

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ (*mecA*) ΚΑΙ ΤΩΝ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ
(MRSA) ΑΠΟ ΣΦΑΓΕΙΑ ΧΟΙΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΓΡΑΜΜΑΤΩ Δ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

Στρατιωτικός Κτηνίατρος

Κτηνιατρική ΑΠΘ

PhD, Κτηνιατρική ΠΘ

Λάρισα, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σολωμάκος Νικόλαος – Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π.Θ., Επιβλέπων

Γκόβαρης Αλέξανδρος – Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π.Θ., Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

Παππάς Ιωάννης – Καθηγητής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π.Θ., Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

*Στις τρεις μου Χάριτες,
Αγγελική, Θάλεια, Αριστέα*

Στον Δημήτρη

*Στους γονείς μου,
Τάκη και Θάλεια*

Διερεύνηση της παρουσίας του γονιδίου ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες (*mecA*) και των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων (MRSA) από σφαγεία χοίρων στην περιοχή της Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σημαντικοί όροι: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *mecA*, ανθεκτικότητα, RT-PCR

Οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) αποτελούν ένα σημαντικό παθογόνο υπεύθυνο για την εκδήλωση νόσου τόσο σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα όσο και στην κοινότητα. Αυτά τα στελέχη μπορούν να καταλήξουν σε επιφανειακά ύδατα, αλλά και στην ατμόσφαιρα, μέσω της διάθεσης αποβλήτων, ενισχύοντας την περιβαλλοντική δεξαμενή των γενετικών καθοριστικών παραγόντων αντιβιοαντοχής και παθογένειας. Ένας δείκτης ανθεκτικότητας για τον *S. aureus* είναι η αντίσταση στη μεθικιλίνη, μέσω της PBP2a, μιας πενικιλλοδεσμευτικής πρωτεΐνης με μικρή συγγένεια ως προς τις β-λακτάμες, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA*.

Σκοπός εργασίας

Στόχος της διπλωματικής μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας και των χαρακτηριστικών των MRSA στελεχών σε λύματα σφαγείων χοίρων της περιοχής της Θεσσαλίας, μέσω της εξέτασης του φαινοτύπου αυτών και της ποσοτικοποίησης του *mecA* γονιδίου ανθεκτικότητας με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν δείγματα λυμάτων προ και μετά την επεξεργασία τους από σφαγείο της περιοχής της Θεσσαλίας. Στα δείγματα αφ' ενός γινόταν εξαγωγή ολικού DNA και ακολουθούσε η ποσοτικοποίηση του *mecA* γονιδίου με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, αφ' ετέρου δε γινόταν απομόνωση MRSA στελεχών με κατάλληλες καλλιεργητικές διαδικασίες και ταυτοποίησή τους. Στα απομονωθέντα στελέχη πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μικροβιακής αντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων εμποτισμένων με αντιβιοτικά σε άγαρ (Kirby Bauer) σε έντεκα αντιμικροβιακές ουσίες.

Αποτελέσματα

Εκ των 24 δειγμάτων λυμάτων απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δέκα (10) στελέχη MRSA, υποδεικνύοντας επιπολασμό της τάξης του 66,67% (8/12) προ της επεξεργασίας τους και επιπολασμό της τάξης 16,67% (2/12) μετά την επεξεργασία τους. Σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη, ανιχνεύτηκε το γονίδιο *mecA* και χαρακτηρίστηκαν ως MRSA, υποδηλώνοντας ποσοστό παρουσίας ίσο με 100%. Το σύνολο (10/10, 100,0%) των απομονωθέντων στελεχών ήταν πολυανθεκτικά, αφού εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι τουλάχιστον πέντε εκ των 11 αντιμικροβιακών ουσιών.

Όσον αφορά το γονίδιο *mecA*, βρέθηκε ότι διανέμεται ευρέως στα λύματα σφαγείων χοίρων. Υψηλά επίπεδα γονιδίου *mecA* βρέθηκαν να υπάρχουν στα λύματα τόσο πριν όσο και μετά του βιολογικού καθαρισμού.

Συμπεράσματα

Διαπιστώθηκε ότι ο MRSA μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον από τα λύματα σφαγείων, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία, καθώς βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του γονιδίου *mecA* στα λύματα των σφαγείων χοίρων. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι τα λύματα του σφαγείου εξασφαλίζουν την ανάπτυξη του γονιδίου *mecA*, ενεργώντας ως πιθανό μέσο για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και συμβάλλοντας, έτσι, στην εξάπλωση επιβλαβών γενετικών προσδιοριστικών σε φυσικά περιβάλλοντα.

