κτώνται στην κοινότητα. Οι δύο τελευταίες τοξίνες είναι υπεύθυνες για την λύση των κυττάρων μέσω σχηματισμού πόρων με επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητας για τα κατιόντα και πρόκληση ωσμωτικής αστάθειας [9].

Όπως προαναφέρθηκε, οι επιδερμολυτικές τοξίνες, οι εντεροτοξίνες και η τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας ανήκουν σε μια τάξη πολυπεπτιδίων γνωστά και ως υπεραντιγόνα. Οι τοξίνες αυτές συνδέονται με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II στην επιφάνεια των μακροφάγων, τα οποία με την σειρά τους αντιδρούν με την β-υπομονάδα των ειδικών υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτταροκινών από αμφότερα τα μακροφάγα και τα T κύτταρα [9].

Οι **επιδερμολυτικές ή αποφολιδωτικές τοξίνες (ETA, ETB)** είναι πρωτεάσες σερίνης που σπάζουν τις διακυτταρικές γέφυρες στην κοκκώδη στοιβάδα της επιδερμίδας. Παράγονται από το 5% με 10% των στελεχών *S. aureus* και είναι υπεύθυνες για το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποκόλλησης της επιδερμίδας (SSSS) και για το φυσαλιδώδες μολυσματικό κηρίο, νοσήματα που εκδηλώνονται συχνότερα στα νεογνά και χαρακτηρίζονται από την αποφολίδωση των εξωτερικών στιβάδων της επιδερμίδας, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικών δερματικών βλαβών. Η ETA είναι θερμοανθεκτική και το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι χρωμοσωμικό, ενώ η ETB είναι θερμοευαίσθητη και το γονίδιο της βρίσκεται σε πλασμίδιο [9].

Οι **εντεροτοξίνες (SEA-E, SEG-I)** είναι μια οικογένεια διακριτών σταφυλοκοκκικών τοξινών, με την εντεροτοξίνη A να συσχετίζεται συνηθέστερα με τροφική δηλητηρίαση, τις εντεροτοξίνες C και D να βρίσκονται σε μολυσμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και την εντεροτοξίνη B να προκαλεί την σταφυλοκοκκική ψευδομεμβρανώδη εντεροκολίτιδα. Αυτές οι τοξίνες παράγονται από το 30% με 50% όλων των στελεχών *S. aureus*. Εκτός από τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και την απελευθέρωση κυτταροκινών, επιπλέον διεγείρουν την απελευθέρωση μεσολαβητών φλεγμονής από τα μαστοκύτταρα [9].

Η **τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1)** είναι μια εξωτοξίνη ανθεκτική στη θερμότητα και στην πρωτεόλυση και το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι χρωμοσωμικό. Η τοξίνη αυτή προκαλεί κυτταρική καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων ή διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου. Το σύνδρομο τοξικού σοκ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1978 και βρέθηκε ότι σχετίζεται με την έμμηνο ρύση. Είναι αξιοσημείωτο ότι η παραγωγή της TSST-1 από τους MRSA και MSSA δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά [15].

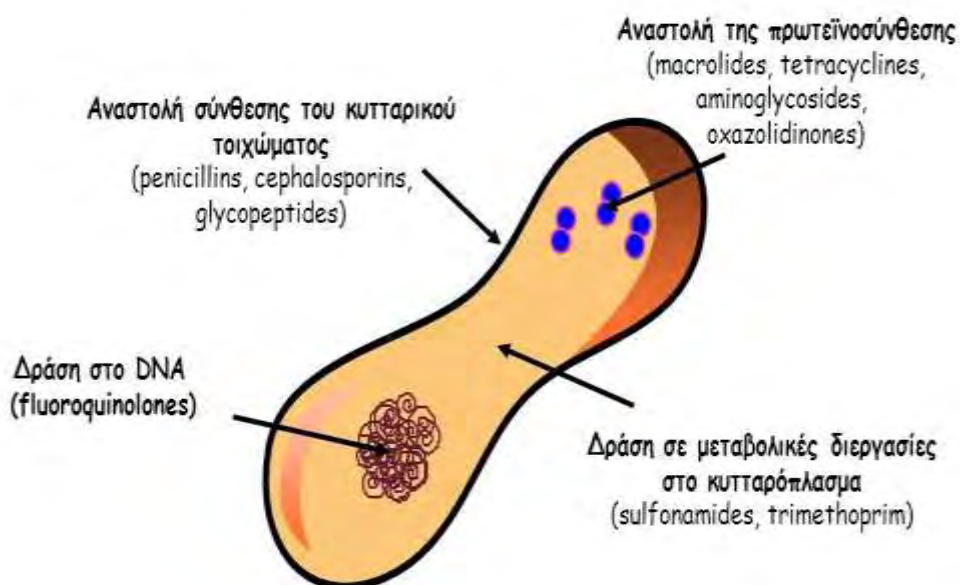
1.3.5. Σχηματισμός βιομεμβράνης

Η πολυπλοκότητα πολλών λοιμώξεων για τις οποίες ευθύνεται ο *S. aureus* είναι ο σχηματισμός βιομεμβράνης (*biofilm, slime*) [16]. Η βιομεμβράνη είναι μια κοινότητα βακτηρίων με οργανωμένη δομή και λειτουργία, που περιβάλλεται από μια εξωκυττάρια πολυμερή ουσία και η

οποία έχει την ικανότητα να προσκολλάται σε διάφορες έμβιες επιφάνειες και βιοϊατρικά υλικά [14]. Τα βακτηριακά κύτταρα στις βιομεμβράνες εμφανίζουν έναν διαφοροποιημένο φαινότυπο όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξή τους και την μεταγραφή των γονιδίων τους [17]. Η παραγωγή βιομεμβράνης θεωρείται ένας από τους κύριους λόγους επανεμφάνισης και δυσκολίας εξάλειψης των λοιμώξεων τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα [18]. Επιπλέον η βιομεμβράνη προσφέρει αντοχή τόσο από το ανοσοποιητικό σύστημα όσο και κατά την θεραπεία από αντιμικροβιακά φάρμακα, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση χρόνιων λοιμώξεων [15, 18].

1.4. Αντοχή σε αντιμικροβιακά

Συνήθως με τον όρο αντιβιοτικά εννοούμε ουσίες οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς και δρουν έναντι άλλων μικροοργανισμών (αντι-βιοτικά). Σήμερα όμως, ο όρος αντιβιοτικό τείνει να αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακό φάρμακο, ο οποίος εκτός από τα φυσικά παράγωγα, περιλαμβάνει ακόμη και τα ημι-συνθετικά (π.χ. ημι-συνθετικές πενικιλίνες) και τα χημειοθεραπευτικά ή συνθετικά αντιβιοτικά (λινεζολίδη, κινολόνες). Τα αντιβιοτικά δρουν σε διάφορα κύρια σημεία του μικροβιακού κυττάρου, δηλαδή στο κυτταρικό τοίχωμα, στο γενετικό υλικό, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στα ριβοσώματα (εικ 4).



Εικόνα 5 Θέσεις δράσης διαφόρων αντιβιοτικών.

Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους τα αντιβιοτικά χωρίζονται είτε σε **μικροβιοκτόνα**, τα οποία προκαλούν λύση και κατ' επέκταση θάνατο του μικροβιακού κυττάρου είτε **μικροβιοστατικά** τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν ένα αντιβιοτικό άλλοτε να δρα ως μικροβιοκτόνο και άλλοτε ως

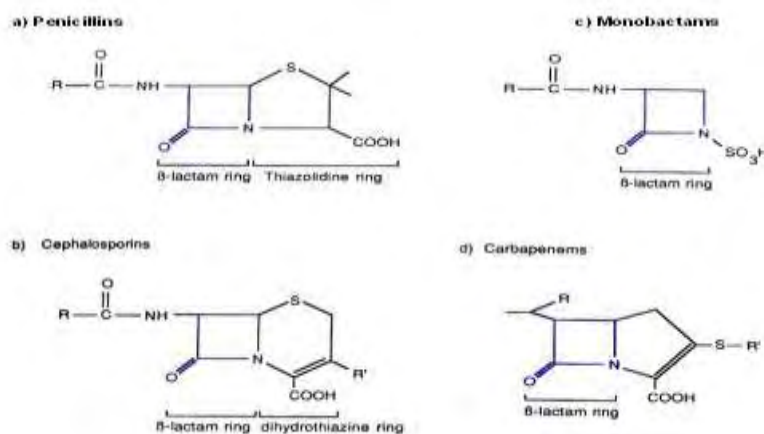
μικροβιοστατικό. Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος, καθώς η βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος δράση ενός αντιβιοτικού εξαρτάται από την συγκέντρωσή του [20].

Οι μικροοργανισμοί, μέσα από την πίεση της αντιμικροβιακής θεραπείας αναπτύσσουν αρχικά απλούστερους και στη συνέχεια πολυπλοκότερους μηχανισμούς αντοχής. Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής των μικροοργανισμών απέναντι στα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι: 1) η ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού μέσω παραγωγής ενζύμων, 2) ο μηχανισμός αντλίας, όπου το μικροβιακό κύτταρο με κατανάλωση ενέργειας μεταφέρει το αντιβιοτικό έξω από το κύτταρο, 3)η τροποποίηση του στόχου δράσης, όπου ο μικροοργανισμός μέσω γενετικών αλλαγών τροποποιεί το στόχο σύνδεσης του αντιβιοτικού πάνω στον μικροβιακό στόχο και έτσι το αντιβιοτικό δεν μπορεί να δράσει.

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι συγγενής (εγγενής) ή επίκτητη. Η συγγενής αντοχή αναφέρεται σε κάποια ενδογενή αντοχή που βασίζεται στο μηχανισμό του φαρμάκου και είναι χαρακτηριστική ανά γένος ή και είδος. Αντιθέτως η επίκτητη αντοχή αναφέρεται στην απόκτηση ενός γονιδίου αντοχής από κάποιο βακτήριο το οποίο δεν είναι συγγενώς ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό [20]. Η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής εξαρτάται από το συγκεκριμένο φάρμακο και το συγκεκριμένο βακτήριο καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις μια απλή μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρειάζονται πολλαπλές μεταλλάξεις για εμφάνιση φαινοτυπικής αντοχής. Η ταχύτητα με την οποία τα παθογόνα προσαρμόζονται στη χρήση των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη αντικατοπτρίζεται πολύ καλά στον *S. aureus*, ένα από τα πιο λοιμογόνα μικρόβια, που επιδεικνύει μία αξιοσημείωτη ικανότητα ταχείας ανάπτυξης αντοχής έναντι κάθε νέου αντιμικροβιακού παράγοντα, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο μελέτης και προβληματισμού για την ιατρική κοινότητα.

1.4.1. β-λακταμικά αντιβιοτικά

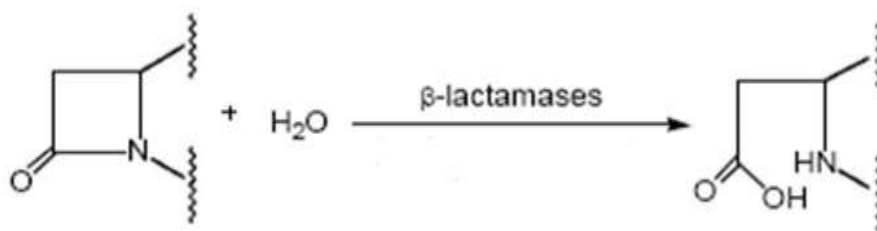
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν πέντε τάξεις αντιβιοτικών: τις πενικιλίνες, τους αναστολείς των β-λακταμασών, τις κεφαλοσπορίνες, τις πενέμες, και τις μονοβακτάμες, με κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία του β-λακταμικού δακτυλίου και η ακεραιότητα αυτού σχετίζεται με την βιολογική δράση των αντιβιοτικών. Ανάλογα με την τάξη, ο β-λακταμικός δακτύλιος είναι συνδεδεμένος είτε με δακτύλιο θειαζολιδίνης (πενικιλίνες, πενέμες-καρβαπενέμες), είτε με δακτύλιο διυδροθειαζίνης (κεφαλοσπορίνες), είτε είναι μόνος του (μονοβακτάμες) (εικ.6).



Εικόνα 6 Δομή των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι ευρέος φάσματος αντιμικροβιακοί παράγοντες και δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus* που αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη. Όπως προαναφέρθηκε, η βασική δομή της πεπτιδογλυκάνης είναι μια αλυσίδα αποτελούμενη από εναλλασσόμενα μόρια N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος. Οι αλυσίδες αυτές στη συνέχεια συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικές γέφυρες που δημιουργούν το άκαμπτο κάλυμμα των βακτηρίων. Η δομή των αλυσίδων και των μεταξύ τους συνδέσεων καταλύεται από συγκεκριμένα ένζυμα τα οποία είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας σερινών πρωτεασών. Τα ρυθμιστικά αυτά ένζυμα ονομάζονται πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) λόγω της ικανότητας τους να συνδέονται με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Όταν τα αναπτυσσόμενα βακτήρια εκτίθενται σε αυτά τα αντιβιοτικά, το αντιβιοτικό συνδέεται με συγκεκριμένες PBPs του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, προκαλεί ισοστερική αναστολή αυτών και εμποδίζει τον σχηματισμό των συνδέσεων ανάμεσα στις αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί αυτολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα τον βακτηριακό θάνατο [8, 19].

Η αντοχή του *S. aureus* στην πενικιλίνη οφείλεται στην παραγωγή β-λακταμάσης (πενικιλινάσης) από το κύτταρο. Η β-λακταμάση είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο που συντίθεται όταν ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και δρα υδρολύοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του β-λακταμικού αντιβιοτικού (εικ. 7). Τα στελέχη *S. aureus* που είναι ικανά να παράγουν β-λακταμάση είναι και ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η γενετική πληροφορία που κωδικοποιεί την παραγωγή αυτού του ενζύμου μεταφέρεται σε μεταδιδόμενα πλασμίδια, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την γρήγορη διασπορά της αντοχής αυτής μεταξύ των σταφυλόκοκκων [9].



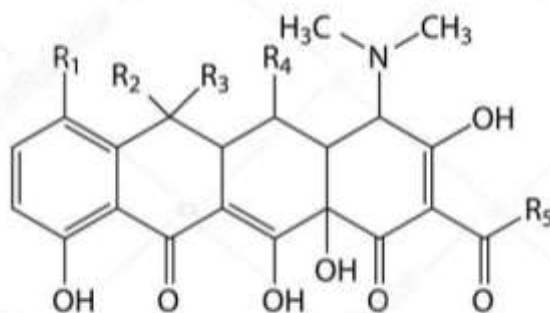
Εικόνα 7 Υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου.

Όπως αναφέρθηκε και στην ιστορική αναδρομή, λόγω της ανάπτυξης του παραπάνω μηχανισμού αντοχής ήταν αναγκαία η εύρεση νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που θα ήταν σε θέση να αντιμετωπίσουν τα ανθεκτικά στελέχη. Η πρώτη ημισυνθετική πενικιλίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μεθικιλίνη η οποία είχε αντοχή στη δράση της β-λακταμάσης. Παρόλα αυτά, σε ένα μόλις χρόνο μετά την έναρξη της χρήσης της, απομονώθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (MRSA).

Η αντοχή στη μεθικιλίνη κυρίως οφείλεται στο μηχανισμό τροποποίησης στόχου, αφού η πλειοψηφία των στελεχών φέρουν την PBP2a. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η πρωτεΐνη έχει χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά επιτρέποντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος παρουσία του αντιβιοτικού που δεσμεύει τις άλλες PBPs. Σε αντίθεση με την αντοχή που οφείλεται στις β-λακταμάσες (πενικιλινάσες), οι οποίες έχουν στενό φάσμα δράσης, η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη είναι ευρεία, προσδίδοντας αντοχή σε ολόκληρη την ομάδα των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Η PBP2a κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* το οποίο εδράζεται σε μία περιοχή του χρωμοσωμικού DNA του *S. aureus* που ονομάζεται σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, SCC*mec*) και κωδικοποιεί γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά και λοιμογόνους παράγοντες. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί έντεκα τύποι SCC*mec* σε στελέχη *S. aureus* (I-XI), εκ των οποίων οι τύποι I-V ανευρίσκονται πιο συχνά.

1.4.2. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι ευρέως φάσματος βακτηριοστατικοί παράγοντες και έχουν ένα βασικό σκελετό από τέσσερις συμπυκνωμένους κυκλικούς δακτυλίους (εικ. 8). Δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω αντιστρεπτής δέσμευσης στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεση του αμινοάκυλου- μεταφορικού RNA με το σύμπλεγμα 30S ριβόσωμα-mRNA.

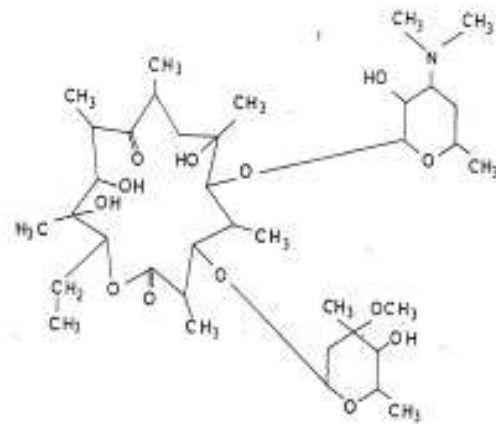


Εικόνα 8 Χημική δομή των τετρακυκλινών.

Στον *S. aureus* η αντοχή στα εν λόγω αντιβιοτικά έχει συσχετιστεί με το μηχανισμό αντλίας, ο οποίος αποτελεί τη συχνότερη αιτία αντοχής και τις αλλαγές στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες προστασίας (*Ribosome Protection Proteins*, RPPs). Ο μηχανισμός ενεργού αντλίας προκύπτει συνήθως μέσω ύπαρξης του γονιδίου *tet(K)* και *tet(L)*, τα οποία έχουν βρεθεί σε πλασμίδια. Οι RPPs προσδίδουν αντοχή στις τετρακυκλίνες μέσω σύνδεσής τους στο ριβόσωμα τροποποιώντας τη θέση σύνδεσης του αντιβιοτικού. Ο μηχανισμός αυτός οφείλεται συνήθως στο γονίδιο *tet(M)* το οποίο έχει βρεθεί να εδράζεται σε τρανσποζόνια στο χρωμόσωμα του *S. aureus* [20, 21]. Η πρωτεΐνη Tet(M) σε αντίθεση με την Tet(K) προσδίδει αντοχή σε τετρακυκλίνη και μινοκυκλίνη. Στον *S. aureus* τα πιο κοινά γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη είναι τα *tet(M)* και *tet(K)* [23] και έχει βρεθεί ότι η πλειοψηφία των στελεχών που φέρουν το γονίδιο *tet(M)* φέρουν και το γονίδιο *tet(K)* [24].

1.4.3. Μακρολίδες-Αινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη Β (MLS_B)

Η ερυθρομυκίνη, παράγωγο του *Saccharopolyspora erythraea*, αποτέλεσε τον πρώτο εκπρόσωπο της ομάδας των μακρολιδών που εισήχθη στην θεραπευτική των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Η βασική δομή αυτής της τάξης αντιβιοτικών είναι ένας μακρολιδικός δακτύλιος λακτόνης (εικ. 9). Η τροποποίηση της μακρολιδικής δομής οδήγησε στην ανάπτυξη νεότερων παραγόντων [25]. Πιο συγκεκριμένα ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα που υπάρχουν στον δακτύλιο της λακτόνης, οι μακρολίδες ταξινομούνται σε 14-μελείς (*clarithromycin*, *erythromycin*), 15-μελείς (*azithromycin*) και 16-μελείς. Οι μακρολίδες αποτελούν βακτηριοστατικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω δέσμευσής τους με το 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος και συγκεκριμένα στην αδενίνη της θέσης 2058, κάτι το οποίο εμποδίζει την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και κατά συνέπεια διακόπτει τη μετάφραση του mRNA.

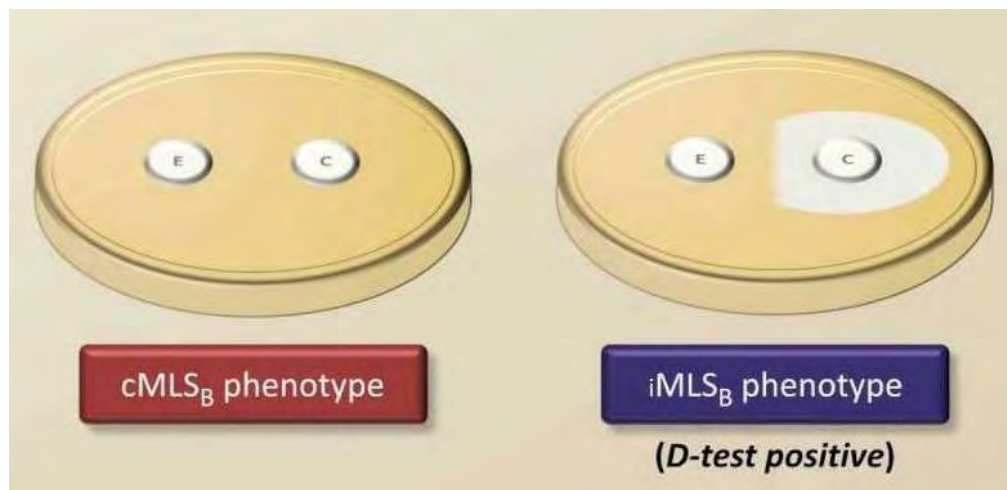


Εικόνα 9 Χημική δομή της ερυθρομυκίνης.

Ο παραπάνω μηχανισμός είναι κοινός για τις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τις στρεπτογραμμίνες, για το λόγο αυτό αναφέρονται ως Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη Β, MLS_B ομάδα αντιβιοτικών. Πιο συγκεκριμένα, οι λινκοσαμίδες εκπροσωπούνται από τη λινκομυκίνη και την κλινδαμυκίνη. Η λινκομυκίνη ήταν η πρώτη που απομονώθηκε από το *Streptomyces lincolnensis*, αλλά στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από την κλινδαμυκίνη λόγω της καλύτερης δράσης της. Η κλινδαμυκίνη συνδέεται με την 50S υπομονάδα του ριβοσώματος στην ίδια θέση που συνδέονται και οι μακρολίδες (στην αδενίνη στη θέση 2058) και αναστέλλει την πεπτιδυλική μεταφορά παρεμβαίνοντας στη σύνδεση του συμπλέγματος του αμινοξυ-ακυλο-tRNA. Οι στρεπτογραμμίνες είναι μια τάξη κυκλικών πεπτιδίων που παράγονται από το γένος *Streptomyces* και διακρίνονται σε δύο ομάδες, την ομάδα Α και την ομάδα Β τα οποία δρουν συνεργικά για να αναστείλουν την πρωτεϊνοσύνθεση.

. Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί αντοχής που αφορούν τις μακρολίδες και περιλαμβάνουν i) την τροποποίηση του στόχου δράσης, ii) την ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού και iii) την ύπαρξη ενεργού αντλίας εκροής. Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη εμφανίζεται συνήθως με διασταυρούμενη αντοχή σε λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνη Β, φαινότυπος ο οποίος ονομάζεται MLS_B . Σε ότι αφορά τις λινκοσαμίδες και τις στρεπτογραμμίνες ο μηχανισμός αντοχής που ανευρίσκεται είναι μέσω ενζυμικής αδρανοποίησης του αντιβιοτικού. Από τους παραπάνω μηχανισμούς αντοχής αυτός που συχνότερα συναντάται είναι εκείνος της τροποποίησης του στόχου δράσης μέσω της μεθυλίωσης της αδενίνης της θέσης A2058. Η θέση αυτή είναι κοινή και για τις τρεις κατηγορίες αντιβιοτικών και με τη μεσολάβηση των γονιδίων *erm* η αντοχή είναι διασταυρούμενη, δημιουργώντας τον φαινότυπο MLS_B . Ενδιαφέρον είναι ότι η έκφραση του φαινοτύπου αυτού μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή ή επαγόμενη. Στην επαγόμενη μορφή μια μακρολίδη είναι ο επαγωγέας, η παρουσία της οποίας μετατρέπει τα

ανενεργά μόρια mRNA που έχουν παραχθεί σε ενεργά μόρια μεθυλάσης. Από την άλλη πλευρά, στην ιδιοσυστασιακή μορφή αντοχής η έκφραση της μεθυλάσης δεν εξαρτάται από μόριο επαγωγέα. Για την ανίχνευση του ιδιοσυστασιακού ή επαγόμενου φαινοτύπου πραγματοποιείται η μέθοδος D-test (εικ. 10).



Εικόνα 10 Μέθοδος D-test (cMLS_B: ιδιοσυστασιακός φαινότυπος, iMLS_B: επαγόμενος φαινότυπος)

1.5. Φορεία και Λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα

1.5.1. Φορεία

Ο άνθρωπος αποτελεί την κύρια φυσική δεξαμενή του *S. aureus* και παρά το γεγονός ότι πολλές περιοχές του ανθρώπινου σώματος μπορούν να αποικιστούν, η πλέον συχνή θέση ανάπτυξης του *S. aureus* είναι οι πρόσθιες ρινικές κοιλότητες (ρώθωνες) [14]. Άλλες σημαντικές θέσεις αποικισμού είναι ο φάρυγγας, το περίνεο, το δέρμα, ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο κόλπος και οι μασχάλες [13, 25]. Με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειών, η συχνότητα ανέρχεται περίπου στο 35% για τους ρώθωνες, 20% για το περίνεο και 5-10% για τις μασχαλιαίες κοιλότητες και τα μεσοδακτύλια διαστήματα των ποδών [27]. Με το πέρασμα των χρόνων έχουν διακριθεί 3 πρότυπα αποικισμού. Περίπου το 20% του γενικού πληθυσμού φέρουν ένα συγκεκριμένο στέλεχος και ονομάζονται χρόνιοι φορείς, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού (περίπου 60%) είναι περιστασιακοί, παροδικοί φορείς (transient) ή εμφανίζουν περιόδους φορείας (intermittent) και οι κλώνοι που φέρουν μπορούν να αλλάζουν με ποικίλη συχνότητα. Υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού (περίπου 20%), το οποίο δεν φέρει στέλεχος *S. aureus* (persistent non-carriers) [27, 28]. Η διάκριση των δύο πρώτων καταστάσεων είναι σημαντική γιατί τα άτομα με εμμένουσα φορεία έχουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο με

αποτέλεσμα την αυξημένη διασπορά του *S. aureus* στο περιβάλλον, ενώ εμφανίζουν και υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης ενδογενών λοιμώξεων [1]. Επομένως, τα άτομα με εμμένουσα φορεία αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης του *S. aureus* με συνέπεια τον παροδικό αποικισμό άλλων ατόμων. Η ικανότητα του *S. aureus* να αποικίζει μόνιμα ή περιστασιακά έχει προκαλέσει ερωτήματα όπως για το αν τα στελέχη των χρόνιων φορέων εμφανίζουν χαρακτηριστικά που να τα διαχωρίζουν από τα στελέχη των περιστασιακών φορέων. Ωστόσο, οι επιστήμονες χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα τεχνικών μέσων, δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να διαχωρίζουν τα στελέχη αυτών των δύο ομάδων φορείας [30].

Παράλληλα, ο *S. aureus* αποικίζει σε πολλά είδη ζώων συμπεριλαμβανομένων των κατοικίδιων και των κτηνοτροφικών ζώων, τα οποία πιθανόν να παίζουν ρόλο στον αποικισμό των ανθρώπων από στελέχη *S. aureus* και αντίστροφα [31]. Τα στελέχη που απομονώνονται από ζώα ανήκουν συνήθως σε διαφορετικούς κλώνους σε σχέση με αυτά που ανευρίσκονται στους ανθρώπους. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι παθογόνο που προκαλεί επιδημία σε μια χώρα, μπορεί εύκολα να μεταδοθεί σε μια άλλη μέσω αποικισμένων ζώων, τροφίμων, ανθρώπων [32]. Η σταφυλοκοκκική φορεία των ζώων είναι αλληλένδετη με εκείνη των ανθρώπων ειδικά όσων είναι ιδιοκτήτες ζώων, ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό κλινικών, προσωπικό χειρισμού προϊόντων ζωικής προέλευσης [33]. Λόγω του πολύ μεγάλου πληθυσμού τους, τα ζώα κτηνοτροφίας απαρτίζουν μια τεράστια δεξαμενή οποιουδήποτε παθογόνου, συμπεριλαμβανομένου και του *S. aureus*. Αν και η μεγαλύτερη πηγή πιθανής λοίμωξης από το συγκεκριμένο παθογόνο είναι οι ρινικές κοιλότητες του ανθρώπου, η δεύτερη μεγαλύτερη δεξαμενή θα μπορούσε να είναι οι αγελάδες [34].

Ο *S. aureus* μεταδίδεται συνήθως μέσω της στενής σωματικής επαφής και πιο σπάνια μέσω περιβαλλοντικών πηγών, όπως είναι τα άψυχα αντικείμενα και ο αέρας, τόσο στην κοινότητα όσο και στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας. Τα στελέχη του *S. aureus* εισάγονται στα νοσηλευτικά ιδρύματα μέσω αποικισμένων ή νοσούντων ασθενών, οι οποίοι αποτελούν την κύρια δεξαμενή διασποράς του μικροβίου και σπάνια από τους επαγγελματίες υγείας, τα ποσοστά φορείας των οποίων είναι παρόμοια με εκείνα που ανευρίσκονται μεταξύ των ενηλίκων στο γενικό πληθυσμό [7]. Τα αντικείμενα που συχνά επιμολύνονται περιλαμβάνουν κλινοσκεπάσματα, ρούχα, συσκευές, καθώς και τον ιατρικό εξοπλισμό. Στην κοινότητα συνήθεις παράγοντες που ευνοούν τη μετάδοση του *S. aureus* είναι ο συνωστισμός, η συχνή σωματική επαφή, η συμμετοχή σε δραστηριότητες που έχουν ως αποτέλεσμα εκδορές ή παραβίαση του φραγμού του δέρματος, η κοινή χρήση δυνητικά μολυσμένων προσωπικών αντικειμένων και οι κακές συνθήκες ατομικής υγιεινής. Για αυτό, τα παιδιά και οι έφηβοι

εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά φορείας από τους ενήλικες, ενώ η φορεία στους τελευταίους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (ηλικία, κατάσταση υγείας, χρόνιες ασθένειες) [1].

Η διαπίστωση σχέσης μεταξύ της ρινικής φορείας και της ανάπτυξης λοίμωξης από *S. aureus* επιβεβαιώθηκε από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι απέδειξαν ότι το στέλεχος *S. aureus* που ανευρίσκεται στους ρώθωνες και το στέλεχος που προκαλεί τη λοίμωξη εμφανίζουν τα ίδια γονοτυπικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι λοιμώξεις αναφέρονται ως «ενδογενείς», αφού οφείλονται σε στελέχη *S. aureus* που προέρχονται από τη βακτηριακή χλωρίδα του ίδιου του ασθενούς. Αντιθέτως, οι «εξωγενείς λοιμώξεις» οφείλονται στη μεταφορά των παθογόνων στελεχών από άλλα άτομα, το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό ή το άψυχο περιβάλλον [35].

1.5.2. Λοιμώξεις

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί ένα παθογόνο υπεύθυνο για ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων και ζωικών ασθενειών [36]. Η εκδήλωση της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης είναι συνάρτηση της αντίστασης του ξενιστή και της λοιμογόνου δύναμης του μικροοργανισμού. Η προστασία του οργανισμού εναντίον του σταφυλόκοκκου βασίζεται κυρίως στην ακεραιότητα του δέρματος και των βλεννογόνων, που αποτελούν τους φραγμούς εισόδου του *S. aureus* στον οργανισμό, όπως επίσης και στον αριθμό και τη λειτουργικότητα των πολυμορφοπύρηνων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν το μικρόβιο [9].

Η σταφυλοκοκκική λοίμωξη, της οποίας συνήθως προηγείται ο αποικισμός, συμβαίνει όταν το μικρόβιο εισέρχεται σε φυσιολογικά στείρες περιοχές μέσω σημείων όπου έχει επέλθει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων, όπως συμβαίνει σε τραυματισμούς, εξελκώσεις, χειρουργικές επεμβάσεις, εγκαύματα ή χρόνιες δερματοπάθειες. Ο πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού τοπικά στο σημείο της βλάβης, υπό την επίδραση των ενζύμων και τοξινών που εκκρίνει, οδηγεί σε περαιτέρω καταστροφή του ιστού, συρροή πολυμορφοπύρηνων, ιστική νέκρωση και σχηματισμό αποστήματος, που χαρακτηρίζει τις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Με το μηχανισμό αυτό και σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του μικροβίου εκδηλώνονται τοπικές λοιμώξεις στο σημείο εισόδου, όπως οι πυώδεις φλεγμονές του δέρματος και των μαλακών μορίων (μολυσματικό κηρίο, θυλακίτιδα, δοθίνας, ψευδάνθρακας, κριθή, παρωνυχία, επιμολύνσεις τραυμάτων, εγκαυμάτων, ψωριασικών, εκζεματοειδών ή άλλων βλαβών που σχετίζονται με χρόνιες δερματοπάθειες), αλλά και σοβαρότερες εν τω βάθει λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία, εμπύημα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, βακτηριαμία) [9]. Επιπλέον, ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να προκαλεί λοιμώξεις και μέσω τοξινών που παράγει, όπως είναι το σύνδρομο της σταφυλοκοκκικής επιδερμικής νεκρόλυσης, το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας και η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση [37].

Επιπλέον, λόγω αυτής της ικανότητας παραγωγής λοιμογόνων παραγόντων (ένζυμα και τοξίνες) αλλά και της ετερογένειας που εμφανίζουν τα στελέχη *S. aureus* το ποσοστό θνησιμότητας σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξηθεί ακόμη και κατά την παρουσία αντιμικροβιακής θεραπείας [38].

Στα ζώα ο *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει πλήθος λοιμώξεων οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το ζώο το οποίο νοσεί και περιλαμβάνουν μαστίτιδα, αρθρίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος [39]. Η μαστίτιδα, που μπορεί να είναι κλινική (σοβαρή) ή υποκλινική (μέτρια), είναι μια σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένου που εμφανίζεται κυρίως σε ζώα γαλακτοπαραγωγής και που προκαλείται συνήθως από βακτηριακή λοίμωξη και αν δεν αντιμετωπιστεί, αποτελεί σοβαρό πρόβλημα με σημαντικές οικονομικές συνέπειες, καθώς υπάρχει αντίκτυπο τόσο στην υγεία του ζώου όσο και στην ποιότητα και ποσότητα του γάλακτος που παράγεται [18]. Αν και διάφορα βακτηριακά παθογόνα μπορούν να προκαλέσουν μαστίτιδα, ο *Staphylococcus aureus* είναι ένας από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες στην μαστίτιδα των αγελάδων, των αιγών και των προβάτων [40]. Ο επιπολασμός της υποκλινικής και κλινικής μαστίτιδας που προκαλείται από το *S. aureus* μπορεί να κυμαίνεται, ανάλογα με την χώρα από 5 έως 50% στα βοοειδή, από 5,6 έως 17% στις κατσίκες και από 5 έως 11% στα πρόβατα [41]. Στους χοίρους, οι οποίοι φαίνεται να έχουν υψηλό ποσοστό αποικισμού από *S. aureus* παρατηρούνται σπάνια, σποραδικά περιστατικά λοιμώξεων όπως δερματίτιδα, λοίμωξη ουροποιητικού και μαστίτιδα, ενώ στα άλογα αναφέρονται ευκαιριακές λοιμώξεις αρθρώσεων, χειρουργικών τομών, δέρματος και μαλακών μορίων [28]. Ο *S. aureus*, επίσης προκαλεί λοιμώξεις στα πουλερικά, κάτι το οποίο έχει αντίκτυπο στην βιομηχανία και κατά συνέπεια στην οικονομία. Επιπλέον, σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης, όπου η κτηνοτροφία κουνελιών αποτελεί μια αναπτυσσόμενη βιομηχανία, έχει γίνει εμφάνιση επιδημιών από στελέχη *S. aureus* τα οποία προκαλούν αποστήματα δέρματος, μαστίτιδα και σηψαιμία [42]. Γενικώς, οι λοιμώξεις μπορεί να είναι ήπιες είτε να εξελίσσονται σε απειλητικές καταστάσεις για τη ζωή του ζώου. Η σοβαρότητα των λοιμώξεων δεν έχει βρεθεί να σχετίζεται αποκλειστικά με την παρουσία ενός συγκεκριμένου λοιμογόνου παράγοντα ή με συνδυασμό παραγόντων [43].

1.6. Διάκριση στελεχών S. aureus: Hospital-associated, HA/ Community-associated, CA/ Livestock-associated, LA

Ο πληθυσμός των στελεχών του *S. aureus* μελετάται συνεχώς αφού αναδύονται συνεχώς στελέχη με νέα χαρακτηριστικά. Πολλές μελέτες έχουν γίνει με στόχο να χαρακτηριστεί ο βακτηριακός πληθυσμός σε σχέση με την κλωνικότητα που παρουσιάζει και τις προγονικές σειρές από τις οποίες έχει προκύψει η καταγωγή του.