Investigation of the presence of the β -lactam resistance gene (*mecA*) and Methicillin-Resistant Staphylococci (MRSA) from pig slaughterhouses in the region of Thessaly

ABSTRACT

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *mecA*, resistance, RT-PCR

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are a major pathogen responsible for the onset of the disease both in hospital settings and in the community. These strains can end up in surface waters, but also in the atmosphere, through the disposal of waste, enhancing the environmental pool of genetic determinants of antibiotic resistance and pathogenicity. An indicator of resistance to *S. aureus* is resistance to methicillin, via PBP2a, a low-affinity penicillin-binding protein encoded by the *mecA* gene.

Objective

The aim of the study was to investigate the presence and characteristics of MRSA strains in pig slaughterhouse wastewater in the region of Thessaly, by examining the phenotype and quantifying the *mecA* resistance gene using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Materials and Methods

In the present study, wastewater samples were collected before and after their treatment from a slaughterhouse in the region of Thessaly. Total DNA was extracted and the *mecA* gene was quantified using the real-time polymerase chain reaction. At the same time, MRSA strains were isolated by appropriate culture procedures. The isolated strains were identified and tested for antimicrobial resistance against eleven antimicrobials by the disk diffusion method (Kirby Bauer).

Results

From the 24 wastewater samples, ten (10) MRSA strains were isolated and identified, indicating a prevalence of 66.67% (8/12) before treatment and a prevalence of 16.67% (2/12) after treatment. In all isolates, the *mecA* gene was detected and they were characterised as MRSA, indicating a 100 % prevalence rate. All (10/10, 100.0%) the isolates were extremely resistant, as they were resistant to at least five of the 11 antimicrobials.

As for the *mecA* gene, it was found to be widely distributed in the pig slaughterhouse effluents. High levels of the *mecA* gene were found in wastewater both before and after biological treatment.

Conclusions

High levels of the *mecA* gene were found in the pig slaughterhouse effluents, showing that MRSA can be released into the environment from slaughterhouse effluents, endangering public health. This indicates that slaughterhouse effluents ensure the development of the *mecA* gene, acting as a potential means of horizontal gene transfer and thus contributing to the spread of harmful genetic determinants in natural environments.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
Κατάσταση Πινάκων	iii
Κατάσταση Εικόνων	iv
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Staphylococcus</i> - ΕΙΔΟΣ <i>Staphylococcus aureus</i>	2
3. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	4
3.1 Νοσοκομειακά MRSA Στελέχη (Hospital Associated - HA-MRSA)	4
3.2 Τα στελέχη κοινότητας (Community Associated - CA-MRSA)	5
3.3 Τα στελέχη ζωικού κεφαλαίου (Livestock Associated - LA-MRSA)	6
4. MRSA ΣΕ ΛΥΜΑΤΑ	7
5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ <i>Staphylococcus aureus</i> - MRSA	9
6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ MRSA ΣΤΙΣ β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ	11
7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΩΝ MRSA ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΤΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	12
7.1 Αντιμικροβιακό προφίλ ευαισθησίας	13
7.2 Ανίχνευση Αντοχής στην οξακιλλίνη (μεθικιλίνη)	13
7.3 Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης των MRSA στελεχών.....	14
7.3.1 Τυποποίηση με βάση το γονίδιο της πρωτεΐνης A (spa typing).....	15
7.3.2 Τυποποίηση βάσει ηλεκτροφόρησης γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PGFE).....	16
7.3.3 Τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multi-locus Sequence Typing, MLST)	16
7.3.4 Ολική αλληλούχησης του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS).....	17
7.3.5 Τυποποίηση βάσει <i>SCCmec</i>	17

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	18
1. ΣΚΟΠΟΣ.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Δειγματοληψία.....	20
2.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών.....	20
2.3 Μέθοδος Ελέγχου Αντοχής στα Αντιβιοτικά.....	20
2.4 Εξαγωγή ολικού DNA	21
2.5 Έλεγχος της παρουσίας του γονιδίου <i>mecA</i> στα δείγματα λυμάτων.....	22
2.6 Ποσοτικοποίηση του <i>mecA</i> γονιδίου στα δείγματα λυμάτων.....	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών.....	24
3.2 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες.....	26
3.3 Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με το γονίδιο <i>mecA</i>	28
3.4 Ποσοτικοποίηση του <i>mecA</i> γονιδίου στα δείγματα λυμάτων.....	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
4.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών.....	32
4.2 Αντιμικροβιακή αντοχή των MRSA στελεχών.....	33
4.3 Ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας <i>mecA</i> σε λύματα.....	34
5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή».