Ένας λόγος για τον οποίο παρατηρήθηκε μεγάλο ενδιαφέρον στο πεδίο των σταφυλόκοκκων αποτέλεσε η εμφάνιση και η αυξανόμενη εξάπλωση του μεθικιλίνη-ανθεκτικού *S. aureus* (MRSA) ως νοσοκομειακό παθογόνο. Τα MRSA στελέχη που εγκαταστάθηκαν στα νοσοκομεία και σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας ονομάστηκαν νοσοκομειακά MRSA στελέχη (*Hospital-Associated MRSA*, HA-MRSA). Μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα τα στελέχη αυτά απέκτησαν αντοχή στα περισσότερα συνήθη αντιμικροβιακά, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των πρώτων πολυανθεκτικών HA-MRSA στελεχών. Έκτοτε οι λοιμώξεις από MRSA, που παρουσιάζουν συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση, έχουν εξελιχθεί σε ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Ωστόσο, τα στελέχη MRSA δεν περιορίζονται μόνο στους χώρους παροχής υγειονομικής περίθαλψης, καθώς εμφάνιση αυτών έχει γίνει και στην κοινότητα (*Community-Associated MRSA*, CA-MRSA), σε κατά τα άλλα υγιή άτομα χωρίς να έχουν ιστορικό επαφής με το σύστημα υγείας. Τα στελέχη αυτά ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους και εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο αντοχής σε σχέση με τα HA-MRSA στελέχη. Εκτός όμως από την παρουσία των στελεχών MRSA στο περιβάλλον του νοσοκομείου και της κοινότητας, τα τελευταία χρόνια ανάδυση αυτών έχει γίνει και στον χώρο της κτηνοτροφίας (*Livestock-Associated MRSA*, LA-MRSA), υποδηλώνοντας την ικανότητα του *S. aureus* να αποικίζει σε διάφορους ξενιστές. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ορισμένα στελέχη LA-MRSA έχουν την ικανότητα να αποικίζουν στους ανθρώπους και ότι από την πλευρά τους οι άνθρωποι αποτελούν μια σημαντική πηγή νέων παθογόνων στελεχών που επηρεάζουν τα ζώα. Η ικανότητα αυτή έχει προκαλέσει σύγχυση και ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα, καθώς τα LA-MRSA θα μπορούσαν να αποτελούν μια πιθανή δεξαμενή νέων μολυσματικών στελεχών που επηρεάζουν τον άνθρωπο ή ακόμη και να προκαλέσουν ζωνοσέες ασθένειες σε αυτόν [42]. Τις τελευταίες δεκαετίες τα ποσοστά MRSA αυξάνονται ταχύτατα παγκοσμίως και είναι πλέον ενδημικά στις περισσότερες περιοχές, με τη διάδοση των κλώνων HA-MRSA να χρονολογείται από τη δεκαετία του 1960, των κλώνων CA-MRSA από τη δεκαετία του 1990 και των κλώνων LA-MRSA από τη δεκαετία του 2000 [11].

1.6.1. Hospital-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, HA-MRSA

Ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο τη δεκαετία του 1960 και έκτοτε ενδημεί στα νοσοκομεία όλου του κόσμου (*Hospital-associated MRSA*, HA-MRSA), όπου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων. Σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC), ως νοσοκομειακά MRSA (HA-MRSA) ορίζονται τα στελέχη που απομονώνονται: i) από καλλιέργειες που λαμβάνονται σε περισσότερο από 48 ώρες μετά την εισαγωγή του ασθενή στο νοσοκομείο, ii) από άτομα με προηγούμενο ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης από MRSA, iii) από ασθενείς με ιστορικό

προηγούμενης νοσηλείας, διαμονής σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας, αιμοκάθαρσης ή χειρουργικής επέμβασης κατά τη διάρκεια του προηγούμενου έτους ή iv) από ασθενείς που φέρουν διαδερμικούς καθετήρες ή άλλες ιατρικές συσκευές, όπως τραχειοστομία, γαστροστομία, ουροκαθετήρα. Τα στελέχη τα οποία δεν πληρούν τον παραπάνω ορισμό χαρακτηρίζονται ως MRSA της κοινότητας (*Community-associated MRSA, CA-MRSA*).

Τα στελέχη που σχετίζονται με το νοσοκομειακό περιβάλλον (HA-MRSA) συνήθως φέρουν τις μεγαλύτερες σε μέγεθος χρωμοσωμικές κασέτες *mec I, II, III*. Το πρώτο στέλεχος MRSA που απομονώθηκε το 1961 στο Ηνωμένο Βασίλειο, περιλάμβανε SCC*mec* τύπου I, ένας κλώνος ο οποίος εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960 και αποτέλεσε τον αρχέγονο κλώνο των MRSA. Το 1982, ένα στέλεχος MRSA με SCC*mec* τύπου II ανακαλύφθηκε στην Ιαπωνία και το 1985 στη Νέα Ζηλανδία, ανακαλύφθηκε ένα στέλεχος MRSA που περιείχε SCC*mec* τύπου III. Οι τύποι II και III έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, αφού φέρουν πρόσθετα γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε πολλά αντιμικροβιακά. Η ανάπτυξη αυτών των πολυανθεκτικών στελεχών παρέχει στα HA-MRSA τη δυνατότητα επιβίωσης στο περιβάλλον του νοσοκομείου, όπου η αυξημένη κατανάλωση αντιβιοτικών και η χρήση αντισηπτικών ασκούν «πίεση επιλογής» στα μικρόβια [44].

Έχουν γίνει προσπάθειες καταγραφής της επιδημιολογίας των HA-MRSA, κάτι το οποίο όμως δεν είναι απόλυτα σωστό καθώς τα επιδημιολογικά δεδομένα από ξεχωριστές μελέτες συνήθως δεν μπορούν να συγκριθούν λόγω των διαφορών στο σχεδιασμό των μελετών και στο πληθυσμό από τον οποίο απομονώνονται τα στελέχη. Ωστόσο, τα υψηλότερα ποσοστά (>50%) έχουν καταγραφεί στην βόρεια και νότια Αμερική, την Ασία και τη Μάλτα. Ενδιάμεσα ποσοστά (25-50%) έχουν αναφερθεί στην Κίνα, την Αυστραλία, την Αφρική και σε κάποιες χώρες της Ευρώπης (π.χ. Πορτογαλία, Ελλάδα, Ιταλία και Ρουμανία), ενώ στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες εμφανίζονται γενικώς χαμηλά ποσοστά (π.χ. Ολλανδία και Σκανδιναβία). Η επικράτηση των HA-MRSA τα τελευταία χρόνια έχει μειωθεί σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, όπως για παράδειγμα στην Αγγλία, την Αυστρία, τη Γαλλία, την Ιρλανδία και την Ελλάδα, ενώ σε άλλες έχει παραμείνει σταθερή. Οι πιο συχνά αναφερόμενοι κλώνοι από το 1961 έως το 2008 ανήκουν σε πέντε κλωνικά συμπλέγματα (*Clonal Complexes, CC*) και είναι τα CC5, CC8, CC22, CC30 και CC45. Καθένα από αυτά περιλαμβάνει διάφορους κλώνους, οι οποίοι είναι διαφορετικά κατανεμημένοι σε πολλές χώρες ή/και περιοχές σε ολόκληρο τον κόσμο [11].

Σύμφωνα με τις διάφορες μεθόδους μοριακής τυποποίησης βρέθηκε ότι οι πέντε πανδημικοί HA-MRSA κλώνοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν πάνω από το 70% των HA-MRSA στελεχών είναι: ο Iberian (ST247-MRSA-IA), ο Brazilian (ST239-MRSA-IIIa), ο Hungarian (ST239-MRSA-III), ο New York / Japan (ST5-MRSA-II) και ο Pediatric (ST5-MRSA-IV). Εκτός, όμως, από

αυτούς τους κλώνους (major clones), υπάρχουν και άλλοι οι οποίοι φαίνεται ότι περιορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (minor clones) ή απομονώνονται από ένα μικρό αριθμό ασθενών (sporadic clones), αν και λίγα γνωρίζουμε για αυτούς και τη δυναμική της εξάπλωσής τους.

Οι λοιμώξεις από HA-MRSA εμφανίζονται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και περιλαμβάνουν κυρίως βακτηριαιμία, πνευμονία και συν-λοιμώξεις μαζί με άλλους μικροοργανισμούς (παράγοντες) του νοσοκομείου [1, 18]. Παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι σχετίζονται και με λοιμώξεις στις παιδιατρικές και νεογνικές μονάδες εντατικής θεραπείας [26].

1.6.2. Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, CA-MRSA

Το 1982 στο Michigan απομονώθηκε το πρώτο MRSA στέλεχος από ασθενείς που έκαναν χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών, χωρίς προηγούμενη επαφή με το νοσοκομειακό περιβάλλον. Έκτοτε και κυρίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 παρατηρήθηκε μία μεγάλη αύξηση του αριθμού των λοιμώξεων, ιδιαίτερα των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων, από στελέχη MRSA σε άτομα στην κοινότητα, χωρίς προηγούμενη επαφή με το σύστημα υγείας. Η αύξηση αυτή σχετίστηκε με την εμφάνιση νέων MRSA στελεχών, των αποκαλούμενων MRSA της κοινότητας (*Community Associated MRSA*, CA-MRSA), τα οποία εξαπλώθηκαν γρήγορα μεταξύ του γενικού πληθυσμού στα περισσότερα μέρη του κόσμου προσβάλλοντας άτομα με ή χωρίς προηγούμενη έκθεση στο σύστημα παροχής υγειονομικής περίθαλψης. Αρχικά θεωρήθηκε ότι τα στελέχη CA-MRSA προήλθαν από τα νοσοκομεία και μεταφέρθηκαν στην κοινότητα, αλλά γενικά πιστεύεται ότι τα περισσότερα αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα και ως εκ τούτου αποτελούν μια ανησυχητική νέα εξέλιξη [28].

Λόγω της εμφάνισης των MRSA της κοινότητας και της ανάγκης διάκρισής τους από τα νοσοκομειακά στελέχη, το 2000 το κέντρο ελέγχου πρόληψης νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC) όρισε ως CA-MRSA τα στελέχη τα οποία απομονώνονται από ασθενείς στην κοινότητα ή εντός 48 ωρών από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο και οι οποίοι στερούνται παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Έτσι, αυτοί οι ασθενείς δεν πρέπει να έχουν ιστορικό λοίμωξης ή φορείας από MRSA ή ιστορικό νοσηλείας κατά τη διάρκεια του προηγούμενου ενός έτους, ούτε αιμοκάθαρσης, χειρουργικής επέμβασης, μόνιμου καθετήρα ή ιατρικών προσθετικών υλικών [43, 44]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η διάκριση μεταξύ των CA-MRSA και των HA-MRSA στελεχών γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη, καθώς τα CA-MRSA στελέχη έχουν πλέον εισέλθει και στον χώρο της υγειονομικής περίθαλψης, θολώνοντας τη γραμμή μεταξύ στελεχών της «κοινότητας» και του «νοσοκομείου» [13, 41].

Σε σύγκριση με τα HA-MRSA στελέχη, τα CA-MRSA έχουν αρκετά διακριτά χαρακτηριστικά. Συνήθως φέρουν τους μικρότερους σε μέγεθος SCCmec τύπους IV, V ή VII, είναι ανθεκτικά σε λιγότερες ομάδες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών σε σχέση με τα HA-MRSA και συνήθως φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL) [46]. Οι μικρότεροι σε μέγεθος SCCmec τύποι φαίνεται ότι παρέχουν στα στελέχη αυτά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τους τύπους SCCmec που φέρουν τα HA-MRSA [19]. Σε αντίθεση με τα HA-MRSA στελέχη, τα CA-MRSA είναι ευαίσθητα στα περισσότερα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά και αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του SCCmec τύπου IV, ο οποίος στερείται γονιδίων που προσδίδουν αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά. Επιπλέον, η ευαισθησία σε περισσότερες από δύο κατηγορίες μη β-λακταμικών αντιβιοτικών έχει χρησιμοποιηθεί από κάποιους ως κριτήριο για την αναγνώριση των CA-MRSA στελεχών. Θεωρείται επίσης ότι η έλλειψη γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά πιθανόν οφείλεται στην χαμηλότερη «εξελικτική επιλογή» που εμφανίζεται στην κοινότητα σε σύγκριση με τους χώρους υγείας [7]. Τα CA-MRSA στελέχη εμφανίστηκαν στην κοινότητα λόγω της οριζόντιας μεταφοράς των SCCmec τύπων IV και V, των γονιδίων της PVL, καθώς και άλλων λοιμογόνων παραγόντων και γονιδίων αντοχής στο γονιδίωμα ήδη ευρέως διαδεδομένων MSSA κλώνων. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι τα στελέχη CA-MRSA που επικρατούν σήμερα έχουν αναπτυχθεί μετά από πολλές δεκαετίες πολύπλοκης εξέλιξης .

Από τότε που ο MRSA αναγνωρίστηκε ως παθογόνο ικανό να προκαλεί λοιμώξεις στην κοινότητα, επιδημίες από CA-MRSA έχουν περιγραφεί σε διάφορες ομάδες πληθυσμών, που περιλαμβάνουν τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, τους αυτόχθονες κατοίκους διαφόρων περιοχών, τους κρατούμενους σε σωφρονιστικά ιδρύματα, τους ομοφυλόφιλους, τους συμμετέχοντες σε ομαδικά αθλήματα, τους εργαζόμενους σε βρεφονηπιακούς σταθμούς, τους επιζώντες φυσικών καταστροφών, τα παιδιά, το στρατιωτικό προσωπικό και τα άτομα χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου [28]. Παρόλο που αυτές οι ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους, μοιράζονται κοινούς παράγοντες κινδύνου οι οποίοι πιθανόν αποτελούν τη βάση της μετάδοσης του MRSA στην κοινότητα. Τα CA-MRSA προκαλούν διακριτά κλινικά σύνδρομα μεταξύ των οποίων οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων αποτελούν τις πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις. Άλλες λοιμώξεις που σχετίζονται με τα CA-MRSA στελέχη είναι η νεκρωτική πνευμονία, η σηπτική θρομβοφλεβίτιδα, η οστεομυελίτιδα και η σοβαρή σήψη [19].

Οι επικρατέστεροι CA-MRSA κλώνοι παγκοσμίως είναι ο ST1 (USA400), ο ST8 (USA300), ο ST80 (European clone), ο ST30, ο ST59 και ο ST93, ορισμένοι από τους οποίους έχουν καταφέρει επιτυχώς να διεισδύσουν στους χώρους υγείας σε πολλές περιοχές στον κόσμο [11].

Μία μελέτη απέδειξε ότι ο κοινός πρόγονος από τον οποίον προέκυψαν τα στελέχη HA-MRSA και CA-MRSA ήταν ο ST30-MSSA, PVL θετικό, ο οποίος εμφανίστηκε την δεκαετία του 1950 παγκοσμίως, τόσο στα νοσοκομεία όσο και στην κοινότητα αλλά εξαλειφθηκε ως επι το πλείστον κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960 [44]. Παρόλο που ένας μικρός αριθμός περιπτώσεων CA-MRSA σημειώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, μόνο από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 τα στελέχη CA-MRSA έχουν εδραιωθεί σταθερά στην κοινότητα [28].

Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί δραματική αύξηση των CA-MRSA στελεχών και μάλιστα εκείνων που παράγουν την PVL. Ο επικρατέστερος CA-MRSA κλώνος είναι ο Ευρωπαϊκός κλώνος ST80-IV, ο οποίος παράγει PVL και σχετίζεται κατεξοχήν με λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, ενώ ενοχοποιείται και για άλλες σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις [45, 46].

Παρά την παγκόσμια αύξηση των λοιμώξεων από στελέχη CA-MRSA, τα ποσοστά φορέας MRSA στον υγιή πληθυσμό παραμένουν χαμηλά. Ωστόσο, η δραματική αύξηση του ποσοστού των MRSA στελεχών στην κοινότητα σε συνδυασμό και με την ικανότητα ανάπτυξης πολυανθεκτικότητας, διατηρούν αυτά τα στελέχη στην πρώτη γραμμή του ιατρικού ενδιαφέροντος τις τελευταίες δεκαετίες. Ακόμα και στις Σκανδιναβικές χώρες και την Ολλανδία, όπου ο επιπολασμός του HA-MRSA είναι πολύ χαμηλός, οι λοιμώξεις από CA-MRSA στελέχη έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, παρά την αυστηρή εφαρμογή πολιτικών ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών και στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων [49].

1.6.3. Livestock-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, LA-MRSA

Το τελευταίο μέχρι στιγμής στάδιο στην εξέλιξη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* είναι η εμφάνιση του στα ζώα. Οι πρώτες αναφορές σε ζώα έγιναν στις αρχές της δεκαετίας του 1970, όταν απομονώθηκαν τα πρώτα στελέχη MRSA από αγελάδες με μαστίτιδα στο Βέλγιο [50]. Αυτά τα στελέχη τότε χαρακτηρίστηκαν ως σχετιζόμενοι με την κτηνοτροφία MRSA (*Livestock-associated MRSA*, LA-MRSA). Υπήρξε τότε η υπόθεση ότι η εμφάνιση των εν λόγω στελεχών αποτέλεσε συνέπεια της χορήγησης αντιβιοτικών στα ζώα και έτσι δεν μελετήθηκαν οι επιπτώσεις τους στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια όμως, τα κρούσματα που έχουν καταγραφεί από τέτοια στελέχη έχουν αυξηθεί τόσο όσον αφορά τα ζώα συντροφιάς και εκτροφής όσο και τον άνθρωπο. Ο Βρετανός επιστήμονας Dr Andrew Waller χαρακτήρισε αυτά τα στελέχη ως «η δημιουργία ενός νέου τέρατος» [28].

Η επιδημιολογία των στελεχών αυτών προκάλεσε το ερώτημα αν τα στελέχη μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο ή αντίστροφα ή αν προέρχονται από κάποια κοινή πηγή [26]. Στελέχη

LA-MRSA τα οποία αρχικά απομονώθηκαν στο Βέλγιο, ακολούθως αναφέρθηκαν και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης όπως Γερμανία, Ολλανδία, Γαλλία. Η εξάπλωσή τους όμως ξεπέρασε τα όρια της Ευρώπης όπου πρωτοαναφέρθηκαν οπότε και υπήρξαν περιστατικά σε Καναδά, Η.Π.Α, Κίνα, Μαλαισία και Κορέα [51].

Η ομάδα αυτή *S. aureus* έχει διακριτά χαρακτηριστικά: i) δεν τυποποιούνται με το περιοριστικό ένζυμο SmaI με PFGE, ii) τα περισσότερα στελέχη που έχουν τυποποιηθεί βάσει της MLST μεθόδου ανήκουν στο κλωνικό σύμπλεγμα CC398, iii) η σταφυλοκοκκική κασέτα SCCmec που ανευρίσκεται στα στελέχη αυτά είναι διαφορετική από εκείνες που βρίσκονται στα CA-MRSA και HA-MRSA στελέχη, iv) συνήθως έχουν αντοχή σε μη β-λακταμικά αντιβιοτικά κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται κατεξοχήν στην κτηνοτροφία και v) σπάνια ανευρίσκονται στα στελέχη γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τοξίνες όπως η PVL ή εντεροτοξίνες [52]. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στο διαχωρισμό της ομάδας αυτής των σταφυλόκοκκων επιτρέποντας την ευκολότερη αναγνώρισή τους.

Η εμφάνιση των στελεχών αυτών, αρχικά, συσχετίστηκε με την χορήγηση αντιβιοτικών σε ζώα, τα οποία χρησιμοποιούνται στον χώρο της κτηνοτροφίας τόσο για την πρόληψη λοιμώξεων όσο και για την θεραπεία νοσούντων ζώων [53]. Επίσης, η επαφή με ζώα αποτελεί παράγοντα κινδύνου αποικισμού ή λοίμωξης από *S. aureus* για τον άνθρωπο, τόσο για το προσωπικό που εργάζεται σε φάρμες, το κτηνιατρικό προσωπικό αλλά και τους συγγενείς τους με τους οποίους έρχονται σε επαφή [54]. Η επίπτωση των LA-MRSA στον άνθρωπο ποικίλλει σε διάφορες μελέτες, γεγονός που θέτει υπό διερεύνηση τον παράγοντα κινδύνου της επαφής με ζώα.

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί το CC398, το οποίο βρέθηκε ότι αποτελεί το μεγαλύτερο κλωνικό σύμπλεγμα που βρέθηκε στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική [55]. Στις αρχές της δεκαετίας του 2000 αναγνωρίστηκε ένα στέλεχος *S. aureus* το οποίο απομονώθηκε από μη σχετιζόμενα μεταξύ τους περιστατικά αλλά με κοινό χαρακτηριστικό την γειννίαση σε φάρμες χοίρων. Το συγκεκριμένο στέλεχος δεν ήταν δυνατό να τυποποιηθεί με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) με το περιοριστικό ένζυμο SmaI, αναγνωρίστηκε ως νέος τύπος MRSA ST398 και χαρακτηρίστηκε αντιπροσωπευτικός της ομάδας των LA-MRSA στελεχών. Παρατηρείται περιστασιακά στην Ασία και επίσης εντοπίστηκε στην Αφρική. Η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος έχει δείξει ότι αυτός ο κλώνος προήλθε από ανθρώπους, στους οποίους όμως εμφανίζεται κυρίως ως MSSA, αν και με χαμηλό επιπολασμό [51]. Η εμφάνιση του MSSA και MRSA ST398 στους ανθρώπους αρχικά θεωρήθηκε ότι δεν αποτελεί παθογόνο. Ωστόσο, ο ST398 MSSA αναφέρθηκε ως αιτιολογικός παράγοντας νεκρωτικής πνευμονίας σε άτομα τα οποία δεν είχαν άμεση επαφή με ζώα και ο ST398 MRSA βρέθηκε να σχετίζεται με περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας και πνευμονίας [51, 53]. Αναφορά του *S.*

aureus τύπου ST398 σε δύο περιστατικά ασθενών έχει γίνει και στην Ελλάδα [57]. Η συνολική ανάλυση των στελεχών του CC398 ανέδειξε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η μεταπήδηση του *S. aureus* από τους ανθρώπους στα ζώα συνοδεύτηκε από την απώλεια γονιδίων που προσέδιδαν μολυσματική ικανότητα στα στελέχη και απόκτηση γονιδίων αντοχής εναντι της μεθικιλίνης και της τετρακυκλίνης [55, 56]. Επιπλέον τα στελέχη αυτά εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τις αμινογλυκοσίδες [60].

Οι πρώτες αναφορές στελεχών LA-MRSA αφορούσαν χοίρους στην Ολλανδία, στους οποίους όμως η ύπαρξη του μικροοργανισμού δεν συνοδευόταν από εμφάνιση συμπτωμάτων ή νόσου, ο αποικισμός τους όμως λειτούργησε επιτυχώς ως δεξαμενή για τη μετάδοση του βακτηρίου. Η πιθανολογούμενη οδός εξάπλωσης είναι μέσω των εξαγωγών σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες μεγάλων ποσοτήτων χοιρινού κρέατος και προϊόντων κρέατος καθώς και η εξαγωγή ζωντανών μικρών χοίρων για εκτροφή προς άλλες χώρες όπως η Γερμανία, η Ιταλία, η Ισπανία, το Βέλγιο, η Ρουμανία, η Ουγγαρία, η Κροατία και η Πολωνία. Έτσι ακολούθως, η παρουσία των LA-MRSA σε χοίρους επισημάνθηκε στη Γερμανία, το Βέλγιο, τη Γαλλία αλλά και τον Καναδά και τις Η.Π.Α.. Στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική τα εν λόγω στελέχη ανήκουν κατά πλειοψηφία στο κλωνικό σύμπλεγμα CC398, ενώ στην Ασία παρουσιάστηκε ο τύπος ST9 [51]. Όσον αφορά την κατηγορία των βοοειδών, η εμφάνιση LA-MRSA έγινε στο Βέλγιο όταν απομονώθηκαν από ζώα γαλακτοπαραγωγής με μαστίτιδα. Τα τελευταία χρόνια, τέτοια στελέχη έχουν απομονωθεί και σε άλλες χώρες όπως η Κορέα, η Ουγγαρία, το Μεξικό, η Ολλανδία, η Βραζιλία, η Ιταλία, το Πακιστάν, η Τουρκία και βρέθηκαν να ανήκουν και σε άλλους κλώνους πέραν του CC398. Τα αιγοπρόβατα αν και αποτελούν μεγάλο κομμάτι της κτηνοτροφικής παραγωγής, δεν έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό επιπολασμού MRSA σε αυτά ίσως λόγω της μειωμένης χρήσης αντιμικροβιακών παραγόντων σε σχέση με τους χοίρους, τα βοοειδή και τα πουλερικά. Τέλος, από τα πουλερικά έχουν απομονωθεί στελέχη LA-MRSA, τόσο από ζωντανά όσο και από προϊόντα προς κατανάλωση (με βάση το κρέας τους). Η τυποποίηση των στελεχών που έχουν συσχετιστεί με τα παραπάνω εκτός του CC398 περιλαμβάνουν και το CC5, το οποίο αποτελεί ένα κλωνικό σύμπλεγμα που ανευρίσκεται σε μεγάλο βαθμό και στους ανθρώπους. Γενικώς, έχει παρατηρηθεί ότι τα στελέχη που απομονώνονται από ζώα κτηνοτροφίας ανήκουν σε έναν μικρό αριθμό κλωνικών συμπλεγμάτων, τα οποία σχετίζονται συνήθως μόνο με ζώα, συμπεριλαμβανομένων των CC97, CC133, CC130, CC126, CC398 και CC705 [42].

Τα LA-MRSA στελέχη συναντώνται επίσης και στα ζώα συντροφιάς. Τα πρώτα κρούσματα αφορούσαν λοιμώξεις αιτία των οποίων ήταν MRSA στελέχη που προέρχονταν από γάτες και σκύλους. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα στελέχη ήταν συνήθως παρόμοια ή ταυτόσημα με

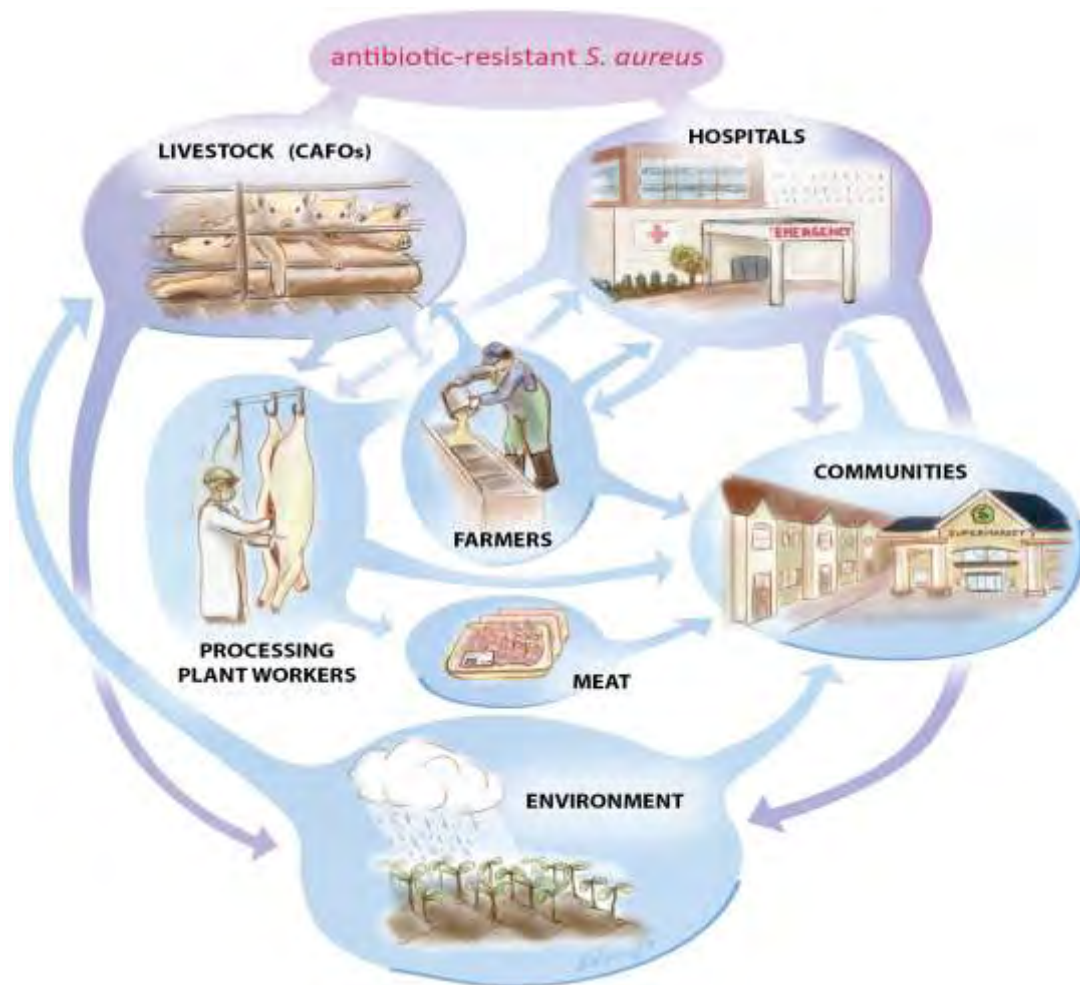
αυτά που μολύνουν τους ανθρώπους και η πιο προφανής εξήγηση για αυτό το νέο κτηνιατρικό πρόβλημα ήταν και εξακολουθεί να είναι ότι τα κατοικίδια ζώα απέκτησαν τα ανθεκτικά βακτήρια από τον άνθρωπο [28]. Σε μια πρόσφατη μελέτη χαρακτηρισμού στελεχών *S. aureus* σε ζώα συντροφιάς στην Ελλάδα, κυρίαρχος αναδείχθηκε ο κλώνος ST80 ο οποίος ανευρίσκεται ως παθογόνο στο περιβάλλον του νοσοκομείου και της κοινότητας. Στη συγκεκριμένη μελέτη, υπήρξαν στελέχη CC398 τα οποία απομονώθηκαν από ζώα συντροφιάς που δεν είχαν επαφή με παραγωγικά ζώα, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα εύρεσης αυτού του τύπου *S. aureus* [32].

Η οδός μετάδοσης του *S. aureus* μεταξύ των ζώων εκτροφής και του ανθρώπου μπορεί να γίνει με άμεση επαφή με το ζώο, μέσω περιβαλλοντικής επιμόλυνσης και με την κατανάλωση ή τον χειρισμό μολυσμένων τροφίμων [28]. Όπως ισχύει και για τη μετάδοση μεταξύ των ανθρώπων, η άμεση επαφή παίζει σπουδαίο ρόλο. Οι άνθρωποι που εργάζονται σε φάρμες, οι κτηνίατροι καθώς και το προσωπικό κτηνιατρικών κλινικών αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου. Εκτός αυτών όμως έχει δειχθεί ότι και άνθρωποι που έχουν έμμεση επαφή είναι σε μεγάλο ποσοστό αποικισμένοι, όπως οι κάτοικοι των περιοχών όπου βρίσκονται φάρμες εκτροφής, συγγενείς ανθρώπων που εργάζονται σε αυτές ή επισκέπτες [61]. Επιπλέον, εκτός από την άμεση επαφή, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2003, ο Dr John Lee κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα MRSA στα ζώα είναι «μια πιθανή πηγή ανθρωπίνων λοιμώξεων, προκαλούμενη από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων». Η μετάδοση μεταξύ των ανθρώπων και των ζώων συντροφιάς είναι διαφορετική σε σχέση με τα προαναφερθέντα για τα ζώα εκτροφής. Η διαφορετική επιδημιολογία των *S. aureus* που αναφέρθηκε παραπάνω δίνει την απάντηση, αφού στα ζώα συντροφιάς ανευρίσκονται κυρίως οι κλώνοι που κυκλοφορούν μεταξύ των ανθρώπων, συνεπώς η μετάδοση γίνεται αμφίδρομα με άμεση επαφή [28].

Μοριακές μελέτες δείχνουν ότι ο ανασυνδυασμός είναι πιο συνηθισμένος σε στελέχη που απομονώνονται από ζώα, ενώ τα στελέχη που απομονώνονται από ανθρώπους εμφανίζουν μεγαλύτερη γενετική σταθερότητα [62]. Συνεπώς, αν και πολλά στελέχη LA-MRSA δεν έχουν εμφανισθεί στους ανθρώπους, η ικανότητα των *S. aureus* να αποκτούν νέα γονίδια και να προσαρμόζονται σε όλο και περισσότερους ξενιστές αποτελεί μια ανησυχητική εξέλιξη [52].

Συνοψίζοντας, ο ανθεκτικός στα αντιμικροβιακά *S. aureus* αποτελεί μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, ο εντοπισμός της προέλευσης του βακτηρίου αποτελεί μια ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία. Τα αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι τα ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη *S. aureus* μπορούν να εξαπλωθούν σε κτηνοτροφικές επιχειρήσεις και σε νοσοκομεία όπου χρησιμοποιούνται τακτικά αντιβιοτικά και συνεπώς ασκείτε «πίεση επιλογής». Αυτοί οι ανθεκτικοί οργανισμοί μπορούν στη συνέχεια να εξαπλωθούν στην κοινότητα και το περιβάλλον με διάφορους τρόπους (εικ. 11). Συνεπώς, απαιτείται περισσότερη

έρευνα για τον ακριβή προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο πραγματοποιούνται αυτές οι μεταφορές.



Εικόνα 11 Οι τρόποι μετάδοσης των στελεχών HA-MRSA, CA-MRSA και LA-MRSA [63].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

2.1. Στελέχη βακτηρίων

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) όπου μελετήθηκαν συνολικά 34 στελέχη *S. aureus* τα οποία απομονώθηκαν από πρόβατα με εικόνα υποκλινικής μαστίτιδας, από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και συγκεκριμένα:

- 9 στελέχη από τον Ν. Λάρισας (Ελασσόνα, Φάρσαλα, Τέμπη)
- 5 στελέχη από τον Ν. Αχαΐας (Χαλανδρίτσα, Πάτρα)
- 4 στελέχη από τον Ν. Καρδίτσας (Ματαράγκα, Μητρόπολη, Παλαμάς)
- 3 στελέχη από τον Ν. Λακωνίας (Σπάρτη, Μολάοι)
- 2 στελέχη από τον Ν. Λέσβου (Πέτρα, Μεσότοπος)
- 2 στελέχη από τον Ν. Εύβοιας (Αλιβέρι)
- 2 στελέχη από τον Ν. Πρεβέζης (Καναλάκι)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Αιτωλοακαρνανίας (Μεσολόγγι)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Δωδεκανήσων (Ρόδος)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Μαγνησίας (Βελεστίνο)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Πιερίας (Κατερίνη)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Τρικάλων (Τρίκαλα)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Φθιώτιδας (Τιθορέα)
- 1 στέλεχος από τον Ν. Αρκαδίας (Τροπαία)

2.2. Απομόνωση στελεχών

Τα δείγματα παραλήφθησαν στο εργαστήριο καλλιεργημένα σε στερεό θρεπτικό υλικό και συγκεκριμένα σε Mannitol Salt άγαρ από όπου πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ με περιεκτικότητα 5% αίμα προβάτου. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 18-22 ώρες σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C. Την επόμενη ημέρα αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των αποικιών και ακολούθησε η ταυτοποίηση και ο έλεγχος σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.3. Ταυτοποίηση στελεχών *S. aureus*

Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως *S. aureus* σύμφωνα με τη μορφολογία των αποικιών των καλλιεργημάτων όπου μετά από την επώαση εμφανίζονταν οι χαρακτηριστικές για τον *S. aureus* λευκές έως χρυσοκίτρινες αποικίες που περιβάλλονταν από ζώνη αιμολύσεως. Ακολούθησε χρώση Gram, καθώς και οι δοκιμασίες ελέγχου παραγωγής καταλάσης και πηκτάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπως περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω. Παράλληλα, η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2.

2.3.1. Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος [64]. Ο μηχανισμός της χρώσης Gram συνδέεται με τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων και βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετνιακής και διάλυμα Lugol (ιώδιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, γεγονός που αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωμο από τη σαφρανίνη. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως είναι ο *S. aureus*, η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο του κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου της χρωστικής εντός του κυττάρου. Η χρώση κατά Gram είναι σημαντική από κλινικής άποψης, καθώς οι αιτιολογικοί παράγοντες πολλών βακτηριακών μολύνσεων είναι ορατοί μέσω αυτής της μεθόδου [65]. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με τη μεθοδολογία που ακολουθεί:

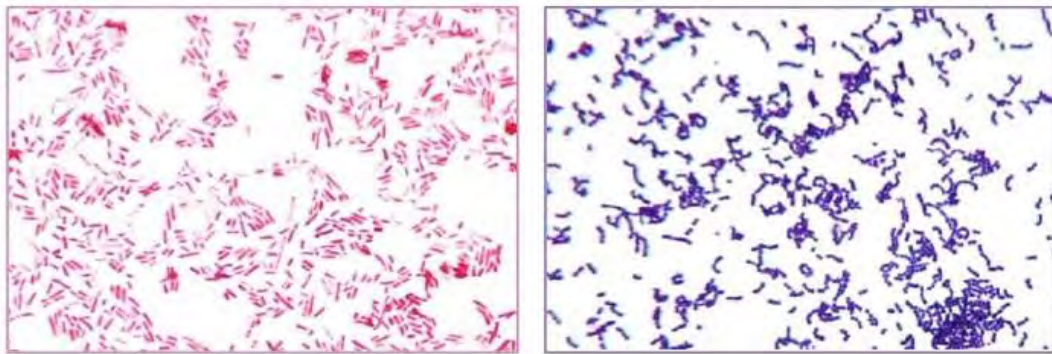
ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H₂O)
- Διάλυμα crystal violet
- Διάλυμα Lugol PVP
- Διάλυμα αποχρωματισμού (αιθανόλη και ακετόνη)
- Διάλυμα safranin

- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Οπτικό μικροσκόπιο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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



Εικόνα 12 Ενδεικτική εικόνα: Μέθοδος χρώσης κατά Gram ενός Gram αρνητικού βακτηρίου (αριστερά) και ενός Gram θετικού βακτηρίου (δεξιά).

2.3.2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης αποτελεί την πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή μεταξύ των Gram θετικών κόκκων. Είναι θετική για τους σταφυλόκοκκους, χαρακτηριστικό που τους διακρίνει από τους στρεπτόκοκκους και τους εντερόκοκκους, οι οποίοι είναι καταλάση αρνητικοί. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 παράγοντας μικρές φυσαλίδες [66]. Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης των υπό μελέτη απομονωθέντων στελεχών της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase με την εξής μέθοδο:

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ID Color Catalase-ASE
- Κρικοφόροι στυλεοί
- Αντικειμενοφόρες πλάκες

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

2.3.3. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης

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

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

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της παραγωγής συνδεδεμένης πηκτάσης, παρουσίας πρωτεΐνης A και άλλων επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, με σκοπό το χαρακτηρισμό των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών ως *S. aureus*. Πρόκειται για μία συγκολλητινοαντίδραση που γίνεται με κυανά σωματίδια latex επικαλυμμένα με ινωδογόνο, IgG κουνελιού και ειδικά αντισώματα επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus*, της τάξεως των IgG ανοσοσφαιρινών. Σε κάθε θετική δοκιμασία για *S. aureus* πραγματοποιούνται: α) η μετατροπή του ινωδογόνου, παρουσία της συνδεδεμένης πηκτάσης, σε ινώδες, β) η αντίδραση του Fc τμήματος της IgG κουνελιού με την πρωτεΐνη A και γ) η δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων

μεταξύ ειδικής IgG και επιφανειακών αντιγόνων του *S. aureus* και το αποτέλεσμα ερμηνεύεται από μία ορατή με γυμνό οφθαλμό αντίδραση συγκόλλησης. Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης πραγματοποιήθηκε με την εξής μεθοδολογία:

ΥΛΙΚΑ

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

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

2.4. Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2

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

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, κατά τον έλεγχο αντοχής ή ευαισθησίας των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus* στους διάφορους αντισταφυλόκοκκικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα αντιβιοτικά οξακιλλίνη (oxacillin), κεφοξιτίνη (cefoxitin),

κλινδαμυκίνη (clindamycin), ερυθρομυκίνη (erythromycin) και τετρακυκλίνη (tetracycline). Τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν ως MRSA ή MSSA ανάλογα με την αντοχή ή την ευαισθησία τους, αντίστοιχα, στα δύο αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά οξακιλλίνη (oxacillin) και κεφοξιτίνη (cefoxitin) ταυτόχρονα, βάσει του αντιβιογράμματος.

II. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατα τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, αρχικά έγινε απομόνωση DNA από τα στελέχη της μελέτης και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μοριακές τεχνικές και συγκεκριμένα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με την οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία των γονιδίων αντοχής καθώς και ο συνδυασμός αυτής με την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA στην τυποποίηση των στελεχών βάσει της μεθόδου MLST.

2.5. Απομόνωση Χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)

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

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

ΥΛΙΚΑ

3. Αιματούχο άγαρ

3. Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer) (Vτ=50 mL):

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 1% Triton X-100
- 1 mM EDTA, pH 8.0

3. Πρωτεϊνάση K (20 mg/mL)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Εναιώρημα βακτηρίων θολερότητας 2 της κλίμακας McFarland σε 1 mL dH₂O από 24ωρη καλλιέργεια, στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αιματούχο άγαρ, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 10000 rpm. Έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 µL λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος και 2 µL πρωτεΐνάσης K και επώασθη για μία ώρα στους 56°C. Μετά το πέρας της επώασης, το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με θέρμανση για 10 λεπτά στους 95°C. Ακολούθησε φύλαξη των δειγμάτων του ληφθέντος DNA στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση και ενίσχυση – πολλαπλασιασμό με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

2.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία βιοχημική *in vitro* αντίδραση, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. Αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 και είναι μία θεμελιώδης και συγχρόνως απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊκών θραυσμάτων σε ένα δείγμα. Το 1989 κρίθηκε ως «η μέγιστη επιστημονική ανακάλυψη της χρονιάς», ενώ μέσα σε λίγα χρόνια και μετά από σημαντικές βελτιώσεις, κυρίως από τον Saiki RK, κατέστη η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση-πολλαπλασιασμό των νουκλεϊκών οξέων, κυρίως του DNA [65].

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

Βασικές αρχές της μεθόδου

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA κατέχει κεντρική θέση στις μελέτες της Μοριακής Ιατρικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται στην

επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Για την επίτευξη αυτού του στόχου απαιτούνται:

- i. **ένα μητρικό μόριο DNA**, το οποίο αποτελεί την αλληλουχία-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο.
- ii. **μία DNA πολυμεράση**, δηλαδή το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στη αντιγραφή του DNA, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση «διαβάξει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5'- 3'. Καμία από τις γνωστές πολυμεράσες δεν έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν *de novo* DNA. Οι πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νουκλεοτίδια μόνο σε προϋπάρχον 3'- OH άκρο, με απαραίτητη την παρουσία αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων. Στη βιολογική δράση αρκετών πολυμερασών, αλλά όχι όλων, συμπεριλαμβάνεται και η επιδιόρθωση των λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (proofreading).
- iii. **αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινητές (*primers*)**, δηλαδή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA.
- iv. **νουκλεοτίδια (*dNTPs*)**, τα οποία είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση.

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

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

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

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

Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Με τη συμπλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ακολούθως ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά. Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους.

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

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

Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου PCR

Η τεχνική της PCR παρουσιάζει τρία κύρια πλεονεκτήματα:

α) χρόνος: με τη χρήση της PCR είναι δυνατό να παραχθούν περισσότερα από 10⁵ αντίγραφα ενός τμήματος DNA, εντός λίγων ωρών. Τα στάδια της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο

της ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και το στάδιο της επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Έτσι, για περίπου 30 κύκλους μίας αντίδρασης PCR απαιτούνται μόλις 3-6 ώρες.

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

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

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

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

β) δράση της *Taq* πολυμεράσης: η *Taq* πολυμεράση δεν ασκεί πάντα τη δράση της με απόλυτη ακρίβεια, αφού σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντιθέτων κλώνων μπορεί να περιλαμβάνεται κάποιο σφάλμα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που εισάγονται με τη βοήθεια του ενζύμου. Αυτό οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην έλλειψη μηχανισμού διόρθωσης (*proofreading*). Συνήθως, το σφάλμα αφορά στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Επομένως, το τελικό μείγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν όμοια, αλλά όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Με τρόπο ανάλογο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

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

ΥΛΙΚΑ

- 1) DNA βακτηρίου
- 2) WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H₂O)

- 3) Taq DNA πολυμεράση 5u/μL
- 4) 10x Taq Buffer με KCl (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
- 5) MgCl₂: 50 mM
- 6) Primer 1: 100 pmol/μL
- 7) Primer 2: 100 pmol/μL
- 8) Μείγμα dNTPs: 100mM
- 9) DNA Engine Peltier Thermal Cyclor
- 10) Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- 11) Αυτόματος αναδευτήρας Vortex
- 12) Σωληνάρια erpendorf για PCR
- 13) Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
- 14) Αποστειρωμένα ρύγχη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εκτέλεση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης παρασκευάζεται το μείγμα έκαστης αντίδρασης αναμιγνύοντας σε erpendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες των εξής αντιδραστηρίων: DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση, 10x Taq Buffer με KCl, MgCl₂, primer 1, primer 2, μείγμα dNTPs και WFI. Η ακριβής σύνθεση του μείγματος της αντίδρασης της PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 25μL αναφέρεται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	2,5
MgCl ₂ (50mM)	0,75
Μείγμα dNTPs (20mM)	0,5
Primer 1 (25 pmol/μL)	0,25
Primer 2 (25 pmol/μL)	0,25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0,2
dH ₂ O	18,05
DNA βακτηρίου	2,5
Τελικός όγκος	25

Τα 2,5 µL από κάθε δείγμα βακτηριακού DNA προστίθενται στο τέλος σε κάθε erpendorf και όλα τα erpendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής του χειριστή, αναλόγως της αντίδρασης.

2.7. Ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Η αντοχή των υπό μελέτη *S. aureus* στελεχών στην ομάδα των MLS_B αντιβιοτικών (Μακρολίδες- Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη β) και στις τετρακυκλίνες επιβεβαιώθηκε με PCR ξεχωριστά για την ανίχνευση του κάθε υπεύθυνου γονιδίου αντοχής. Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν τα γονίδια *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)*[67], *tet(M)* [68], *tet(K)* και *tet(L)*[69].

Στους παρακάτω πίνακες περιγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων και οι συνθήκες PCR για το κάθε γονίδιο:

Εκκινήτες	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
<i>ermA</i> -F	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermA</i> -R	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	
<i>ermB</i> -F	GAA AAG GAT CTC AAC CAA ATA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermB</i> -R	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	
<i>ermC</i> -F	TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>ermC</i> -R	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT	
<i>msrA</i> -F	GCA AAT GGT GTA GGT AAG ACA ACT	Alós <i>et al.</i> , 2000
<i>msrA</i> -R	ATC ATG TGA TGT AAA CAA AAT	
<i>tetK</i> -F	TAT TTT GGC TTT GTA TTC TTT CAT	Trzcinski <i>et al.</i> , 2000
<i>tetK</i> -R	GCT ATA CCT GTT CCC TCT GAT AA	
<i>tetL</i> -F	ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT	Trzcinski <i>et al.</i> , 2000
<i>tetL</i> -R	AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT	
<i>tetM</i> -F	GAA CTC GAA CAA GAG GAA AGC	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
<i>tetM</i> -R	ATG GAA GCC CAG AAA GGA T	

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>erm(A), erm(B)</i>	94°C ► 3min	94°C ► 1min	55°C ► 1min	72°C ► 1min	35	72°C ► 10min
<i>erm(C)</i>	94°C ► 5min	95°C ► 1min	52°C ► 1min	72°C ► 1min	35	72°C ► 6min
<i>msr(A)</i>	95°C ► 5min	94°C ► 30 sec	55°C ► 30sec	72°C ► 1min	30	72°C ► 10min
<i>tet(K), tet(L)</i>	95°C ► 5min	95°C ► 1min	59°C ► 1min	72°C ► 90 sec	30	72°C ► 7min
<i>tet(M)</i>	94°C ► 4min	94°C ► 30 sec	54°C ► 30 sec	72°C ► 90 sec	45	72°C ► 5min

2.8.Μοριακή Τυποποίηση με την μέθοδο Multi Locus Sequence Typing (MLST)

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

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

Για κάθε είδος βακτηρίου έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα γονίδια και η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος (internal fragment) του επιλεγέντος γονιδίου μήκους περίπου 450 bp, διαδικασία που ακολουθήθηκε και κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας για τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus*. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η

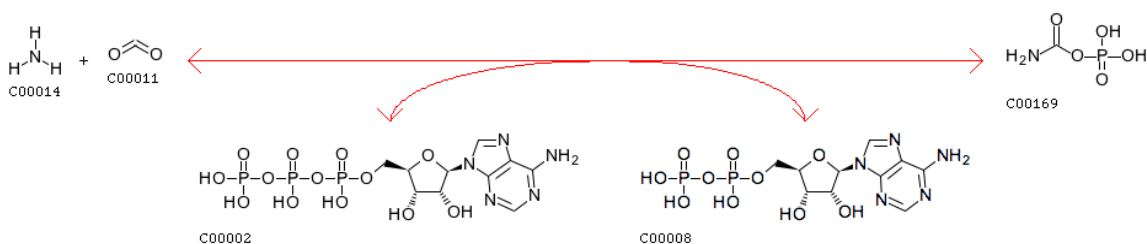
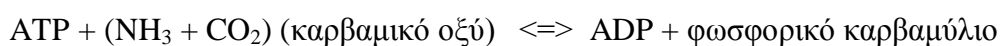
αλληλούχισή τους (sequencing). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και παρατίθενται στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές διεθνώς να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια (alleles) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα αλλήλια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των αλληλίων (*allelic profile*) των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων μεταβολισμού και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο, μοναδικό τύπο αλληλουχιών (*Sequence Type, ST*). Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο, αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

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

2.8.1. Γονίδια της μεθόδου MLST για τον *S. aureus*, ένζυμα και αντιδράσεις

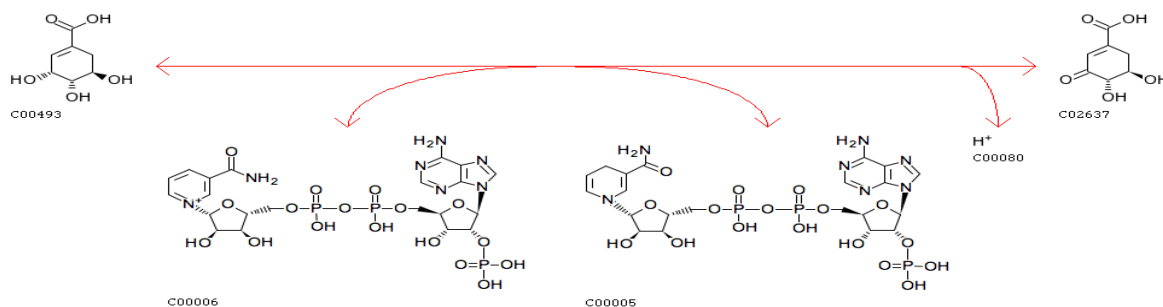
Τα επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού της MLST για τον *S. aureus* κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν ειδικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα και οι αντιδράσεις στις οποίες αυτά συμμετέχουν είναι :

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

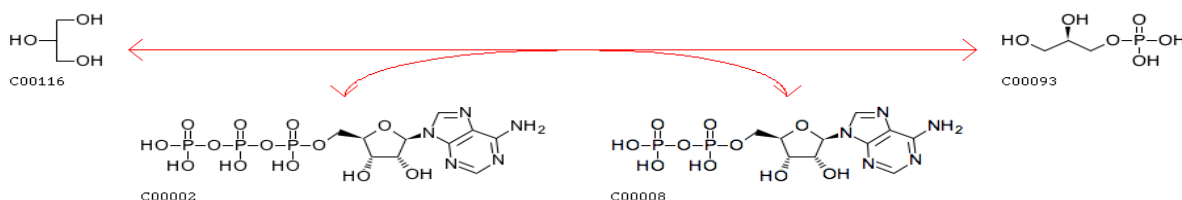


Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών, των αμινοξέων αργινίνης και προλίνης, καθώς και στον μεταβολισμό του αζώτου.

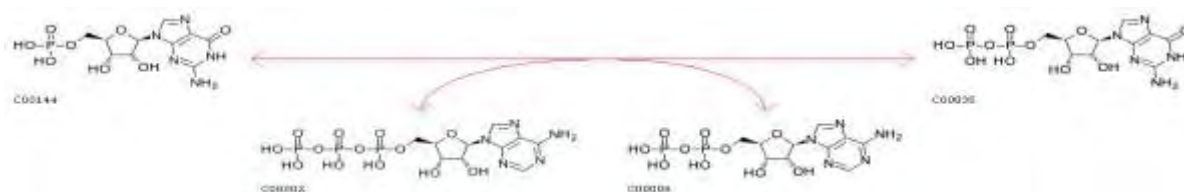
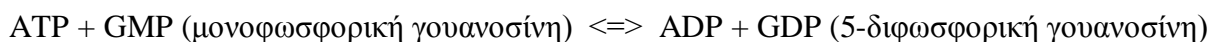
2) Το γονίδιο *aroE* (Shikimate dehydrogenase) κωδικοποιεί μία αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό αμινοξέων, κυρίως της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του NADP^+ ως δέκτη πρωτονίων (H^+) σύμφωνα με την αντίδραση:



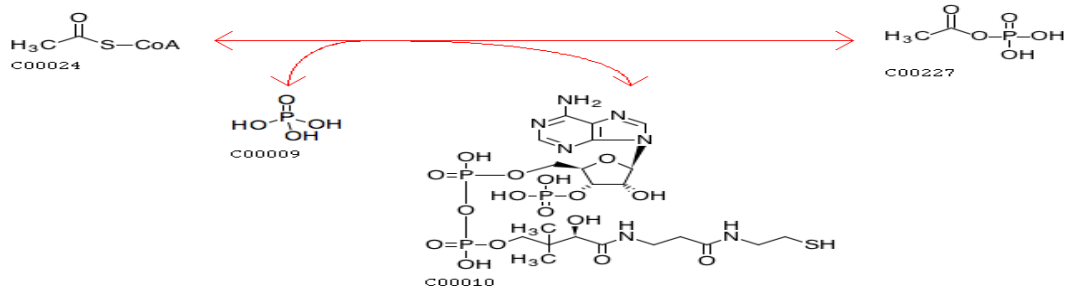
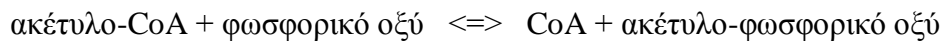
3) Το γονίδιο *glpF* (Glycerol kinase) κωδικοποιεί μία φωσφοτρανσφεράση την κινάση της γλυκερόλης. Πρόκειται για ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και η αντίδραση που καταλύει πραγματοποιείται με προσφορά ενέργειας από τη διάσπαση του ATP:



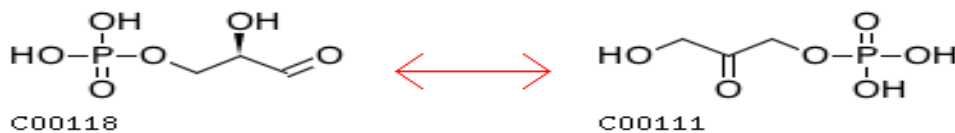
4) Το γονίδιο *gmk* (Guanylate kinase) κωδικοποιεί το ένζυμο κινάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης, μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων της μεταβολικής οδού των νουκλεοτιδίων και ειδικά των πουρινών, με προσφορά ενέργειας από το ATP:



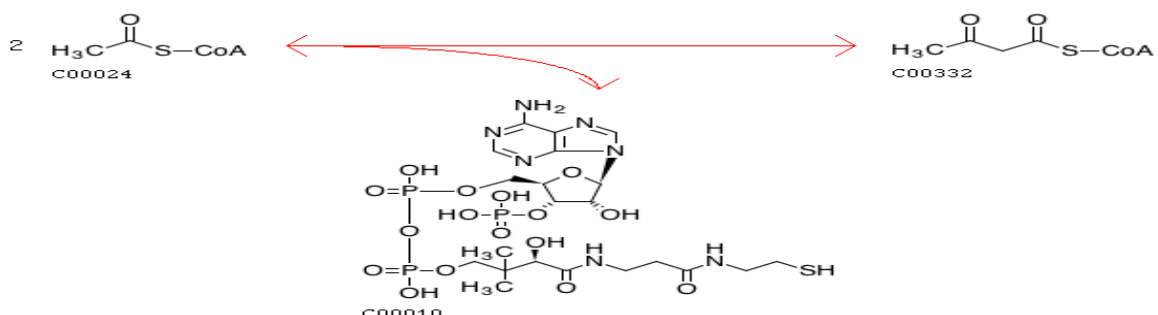
5) Το γονίδιο *pta* (Phosphate acetyltransferase) κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφο-τρανσακετυλάση, το οποίο καταλύει τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων και ακετυλομάδων κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αμφίδρομη αντίδραση καταλύεται σε υπόστρωμα ακέτυλο-CoA:



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



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



Στην παρούσα μελέτη όλα τα στελέχη *S. aureus* τυποποιήθηκαν μοριακά με τη μέθοδο MLST. Για το σκοπό αυτό σε κάθε στέλεχος τα επτά γονίδια μεταβολισμού του *S. aureus* που ανιχνεύονται στη μέθοδο MLST (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR. Για κάθε γονίδιο της MLST που διερευνήθηκε παρασκευάστηκαν ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε γονίδιο [70]. Οι συνθήκες αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης ήταν κοινές για όλα τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν. Όλες οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, ενώ η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *S. aureus* με την μέθοδο MLST αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες:

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Βιβλ/κη αναφορά
arcC-Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	Enright <i>et al</i> , 2000
arcC-Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	Enright <i>et al</i> , 2000
aroE-Dn	GGTGTGTGATTAATAACGATATC	
glpF-Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	Enright <i>et al</i> , 2000
glpF-Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
gmk-Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	Enright <i>et al</i> , 2000
gmk-Dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	
pta-Up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	Enright <i>et al</i> , 2000
pta-Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
tpi-Up	TCGTTCAATCTGAACGTCGTGAA	Enright <i>et al</i> , 2000
tpi-Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
yqiL-Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	Enright <i>et al</i> , 2000
yqiL-Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

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

2.9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

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

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

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

ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)
- 10x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA)
- Agarose SeaKem LE
- Ethidium bromide (EtBr) solution 10 mg/ml
- 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder
- Λάμπα UV
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάσης
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Αυτόματα σιφόνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά πραγματοποιείται αραίωση του 10x TBE Buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 100 ml 10x TBE και 900 ml H₂O (WFI). Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμειγνύονται 100 ml 1x TBE Buffer και 2 g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμειγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης και στη συνέχεια θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει το διάλυμα διαυγές. Στη συνέχεια, αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο. Έπειτα, προστίθενται 2μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml στο διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στο εκμαγείο και αφού σταθεροποιηθεί είναι πλέον έτοιμο για την ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτισή του σε διάλυμα 1x TBE Buffer της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αναμειγνύονται 5μl από ένα δείγμα DNA με 2μl χρωστικής Loading Dye Solution (κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πηκτώμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volts και ένταση 400 mA για 30 με 40 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πηκτώμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.10. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για MLST, για την απομάκρυνση των προσμειξεων της αντίδρασης είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA των στελεχών *S. aureus* σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

ΥΛΙΚΑ

- Binding Buffer (B₂/ B₃)
- Wash Buffer (W₁)
- Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (E₁)
- Στήλες φυγοκέντρωσης με σωληνάρια συλλογής
- Σωλήνες έκλουσης (1.7 ml)
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 96% - 100%

- Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

1) Δέσμευση του DNA: Σε ένα προϊόν PCR προστίθεται τετραπλάσιος όγκος αραιωμένου Binding Buffer (B_2), σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος της PCR (το Binding Buffer B_3 χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις όπου τα προϊόντα της PCR εμφάνιζαν μη ειδικές ζώνες (300bp και χαμηλότερες) στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης). Το μείγμα αναδεύεται καλά με αναρρόφηση. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink PCR, όπου και δεσμεύεται το DNA στη στήλη, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

2) Καθαρισμός του DNA: Σε κάθε στήλη προστίθενται 650 μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash Buffer (W_1), το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Στην συνέχεια ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.400 rpm), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Έκαστη στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1.7 ml), ενώ οι προηγούμενοι σωλήνες συλλογής του διηθήματος απορρίπτονται.

3) Έκλυση του DNA: Προστίθενται 40μl Elution Buffer (E_1) στο κέντρο κάθε στήλης προσεκτικά, ώστε η στήλη να διαβραχεί και κατόπιν να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από τη στήλη. Στη συνέχεια, οι στήλες φυγοκεντρούνται για 4 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.400 rpm). Έκαστη στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει πλέον το καθαρισμένο προϊόν της PCR, το οποίο και ηλεκτροφορείται, σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης που περιγράφηκε παραπάνω, για επιβεβαίωση της ύπαρξης και της ποιότητάς του μετά τη διαδικασία του καθαρισμού. Τέλος, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να αποσταλούν για αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

2.11. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων MLST (Sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για MLST πραγματοποιήθηκε σε ειδικό εξωτερικό εργαστήριο. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης αποστέλλονταν στο Εργαστήριο 40 μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20 μl από ένα εκκινητή σε αραίωση 1 : 20, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 5 pmol/μl. Σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* της παρούσας εργασίας ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

διαφορές, τους αποδόθηκε ένας αριθμός αλληλόμορφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό αλληλόμορφο προφίλ (*allelic profile*) για κάθε στέλεχος *S. aureus* το οποίο υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων της MLST (www.pubmlst.org) και για κάθε μοναδικό συνδυασμό αποδόθηκε ένας αντίστοιχος αριθμός, ο οποίος αποτέλεσε τον τύπο αλληλουχίας (*Sequence Type, ST*) για κάθε στέλεχος *S. aureus*. Μέσω της μεθόδου τυποποίησης MLST, η οποία κατέληξε στον καθορισμό του χαρακτηριστικού τους ST, τα υπό μελέτη στελέχη *S. aureus* χαρακτηρίστηκαν με αξιοπιστία και ακρίβεια.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν συνολικά 34 στελέχη *Staphylococcus aureus* τα οποία απομονώθηκαν από πρόβατα με υποκλινική μαστίτιδα, από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Στον πίνακα περιγράφονται οι περιοχές από τις οποίες προήλθαν τα στελέχη.

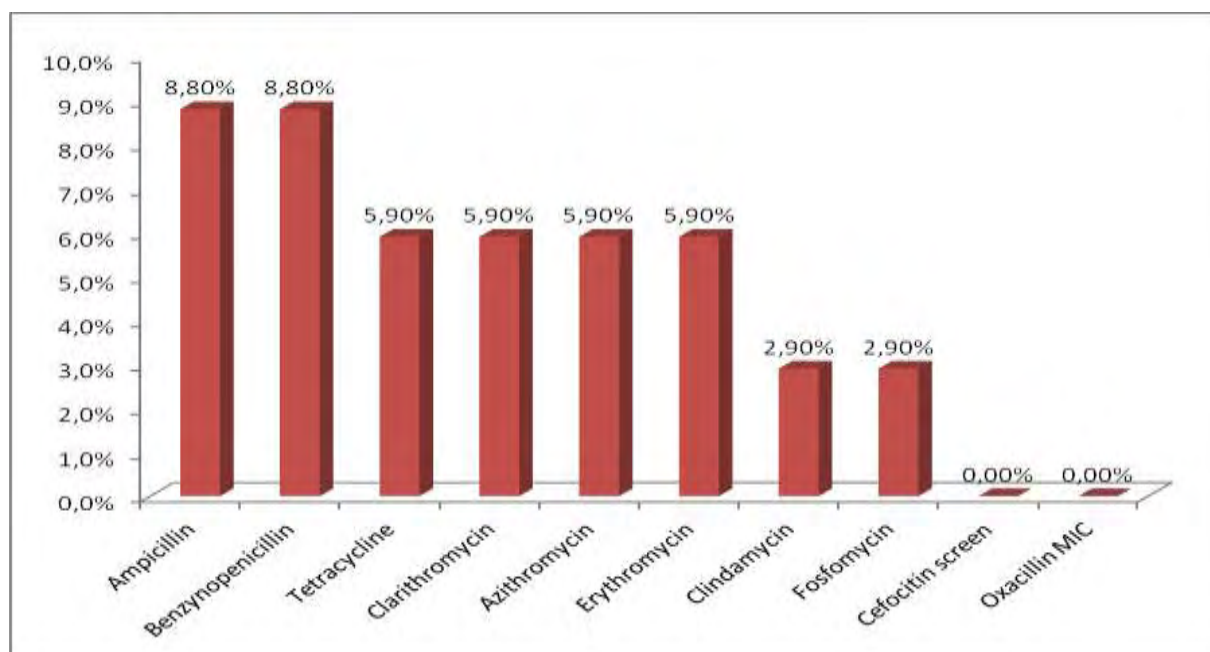
Πίνακας 1 Περιγραφή των περιοχών από τις οποίες απομονώθηκαν τα στελέχη *S. aureus*.

Νομός	Οικισμός	Αριθμός στελεχών <i>S. aureus</i>
Λάρισα	Ελασσόνα	4 (11,8%)
	Φάρσαλα	2 (5,9%)
	Τέμπη	3 (8,8%)
Αχαΐα	Πάτρα	1 (2,9%)
	Χαλανδρίτσα	4(11,8%)
Καρδίτσα	Ματαράγκα	1 (2,9%)
	Παλαμάς	1 (2,9%)
	Μητρόπολη	2 (5,9%)
Λακωνία	Σπάρτη	2 (5,9%)
	Μολάοι	1 (2,9%)
Λέσβος	Πέτρα	1 (2,9%)
	Μεσότοπος	1 (2,9%)
Εύβοια	Αλιβέρι	2 (5,9%)
Πρέβεζα	Καναλάκι	2 (5,9%)
Περία	Κατερίνη	1 (2,9%)
Αρκαδία	Τροπαία	1 (2,9%)
Τρίκαλα	Τρίκαλα	1 (2,9%)
Μαγνησία	Βελεστίνο	1 (2,9%)
Φθιώτιδα	Τιθορέα	1 (2,9%)
Δωδεκάνησα	Ρόδος	1 (2,9%)
Αιτωλοακαρνανία	Μεσολόγγι	1 (2,9%)
Σύνολο		34 (100%)

3.1. Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά

Σύμφωνα με τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά κεφοξιτίνη (cefoxitin) και οξακιλλίνη (oxacillin) που πραγματοποιήθηκε και τα 34 (100%) στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως MSSA (Methicillin-Susceptible *S. aureus*).

Από τα 34 στελέχη μόνο 5 εμφάνιζαν αντοχή σε κάποιο αντιμικροβιακό φάρμακο. Πιο συγκεκριμένα, τα 5 στελέχη εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε κάποια από τα κάτωθι αντιβιοτικά: αμπικιλίνη, πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη και φοσφομυκίνη. Συγκεκριμένα, 3 στελέχη εμφάνιζαν αντοχή στην αμπικιλίνη και την πενικιλίνη (8,8%), 2 στελέχη εμφάνιζαν αντοχή στην ερυθρομυκίνη (5,9%), εκ των οποίων το ένα εμφάνιζε ταυτόχρονη αντοχή στην κλινδαμυκίνη (cMLS_B⁻ φαινότυπος) (2,9%). Επίσης, 2 στελέχη εμφάνιζαν αντοχή στην τετρακυκλίνη (5,9%) και 1 στέλεχος εμφάνιζε αντοχή στην φοσφομυκίνη (2,9%). Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα ποσοστά αντοχής των στελεχών *S. aureus*.



Διάγραμμα 1 Ποσοστά αντοχής των στελεχών *S. aureus* στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Ο φαινότυπος αντοχής των 5 αυτών στελεχών, καθώς και η προέλευση τους, περιγράφεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Στέλεχος	Προέλευση	Ampicillin	Penicillin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Fosfomycin
F16.3R	Αχαΐα (Χαλανδρίτσα)			+	+	+	
F62.8L	Καρδίτσα (Ματαράγκα)	+	+			+	
F34.3R	Εύβοια (Αλιβέρι)						+
F42.5R	Περία (Κατερίνη)	+	+	+			
F8.16L	Αρκαδία (Τροπαία)	+	+				

3.2. Γονίδια αντοχής

Τα 2 στελέχη που εμφανίζουν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά εξετάστηκαν για την ύπαρξη των γονιδίων που αντιστοιχούν στους κυριότερους μηχανισμούς αντοχής για τα συγκεκριμένα αντιμικροβιακά φάρμακα. Τα γονίδια αυτά είναι τα *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* και *msr(A)*. Το στέλεχος που εμφάνιζε τον φαινότυπο cMLS_B έφερε το γονίδιο *erm(B)* ενώ το στέλεχος που εμφάνιζε ανθεκτικότητα μόνο στην ερυθρομυκίνη έφερε το γονίδιο *msr(A)*.

Επιπλέον τα 2 στελέχη με αντοχή στην τετρακυκλίνη εξετάστηκαν για την ύπαρξη γονιδίων που προσδίδουν αυτή την ανθεκτικότητα και προέκυψε ότι το στέλεχος που απομονώθηκε από τον οικισμό Χαλανδρίτσα έφερε το γονίδιο *tet(K)* (που αποτελεί το ίδιο στέλεχος που φέρει το γονίδιο *erm(B)*) και το άλλο στέλεχος (το οποίο απομονώθηκε από τον οικισμό Ματαράγκα) έφερε τα γονίδια *tet(K)* και *tet(L)*.

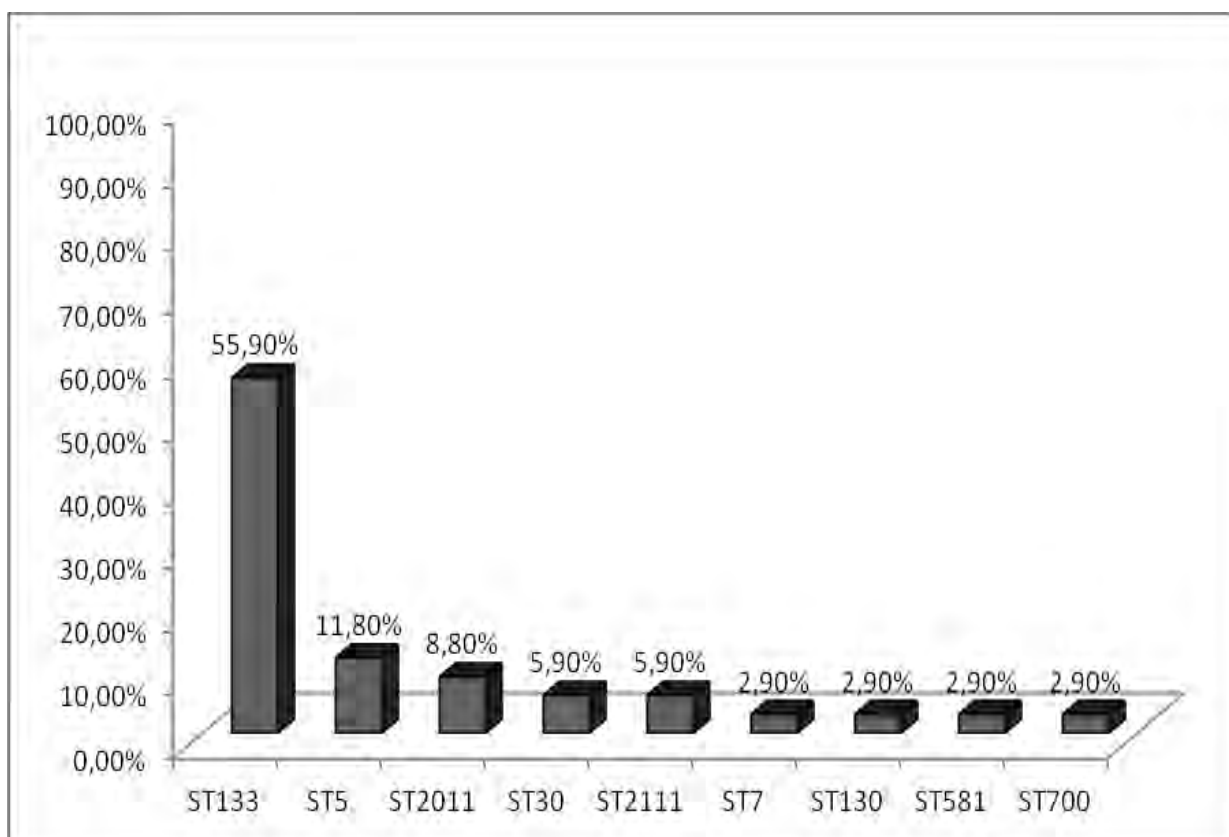
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στο στέλεχος που φέρει τα γονίδια *erm(B)* και *tet(K)* πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος, σύμφωνα με την οποία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των δύο προαναφερθέντων γονιδίων, και διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός επιπλέον γονιδίου, του *nor(A)*, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στις κινολόνες. Ωστόσο, σύμφωνα με το αντιβιογράμμα που προέκυψε, το στέλεχος δεν εμφάνιζε αντοχή στα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας (μοξιφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη)

3.3. Μοριακή τυποποίηση των στελεχών *S. aureus*

Η μέθοδος MLST πραγματοποιήθηκε για την μοριακή τυποποίηση όλων των στελεχών *S. aureus*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αλληλούχισης προέκυψε ότι ο επικρατέστερος κλώνος είναι ο ST133 ο οποίος εμφανίζεται σε 19 στελέχη (55,9%) σε διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Από το σύνολο αυτό, τα 5 στελέχη απομονώθηκαν από τον νομό Λάρισας και συγκεκριμένα αποτελούν το σύνολο των δειγμάτων που απομονώθηκαν από την περιοχή των Φαρσάλων (2 στελέχη) και των Τεμπών (3 στελέχη). Από τα υπόλοιπα 14 στελέχη, 3 απομονώθηκαν από τον νομό Αχαΐας και συγκεκριμένα από τον οικισμό Χαλανδρίτσα, 3 από τον νομό Καρδίτσας, το καθένα όμως από διαφορετικό οικισμό (Ματαράγκα, Παλαμάς, Μητρόπολη), 2 στελέχη από τον νομό Εύβοιας (Αλιβέρι) και Πρέβεζας (Καναλάκι) έκαστος και 1 στέλεχος από τον νομό Λέσβου (Μεσότοπος), Τρικάλων (Τρίκαλα), Μαγνησίας (Βελεστίνο) και Φθιώτιδας (Τιθορέα) έκαστος. Ο αμέσως επόμενος, σε συχνότητα εμφάνισης, είναι ο ST5 ο οποίος αντιστοιχεί σε 4 στελέχη (11,8%) από τα οποία, τα 3 στελέχη απομονώθηκαν από νομό Λάρισας (Ελασσόνα) και το 4ο στέλεχος από τον νομό Λακωνίας (Σπάρτη). Ο ST2011 εμφανίζεται σε 3 στελέχη (8,8%) καθένα από τα οποία απομονώθηκε από διαφορετικό νομό (Λάρισα-Ελασσόνα, Λέσβος- Πέτρα,

Αρκαδία- Τροπαία). Ο ST30 εμφανίζεται σε 2 στελέχη (5,9%) που απομονώθηκαν από τον νομό Λακωνίας, αλλά διαφορετικούς οικισμούς (Σπάρτη και Μολάοι). Ο ST2111, επίσης, εμφανίζεται σε 2 στελέχη (5,9%), τα οποία απομονώθηκαν από τον νομό Καρδίτσας (Μητρόπολη) και τον νομό Αχαΐας (Χαλανδρίτσα). Τέλος, οι ST7, ST130, ST581 και ST700 εμφανίζονται σε 1 στέλεχος (2,9%) έκαστος και απομονώθηκαν από τον νομό Πιερίας (Κατερίνη), τον νομό Δωδεκανήσων (Ρόδος), τον νομό Αχαΐας (Πάτρα) και τον νομό Αιτωλοακαρνανίας (Μεσολόγγι) αντίστοιχα.

Τα στελέχη F16.3R και F62.8L που φέρουν τα γονίδια *erm(B)*, *tet(K)*, *nor(A)* και *tet(L)*, *tet(K)* αντίστοιχα ανήκουν στον κλώνο ST133, ενώ το στέλεχος F42.5R που φέρει το γονίδιο *msr(A)* ανήκει στον κλώνο ST7.



Διάγραμμα 2 Ποσοστά κατανομής των στελεχών *S. aureus* στους διάφορους κλώνους.

Strain ref.	Identity	Ασθένεια	Νομός	Οικισμός	Φαινότυπος αντοχής	Γονίδια αντοχής	ST		
110	Avd 26L 2nd	+	Λάρισα	Ελασσόνα	-		5		
227	Avd 26L 3rd	+					-		5
632	Avd 2 5th	+					-		5
880	F106.2L	+					-		2011
184	F43.1L	+				Φάρσαλα	-		133
189	F43.9L	+					-		133
104	Tah 61L 5th	+					-		133
167	Tah 6L 1st	+				Τέμπη	-		133
311	Tah 25R 1st	+					-		133
48	F65.17R	+				Πάτρα	-		581
380	F12.16L	+	Αχαΐα	Χαλανδρίτσα	-		2111		
384	F13.5L	+					-		133
393	F16.4L	+					-		133
392	F16.3R	+					AZ, CLA, E, CC, cMLSB, TE	nor A +, erm B+, tet K+	133
5	F62.8L	+	Καρδίτσα	Ματαράγκα	P, AMP, TE	tet K+, tet L+	133		
534	F51.18L	+		Παλαμιάς	-			133	
396	Ker 7L 2nd	-			Μητρόπολη	-		2111	
586	Ker 14R 6th	+				-		133	
331	F1.11R	+			Σπάρτη	-		30	
350	F5.14L	+				-		5	
335	F2.3L	+		Λακωμία	Μολάι	-		30	
65	F69.11L	+			Γέτρα	-		2011	
76	F70.13R	+		Λέσβος	Μεσότοπος	-		133	
264	F34.3R	+		Εύβοια	Αλιβέρι	FOSF		133	
278	F35.4L	+				-		133	
369	F10.16L	+	Πρέβεζα	Καναλάκι	-		133		
373	F11.8L	+				-		133	
182	F42.5R	+	Περία	Κατερίνη	P, AMP, AZ, CLA, E	msrA +	7		
361	F8.16L	+	Αρκαδία	Τροπαία	P, AMP		2011		
327	F24.2R	+	Τρίκαλα	Τρίκαλα	-		133		
126	F20.8L	+	Μαγνησία	Βελεστίνο	-		133		
556	F56.12R	+	Φθιώτιδα	Πύθορα	-		133		
613	F46.8L	+	Δωδεκάνησα	Ρόδος	-		130		
832	F95.9L	+	Αιτωλοακαρνανία	Μεσαλόγγι	-		700		

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων. Ωστόσο, εξακολουθεί να αποτελεί αίτιο λοιμώξεων τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα. Η διασπορά συγκεκριμένων κλώνων όσο και η ανάδυση στελεχών με νέα γονίδια αντοχής και παθογονικότητας καθιστούν αναγκαία την επιδημιολογική επιτήρηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων [48]. Εκτός, όμως, από την εμφάνιση του συγκεκριμένου μικροβίου στο περιβάλλον του νοσοκομείου και της κοινότητας, τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί, εκτός των άλλων, ότι αποτελεί και αιτιολογικό παράγοντα λοιμώξεων σε ζώα συντροφιάς και εκτροφής. Η παρουσία αυτών των στελεχών έχει προκαλέσει ερωτήματα στην επιστημονική κοινότητα για το αν τα συγκεκριμένα στελέχη μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο ή αντίστροφα ή αν προέρχονται από κοινή πηγή. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επιδημιολογική μελέτη κλώνων του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου, που απομονώθηκαν από πρόβατα με υποκλινική μαστίτιδα από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με παρόμοιες μελέτες που έγιναν στους ανθρώπους για την διερεύνηση του ερωτήματος της μετάδοσης ή μη των συγκεκριμένων κλώνων στον γενικό πληθυσμό, μέσω της μετάδοσης από τα ζώα στους κτηνοτρόφους.

Στην παρούσα μελέτη ο επικρατέστερος κλώνος ήταν ο ST133 ο οποίος εμφανίζεται σε 19 στελέχη (55,9%). Από το σύνολο αυτό, τα 5 στελέχη απομονώθηκαν από τον νομό Λάρισας και συγκεκριμένα αποτελούν το σύνολο των δειγμάτων που απομονώθηκαν από την περιοχή των Φαρσάλων και των Τεμπών. Από τα υπόλοιπα 14 στελέχη, 3 απομονώθηκαν από τον νομό Αχαΐας, 3 από τον νομό Καρδίτσας, το καθένα όμως από διαφορετικό οικισμό, 2 στελέχη από τον νομό Εύβοιας και Πρέβεζας έκαστος και 1 στέλεχος από τον νομό Λέσβου, Τρικάλων, Μαγνησίας και Φθιώτιδας έκαστος. Σε παρόμοιες μελέτες, στελέχη *S. aureus* ST133 έχουν απομονωθεί από πρόβατα, κατσίκες [64, 65], χοίρους [39], βοοειδή [41] καθώς και γαϊδούρια [73], με τα δύο πρώτα κτηνοτροφικά είδη να αποτελούν τον κύριο ξενιστή αυτών των στελεχών. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις, όπως και στην δική μας μελέτη ο ST133 αποτελεί κυρίαρχο κλώνο [65, 67]. Εκτός από την ύπαρξη του κλώνου αυτού σε ζώα κτηνοτροφίας έχει γίνει αναφορά για την παρουσία του σε ζώα συντροφιάς [75] καθώς και σε άγρια ζώα όπως λιοντάρια [72] όρνια, κόκκινα ελάφια και αγριόχοιρους [76]. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές καθώς και με την βάση δεδομένων MLST παρατηρείται ότι στελέχη *S. aureus* ST133 εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης [26], και με μικρότερη σε περιοχές της Αφρικής [73] και της Αμερικής [77] σε ζώα τα οποία εμφάνιζαν κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα, οστεομυελίτιδα, δερματικές λοιμώξεις και σηψαιμία. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο συγκεκριμένος κλώνος εμφανίζεται μόνο σε ζώα καθώς δεν έχει γίνει

αναφορά για την ευρεία παρουσία του στον άνθρωπο [78]. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία η εμφάνιση του κλώνου στην πλειοψηφία των δειγμάτων έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία.

Ο αμέσως επόμενος, σε συχνότητα εμφάνισης, είναι ο κλώνος ST5 και αντιστοιχεί σε 4 στελέχη (11,8%) από τα οποία, τα 3 στελέχη απομονώθηκαν από νομό Λάρισας και συγκεκριμένα από τον ίδιο οικισμό (Ελασσόνα) και 1 στέλεχος από τον νομό Λακωνίας. Παρόμοιες μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη του συγκεκριμένου κλώνου σε άλογα [26], χοίρους [51], βοοειδή [39], πουλερικά [25, 36] καθώς και σε ζώα συντροφιάς [52] τόσο σε περιπτώσεις ασθενείας (π.χ. μαστίτιδα) όσο και φορείας. Στελέχη *S. aureus* ST5 έχουν βρεθεί και σε άγρια ζώα, συμπεριλαμβανομένων άγριων κατσικιών, κόκκινων ελαφιών και αγριόχοιρων [76]. Εκτός όμως από την εμφάνιση του στα ζώα, ο κλώνος ST5 εμφανίζεται και στους ανθρώπους και είναι υπεύθυνος για μεγάλο εύρος λοιμώξεων και ασθενειών. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία και με την βάση δεδομένων MLST ο συγκεκριμένος κλώνος έχει απομονωθεί από αίμα, πτύελα, πύον, ούρα καθώς και από ιατρικές συσκευές. Εκτός όμως από την παρουσία του σε νοσηλεύομενους, απομόνωσή του έχει γίνει και από φορείς. Εμφάνιση του κλώνου ST5 τόσο από ανθρώπινη όσο και από ζωική προέλευση παρατηρείται σε πολλές χώρες στην Ευρώπη [79], στην Αμερική [43, 48], στην Ασία [80] και στην Αυστραλία [77]. Είναι ιδιαίτερος σημαντικό να αναφερθεί ότι τα στελέχη MSSA ST5 αποτελούν προγονικό κλώνο από τον οποίον εξελίχθηκε ο επιδημικός κλώνος Νέας Υόρκης/ Ιαπωνίας (ST5 με το στοιχείο SCCmec II) [81] και ο παιδιατρικός κλώνος (ST5 με το στοιχείο SCCmec IV) [82]. Συνεπώς, η ικανότητα αυτών των κλώνων *S. aureus* να αποικίζουν στα ζώα πιθανόν οφείλεται στην απώλεια γονιδίων που ευθύνονται για την παθογονικότητα στον άνθρωπο και στην απόκτηση καθοριστικών παραγόντων μολυσματικότητας των ζώων [52]. Στην παρούσα μελέτη η εμφάνιση των τριών από τα 4 στελέχη στον ίδιο οικισμό είναι ιδιαίτερος σημαντική καθώς αυξάνεται η πιθανότητα μεταφοράς του συγκεκριμένου κλώνου από τα πρόβατα στους κτηνοτρόφους και κατ' επέκταση αυξάνεται η πιθανότητα μετάδοσής του στο περιβάλλον του νοσοκομείου (σε περίπτωση νοσηλείας) και της κοινότητας (σε περίπτωση φορείας). Ωστόσο, η εμφάνιση του 4ου στελέχους στον νομό Λακωνίας, που αποτελεί ένα από τα δύο στελέχη που απομονώθηκαν από τον συγκεκριμένο οικισμό, μπορεί να οφείλεται είτε στην παρουσία του στο ζώο είτε υπάρχει πιθανότητα μεταφοράς του από τον χειριστή/ κτηνοτρόφο στο ζώο.

Ο κλώνος ST2011 εμφανίζεται σε 3 στελέχη (8,8%) καθένα από τα οποία απομονώθηκε από διαφορετικό νομό (Λάρισα, Λέσβος, Αρκαδία). Ο κλώνος αυτός ανακαλύφθηκε μέσα στην τελευταία δεκαετία και η παρουσία του έχει ανευρεθεί μόνο σε ζώα (πρόβατα, κατσίκες, άγρια μηρυκαστικά) και όχι σε ανθρώπους [83]. Σχετίζεται με την γενετική σειρά CC130, η οποία

θεωρείται ότι αποτελεί γενετική σειρά σχετιζόμενη με ζώα κτηνοτροφίας και πιστεύεται ότι είχε μεταπηδήσει από τον άνθρωπο στα ζώα πριν από 5429 χρόνια [84].

Ο ST30 εμφανίζεται σε 2 στελέχη (5,9%) που απομονώθηκαν από τον νομό Λακωνίας, ένα από την Σπάρτη και έναν από τους Μολάους. Ο κλώνος αυτός έχει βρεθεί σε παρόμοιες μελέτες που σχετίζονται με ζώα [65, 71] αλλά εκτός από την παρουσία του στην κτηνοτροφία έχει βρεθεί και στους ανθρώπους καθώς και σε ζώα συντροφιάς [26]. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων MLST ο συγκεκριμένος κλώνος έχει βρεθεί σε πολλές χώρες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδος και έχει απομονωθεί από ζώα, ανθρώπους καθώς και από περιπτώσεις φορείας. Είναι αξιοσημείωτο ότι στελέχη *S. aureus* ST30 είναι σημαντικά CA-MSSA [85] και CA-MRSA [86] παθογόνα που ανευρίσκονται σε ολόκληρο τον κόσμο και σχετίζονται με σοβαρές ασθένειες σε παιδιά και ενήλικους. Ο CA-MRSA ST30 αποτελεί έναν από τους κλώνους που εξαπλώθηκε πολύ γρήγορα στην κοινότητα και έχει καταφέρει να διεισδύσει και στο περιβάλλον του νοσοκομείου [11]. Επιπλέον, θεωρείται ότι ο MSSA-ST30 αποτελεί έναν από τους προγονικούς κλώνους εξέλιξης επιδημικών γενετικών σειρών MRSA που ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1960 [87]. Στην παρούσα εργασία, η εμφάνιση του κλώνου ST30 στον ίδιο νομό είναι ιδιαίτερος σημαντική καθώς αυξάνεται η πιθανότητα μεταφοράς του συγκεκριμένου κλώνου από τα πρόβατα στους κτηνοτρόφους και συνεπώς αυξάνεται η πιθανότητα μετάδοσής του στην κοινότητα. Ωστόσο, λόγω του μικρού συνολικού αριθμού στελεχών που απομονώθηκαν για τη συγκεκριμένη μελέτη και του ακόμη μικρότερου αριθμού στελεχών που βρέθηκε ότι ανήκουν σε αυτόν τον κλώνο (5,9%) μπορεί να θεωρηθεί ότι ο κλώνος μεταδόθηκε από τους κτηνοτρόφους στα ζώα.

Ένας ακόμη κλώνος ο οποίος βρέθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο ST2111 και εμφανίζεται σε 2 στελέχη (5,9%) *S. aureus*, τα οποία απομονώθηκαν από τον νομό Καρδίτσας και τον νομό Αχαΐας. Ο συγκεκριμένος κλώνος βρέθηκε για πρώτη φορά στην Τυνησία σε υγιή γαϊδούρια [73] και πιο πρόσφατα βρέθηκε σε περιττώματα από χήνες στην Βόρεια Αμερική [88]. Θεωρείται ότι ανήκει στην γενετική σειρά CC133 καθώς έξι από τα επτά γονίδια, σύμφωνα με την βάση δεδομένων MLST, έχουν κοινά αλληλία και το μόνο που διαφέρει είναι το γονίδιο *ycliL*. Δεν έχει βρεθεί ακόμη αν το στέλεχος ST2111 έχει την ικανότητα να μεταδοθεί από τα ζώα στον άνθρωπο.

Οι εναπομείναντες τέσσερις κλώνοι ST7, ST130, ST581 και ST700 εμφανίζονται σε 1 στέλεχος (2,9%) έκαστος και απομονώθηκαν από τον νομό Περίας, τον νομό Δωδεκανήσων, τον νομό Αχαΐας και τον νομό Αιτωλοακαρνανίας αντίστοιχα. Ο κλώνος ST7 εκτός από την παρουσία του στα ζώα [78] έχει απομονωθεί και από περιπτώσεις ανθρώπων με σοβαρές δερματικές λοιμώξεις τόσο από παιδιά όσο και από ενήλικες [82, 83]. Σύμφωνα με την βάση

δεδομένων MLST έχει βρεθεί και σε περιπτώσεις φορείας [77]. Λόγω όμως του ότι το στέλεχος αυτό στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκε σε οικισμό από τον οποίο λήφθηκε μόνο ένα δείγμα δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν υπάρχει πιθανότητα μεταφοράς από το ζώο στον άνθρωπο ή αν η εύρεση του οφείλεται στην μεταφορά του στελέχους από τον άνθρωπο στο ζώο. Ο κλώνος ST130, όπως και ο ST2111 ανήκει στην γενετική σειρά CC130. Μέχρι πριν από μερικά χρόνια θεωρούνταν ότι ο ST130 σχετιζόταν κυρίως με ζώα καθώς έχει βρεθεί σε ολόκληρο τον κόσμο (με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στην Ευρώπη) σε στελέχη που απομονώθηκαν από κτηνοτροφικά ζώα [91] αν και δεν είχε υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε αυτούς τους ξενιστές [30, 65]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες δείχνουν την παρουσία στελεχών *S. aureus* ST130 και στους ανθρώπους [25, 33]. Στελέχη *S. aureus* ST130 έχουν βρεθεί και σε άγρια ζώα, συμπεριλαμβανομένων άγριων κατσικιών, κόκκινων ελαφιών και αγριόχοιρων [76]. Ο κλώνος ST700 έχει βρεθεί σε παρόμοιες μελέτες σε πρόβατα και κατσίκες [71, 84] και ανήκει επίσης στην γενετική σειρά CC130. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η γενετική αυτή σειρά, που όπως προαναφέρθηκε συμπεριλαμβάνει και τους κλώνους ST2111 και ST130, δεν έχει βρεθεί να σχετίζεται με τις λοιμώξεις στον άνθρωπο και πιστεύεται ότι αποτελεί μια δεξαμενή ζωνόσων στελεχών [84]. Τέλος, ο κλώνος ST581 βρέθηκε σε στέλεχος που απομονώθηκε από τον νομό Αχαΐας αλλά από διαφορετικό οικισμό, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη που απομονώθηκαν από τον ίδιο νομό. Σε μια παρόμοια μελέτη εμφανιζόταν ως κυρίαρχος κλώνος σε στελέχη που απομονώθηκαν από άγριες κατσίκες [76] και έχει βρεθεί και σε περιπτώσεις φορείας σε ζώα [77]. Η εύρεση των τριών τελευταίων αναφερθέντων κλώνων (ST130, ST700 και ST581) δεν μπορεί να αξιολογηθεί σωστά καθώς βρέθηκαν σε περιοχές από τις οποίες λήφθηκε μόνο ένα δείγμα.

Στην παρούσα εργασία γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά βρέθηκαν μόνο σε τρία στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από διαφορετικούς νομούς. Συγκεκριμένα, το στέλεχος F16.3R απομονώθηκε από τον νομό Αχαΐας (Χαλανδρίτσα) και φέρει τα γονίδια *nor(A)*, *erm(B)* και *tet(K)*, το στέλεχος F62.8L απομονώθηκε από τον νομό Καρδίτσας (Ματαράγκα) και φέρει τα γονίδια *tet(K)* και *tet(L)* και το στέλεχος F42.5R απομονώθηκε από τον νομό Πιερίας (Κατερίνη) και φέρει το γονίδιο *msr(A)*. Τα δύο πρώτα στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST133, ενώ το τρίτο στέλεχος ανήκει στον κλώνο ST7. Ωστόσο, κύριο ερώτημα της συγκεκριμένης μελέτης είναι η παρουσία ή μη των συγκεκριμένων κλώνων στους ανθρώπους και η πιθανότητα μεταπήδησης των κλώνων αυτών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Όπως προαναφέρθηκε, το κλωνικό σύμπλεγμα CC133 (ST133) που έχει εγκατασταθεί στα μικρά μηρυκαστικά (πρόβατα και κατσίκες) στα οποία αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα λοιμώξεων, έχει βρεθεί ότι προέρχεται από τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα η μεταπήδηση αυτή οφείλεται σε έναν συνδυασμό παραγόντων όπως διαφοροποιημένα αλλήλια, «απώλεια» γονιδίων και απόκτηση κινητών γενετικών

στοιχείων [92]. Αν και ο συγκεκριμένος κλώνος θεωρείται ότι προέρχεται από τον άνθρωπο, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί σε αυτόν. Αντιθέτως, ο ST7 έχει βρεθεί ότι αποτελεί αιτία λοιμώξεων σε ζώα [93]. Επιπλέον έχει βρεθεί και στους ανθρώπους τόσο σε περιπτώσεις νοσηλείας [90] όσο και φορείας. Θεωρείται μάλιστα ότι ο συγκεκριμένος κλώνος σπανίως είναι υπεύθυνος για πρόκληση λοιμώξεων και συχνά σχετίζεται με ασυμπτωματικό αποικισμό στους ανθρώπους [94]. Συνεπώς, σωστό θα ήταν να γίνει λήψη μέτρων για την αποφυγή μετάδοσης των ανθεκτικών αυτών στελεχών ανάμεσα στα ζώα (ST133) και ανάμεσα στα ζώα και τους ανθρώπους (ST7).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει από τα ζώα κλώνοι *Staphylococcus aureus*, πολλοί από τους οποίους είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση νόσων. Μια τέτοια νόσος, σημαντική για την οικονομία, είναι η υποκλινική μαστίτιδα σε ζώα γαλακτοπαραγωγής, η οποία μπορεί να συμβάλλει στην διάδοση ζωνόσων στελεχών στον γενικό πληθυσμό μέσω της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων και στους κτηνοτρόφους μέσω της επαφής τους με τα ζώα. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι ο κλώνος ST133 *S. aureus* κυριαρχεί στα πρόβατα στην Ελλάδα, ένας κλώνος που θεωρείται κυρίαρχος στα μικρά μηρυκαστικά. Το γεγονός ότι στα πρόβατα αποφεύγεται η χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων από το στόμα λόγω καταστροφής της εντερικής τους χλωρίδας εξηγεί το χαμηλό επίπεδο αντοχής που εμφανίζεται. Παρόλα αυτά η συνεχής παρακολούθηση είναι σημαντική, καθώς αυτοί οι κλώνοι μπορεί να είναι ανησυχητικά ζωνόσοι.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Winn, W. C., & Koneman, E. W. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. .
- [2] A. Ogston, "Micrococcus Poisoning," *J. Anat. Physiol.*, vol. 17, no. Pt 1, pp. 24–58, Oct. 1882.
- [3] G. Licitra, "Etymologia: Staphylococcus - Volume 19, Number 9—September 2013 - Emerging Infectious Disease journal - CDC."
- [4] M. McAdow, D. M. Missiakas, and O. Schneewind, "Staphylococcus aureus secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections," *J. Innate Immun.*, vol. 4, no. 2, pp. 141–148, 2012.
- [5] E. S. Duthie and G. Haughton, "Purification of free staphylococcal coagulase," *Biochem. J.*, vol. 70, no. 1, pp. 125–134, Sep. 1958.
- [6] "History, Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Antimicrobial Resistance | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases." [Online]. Available: <https://www.niaid.nih.gov/research/mrsa-antimicrobial-resistance-history>. [Accessed: 03-Oct-2017].
- [7] H. F. Chambers, "The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 2, pp. 178–182, 2001.
- [8] W. Orent, "A Brief History of Staph," *Proto Magazine*, 15-Jan-2006. [Online]. Available: <http://protomag.com/articles/a-brief-history-of-staph>. [Accessed: 03-Oct-2017].
- [9] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Ιατρική Μικροβιολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αντωνιάδης Α, Μαλισιόβας Ν, 6η Έκδοση, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, 2008:221-237. .*
- [10] T. Baba, T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, and K. Hiramatsu, "Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 1, pp. 300–310, Jan. 2008.
- [11] S. Stefani et al., *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods*, vol. 39. 2012.
- [12] G. Kuhn, P. Francioli, and D. S. Blanc, "Evidence for Clonal Evolution among Highly Polymorphic Genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 1, pp. 169–178, Jan. 2006.

- [13] P. C. Moore and J. A. Lindsay, "Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2760–2767, Aug. 2001.
- [14] R. J. Gordon and F. D. Lowy, "Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection," *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 46, no. Suppl 5, pp. S350–S359, Jun. 2008.
- [15] F. J. Schmitz et al., "Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains," *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 13, no. 6, pp. 699–708, Sep. 1997.
- [16] A. C. Fluit, "Livestock-associated *Staphylococcus aureus*," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 8, pp. 735–744, Aug. 2012.
- [17] N. Giormezis et al., "Biofilm synthesis and its relationship with genetic characteristics in clinical methicillin-resistant staphylococci," *AIMS Bioeng.*, vol. 2, no. 4, pp. 375–386, Sep. 2015.
- [18] P. Szweda, M. Schielmann, A. Frankowska, B. Kot, and M. Zalewska, "Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 76, no. 3, pp. 355–362, Mar. 2014.
- [19] R. R. Watkins, M. Z. David, and R. A. Salata, "Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Med. Microbiol.*, vol. 61, no. Pt 9, pp. 1179–1193, Sep. 2012.
- [20] Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. *Φαρμακολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Γαλανοπούλου-Κούβαρη Π., Λιάπη Χ., Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*, ISBN:960-7398-89-0. .
- [21] K. Kadlec, A. T. Fessler, T. Hauschild, and S. Schwarz, "Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 8, pp. 745–755, Aug. 2012.
- [22] A. O. Shittu et al., "Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria," *BMC Microbiol.*, vol. 11, p. 92, May 2011.
- [23] L. E. de Vries, H. Christensen, R. L. Skov, F. M. Aarestrup, and Y. Agersø, "Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, no. 3, pp. 490–500, Sep. 2009.

- [24] N. Ardic, M. Ozyurt, B. Sareyyupoglu, and T. Haznedaroglu, "Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 3, pp. 213–218, Sep. 2005.
- [25] M. C. Roberts, J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala, "Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 12, pp. 2823–2830, Dec. 1999.
- [26] E. Petinaki and I. Spiliopoulou, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives," *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 06-Nov-2015. [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-colonization-and-infection-peer-reviewed-fulltext-article-VMRR>. [Accessed: 03-Oct-2017].
- [27] Παπαρίζος Β., "Η κλινική σημασία της εκρίζωσης του σταφυλοκόκκου από θέσεις αποικισμού," no. Ελληνική Επιθεώρηση Δερματολογίας Αφροδισιολογίας, pp. 121–132, 2013.
- [28] R. Y. Cólín Nunan, "MRSA in farm animals and meat A new threat to human health," 2007.
- [29] F. C. Leonard and B. K. Markey, "Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review," *Vet. J. Lond. Engl.* 1997, vol. 175, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2008.
- [30] J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 3, pp. 505–520, Jul. 1997.
- [31] C. Cuny et al., "Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species," *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*, vol. 300, no. 2–3, pp. 109–117, Feb. 2010.
- [32] E. Drougka et al., "Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece," *Prev. Vet. Med.*, vol. 126, pp. 190–198, Apr. 2016.
- [33] E. Juhász-Kaszanyitzky et al., "MRSA transmission between cows and humans," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 4, pp. 630–632, Apr. 2007.
- [34] O. Sakwinska, M. Giddey, M. Moreillon, D. Morisset, A. Waldvogel, and P. Moreillon, "Staphylococcus aureus Host Range and Human-Bovine Host Shift ▽," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 17, pp. 5908–5915, Sep. 2011.
- [35] H. F. L. Wertheim et al., "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, pp. 751–762, Dec. 2005.

- [36] E. J. Feil et al., “How Clonal Is *Staphylococcus aureus*?,” *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 11, pp. 3307–3316, Jun. 2003.
- [37] V. Velasco, J. S. Sherwood, P. P. Rojas-García, and C. M. Logue, “Multiplex real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes from selective enrichments from animals and retail meat,” *PloS One*, vol. 9, no. 5, p. e97617, 2014.
- [38] R. W. Davis et al., “Complete genome of *Staphylococcus aureus* Tager 104 provides evidence of its relation to modern systemic hospital-acquired strains,” *BMC Genomics*, vol. 17, Mar. 2016.
- [39] K. McMillan, S. C. Moore, C. M. McAuley, N. Fegan, and E. M. Fox, “Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia,” *BMC Microbiol.*, vol. 16, Jul. 2016.
- [40] N. L. B. Zakour et al., “Genome-Wide Analysis of Ruminant *Staphylococcus aureus* Reveals Diversification of the Core Genome,” *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 19, pp. 6302–6317, Oct. 2008.
- [41] M. Aires-de-Sousa, C. E. S. R. Parente, O. Vieira-da-Motta, I. C. F. Bonna, D. A. Silva, and H. de Lencastre, “Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 12, pp. 3845–3849, Jun. 2007.
- [42] J. R. Fitzgerald, “Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat,” *Trends Microbiol.*, vol. 20, no. 4, pp. 192–198, Apr. 2012.
- [43] S. Taponen and S. Pyörälä, “Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*?,” *Vet. Microbiol.*, vol. 134, no. 1, pp. 29–36, Feb. 2009.
- [44] R. H. Deurenberg, C. Vink, S. Kalenic, A. W. Friedrich, C. A. Bruggeman, and E. E. Stobberingh, “The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 3, pp. 222–235, Mar. 2007.
- [45] M. Kanerva et al., “Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Finland in 2004 to 2006,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 8, pp. 2655–2657, Aug. 2009.
- [46] S. Fernandez et al., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina,” *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, vol. 14, pp. 401–405, Mar. 2013.

- [47] G. D. Katopodis, I. N. Grivea, A. J. Tsantsaridou, S. Pournaras, E. Petinaki, and G. A. Syrogiannopoulos, "Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece," *BMC Infect. Dis.*, vol. 10, p. 351, Dec. 2010.
- [48] E. Drougka et al., "A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic?," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 11, pp. O796-803, Nov. 2014.
- [49] Σ. Σάρρου, "Μελέτη στελεχών χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου που απομονώνονται από λοιμώξεις ανθρώπων και από ζώα στην Ελλάδα: ανίχνευση, ταυτοποίηση και γενετικός χαρακτηρισμός υπευθύνων γονιδίων αντοχής," Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Κλινικοεργαστηριακός. Εργαστήριο Μικροβιολογίας, 2016.
- [50] H. Gharsa et al., "Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia," *Vet. Microbiol.*, vol. 156, no. 3–4, pp. 367–373, May 2012.
- [51] P. Butaye, M. A. Argudín, and T. C. Smith, "Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution," *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, vol. 3, no. 1, pp. 19–31, Mar. 2016.
- [52] E. Petinaki and I. Spiliopoulou, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 7, pp. 626–634, Jul. 2012.
- [53] A. G. Mathew, R. Cissell, and S. Liamthong, "Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production," *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 115–133, 2007.
- [54] M. Wulf and A. Voss, "MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen?," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 6, pp. 519–521, Jun. 2008.
- [55] X. Ye et al., "Genotypic and Phenotypic Markers of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC9 in Humans," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 13, pp. 3892–3899, Jul. 2016.
- [56] S. Sarrou et al., "Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 *Staphylococcus aureus* strains in a rural Greek area," *PloS One*, vol. 10, no. 4, p. e0122761, 2015.
- [57] E. Drougka et al., "The first case of *Staphylococcus aureus* ST398 causing bacteremia in an immunocompromised patient in Greece," *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 232–236, Jun. 2012.

- [58] B. A. G. L. van Cleef et al., “Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 502–505, Mar. 2011.
- [59] E. M. Harrison et al., “Genomic surveillance reveals low prevalence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the East of England,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7406, Aug. 2017.
- [60] W. Vanderhaeghen, T. Cerpentier, C. Adriaensen, J. Vicca, K. Hermans, and P. Butaye, “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows,” *Vet. Microbiol.*, vol. 144, no. 1–2, pp. 166–171, Jul. 2010.
- [61] A. P. Johnson, “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66 Suppl 4, pp. iv43-iv48, May 2011.
- [62] E. M. Smith, P. F. Needs, G. Manley, and L. E. Green, “Global distribution and diversity of ovine-associated *Staphylococcus aureus*,” *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, vol. 22, pp. 208–215, Mar. 2014.
- [63] T. C. Smith, “Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience,” *PLOS Pathog.*, vol. 11, no. 2, p. e1004564, Feb. 2015.
- [64] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος Ι, Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης Γεωργακόπουλος Δ, Διαλλινάς Γ, Ζαχαριουδάκης Γ, Καραγκούνη-Κύρτσου Α, Κοκκορόγιαννης Θ, Φριλίγγος Σ, Χατζηλουκάς Σ, Χριστιάς Χ, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης ISBN:978-960-524-200-8. .
- [65] Μαρκουλάτος Π, Τζανακάκη Τ, Εργαστηριακές ασκήσεις Μικροβιολογίας-Ιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. .
- [66] Jawetz, Melnick & Adelberg, *Medical Microbiology*, 26th Edition. .
- [67] J. I. Alós, B. Aracil, J. Oteo, C. Torres, and J. L. Gómez-Garcés, “High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, no. 5, pp. 605–609, May 2000.
- [68] B. Olsvik, I. Olsen, and F. C. Tenover, “Detection of tet(M) and tet(Q) using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease,” *Oral Microbiol. Immunol.*, vol. 10, no. 2, pp. 87–92, Apr. 1995.
- [69] K. Trzcinski, B. S. Cooper, W. Hryniewicz, and C. G. Dowson, “Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, no. 6, pp. 763–770, Jun. 2000.
- [70] M. C. Enright, N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt, “Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible

- clones of *Staphylococcus aureus*,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 3, pp. 1008–1015, Mar. 2000.
- [71] J. Kadariya, T. C. Smith, and D. Thapaliya, “*Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health,” *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 827965, 2014.
- [72] J. Eriksson, C. Espinosa-Gongora, I. Stamphøj, A. R. Larsen, and L. Guardabassi, “Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in Danish small ruminants,” *Vet. Microbiol.*, vol. 163, no. 1–2, pp. 110–115, Apr. 2013.
- [73] H. Gharsa et al., “High diversity of genetic lineages and virulence genes in nasal *Staphylococcus aureus* isolates from donkeys destined to food consumption in Tunisia with predominance of the ruminant associated CC133 lineage,” *BMC Vet. Res.*, vol. 8, p. 203, Oct. 2012.
- [74] H. J. Jørgensen, T. Mørk, D. A. Caugant, A. Kearns, and L. M. Rørvik, “Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 12, pp. 8352–8361, Dec. 2005.
- [75] E. Gómez-Sanz, C. Torres, D. Benito, C. Lozano, and M. Zarazaga, “Animal and human *Staphylococcus aureus* associated clonal lineages and high rate of *Staphylococcus pseudintermedius* novel lineages in Spanish kennel dogs: predominance of *S. aureus* ST398,” *Vet. Microbiol.*, vol. 166, no. 3–4, pp. 580–589, Oct. 2013.
- [76] M. C. Porrero et al., “Carriage of *Staphylococcus aureus* by Free-Living Wild Animals in Spain,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 16, pp. 4865–4870, Aug. 2014.
- [77] “MLST databases and software - PubMLST.org.” [Online]. Available: <https://pubmlst.org/>. [Accessed: 03-Oct-2017].
- [78] D. S. Smyth et al., “Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 58, no. Pt 10, pp. 1343–1353, Oct. 2009.
- [79] L. Armand-Lefevre, R. Ruimy, and A. Andremont, “Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Healthy Pig Farmers, Human Controls, and Pigs,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 5, pp. 711–714, May 2005.
- [80] A. T. Fessler et al., “Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 20, pp. 7151–7157, Oct. 2011.
- [81] A. N. G. Dabul and I. L. B. C. Camargo, “Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 351, no. 1, pp. 7–8, Feb. 2014.

- [82] F. Vandenesch et al., “Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 8, pp. 978–984, Aug. 2003.
- [83] M. C. Porrero, H. Hasman, A. I. Vela, J. F. Fernández-Garayzábal, L. Domínguez, and F. M. Aarestrup, “Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small ruminants goats and sheep,” *Vet. Microbiol.*, vol. 156, no. 1–2, pp. 157–161, Apr. 2012.
- [84] A. Fetsch, *Staphylococcus aureus*. Academic Press, 2017.
- [85] D. A. Robinson and M. C. Enright, “Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 10, no. 2, pp. 92–97, Feb. 2004.
- [86] I. M. Z. Quitoco et al., “First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71),” *BMC Res. Notes*, vol. 6, p. 336, Aug. 2013.
- [87] A. R. Gomes, H. Westh, and H. de Lencastre, “Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 10, pp. 3237–3244, Oct. 2006.
- [88] D. Thapaliya et al., “Characterization of *Staphylococcus aureus* in Goose Feces from State Parks in Northeast Ohio,” *EcoHealth*, vol. 14, no. 2, pp. 303–309, Jun. 2017.
- [89] D. Yao et al., “Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs),” *BMC Infect. Dis.*, vol. 10, p. 133, May 2010.
- [90] F. Yu et al., “Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections,” *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 6, pp. 614–622, Dec. 2015.
- [91] V. Carfora et al., “Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study,” *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 6, pp. 4251–4258, Jun. 2016.
- [92] A. Pantosti, “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health,” *Front. Microbiol.*, vol. 3, Apr. 2012.
- [93] T. Li et al., “Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, Apr. 2017.
- [94] R. E. Weber et al., “Complete Genome Sequences of Two Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates Representing a Population Subset Highly Prevalent in Human Colonization,” *Genome Announc.*, vol. 4, no. 4, Jul. 2016.