Έτσι, καθώς αυτό το «ταξίδι» φτάνει στο τέλος του νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που με συνόδευσαν και με στήριξαν σε αυτή την προσπάθεια.

Τις πρώτες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στο ΓΕΝΙΚΟ ΕΠΙΤΕΛΕΙΟ ΣΤΡΑΤΟΥ και στη ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟΥ για την ευκαιρία που μου παραχωρήθηκε να συνεχίσω τις σπουδές μου, ευχόμενη να φανώ αντάξια αυτής της παραχώρησης προς όφελος της Υπηρεσίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σολωμάκο Νικόλαο, επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την απόλυτη εμπιστοσύνη και εκτίμηση στο πρόσωπό μου, με την ανάθεση ενός έργου γεμάτο προκλήσεις. Η συνεργασία μας υπήρξε κάτι περισσότερο από ιδανική, ολοκληρώθηκαν οι στόχοι που είχαν τεθεί και μπήκαν οι βάσεις για την συνέχεια αυτής της προσπάθειας.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο για την ενθάρρυνσή του και τα θετικά σχόλιά του.

Ευχαριστώ βαθύτατα τον Καθηγητή κ. Παππά Ιωάννη, γιατί δίχως την πολύτιμη βοήθειά του δεν θα ολοκληρωνόταν αυτό το έργο. Κύριε Παππά είσασταν πάντοτε εκεί, μας βοηθήσατε αγόγγυστα, όποτε σας το ζητούσαμε, μας μάθατε πολλά...Σας ευχαριστώ από καρδιάς.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά το έταιρο μέλος του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, κ. Ανδρεάνα Πεξάρá, Αναπλ. Καθηγήτρια, για την άψογη συνεργασία.

Θερμότατες ευχαριστίες και στην κ. Σοφία Γεωργίου για την επιστημονική της καθοδήγηση και την απλόχερη βοήθειά της.

Επίσης, οφείλω ευχαριστίες στον φίλο και συνάδελφο κ. Κουκούλη Αθανάσιο για την ανεκτίμητη βοήθειά του στη συλλογή δειγμάτων.

Να ευχαριστήσω τη νεαρή συνάδελφο Ζωή Μπέλλου, που με συνόδευσε σε αυτή την προσπάθεια, που μοιραστήκαμε χαρές και αγωνίες και να της ευχηθώ καλή συνέχεια!

Ευχαριστίες, ασφαλώς, και στην κ. Αφροδίτη Λεοντίτση για την πάντα καλή της διάθεση και την προθυμία της για την οποιαδήποτε γραμματειακή υποστήριξη.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ σίγουρα δεν είναι αρκετό για να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και εμπιστοσύνη.

Τους γονείς μου, Τάκη και Θάλεια, που εκτός από την ψυχολογική υποστήριξη, είναι πάντα εδώ να συνδράμουν με τα παιδιά μου.

Τον σύζυγό μου, Δημήτρη, που ήταν και είναι πάντα δίπλα μου, με την ενθάρρυνση και τη συνεχή ενίσχυση.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στα τρία αγγελούδια μου, τα κοριτσάκια μου Αγγελική, Θάλεια και Αριστέα για την υπομονή τους και για την αγάπη τους και ελπίζω να είναι πάντα περήφανες για τη μητέρα τους!

Ευχαριστώ ανώνυμα όλους, φίλους και γνωστούς, που με στήριξαν ψυχολογικά και ζητώ προκαταβολικά συγνώμη αν ξέχασα κάποιον.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	Σελ.
Πίνακας 2.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου <i>mecA</i>	22
Πίνακας 2.2: Συνθήκες θερμοκυκλοποίησης που εφαρμόστηκαν κατά την ενίσχυση του γονιδίου <i>mecA</i>	22
Πίνακας 3.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θετικότητας σε MRSA σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.	26
Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες MRSA στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.	27
Πίνακας 3.3: Προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής των απομονωθέντων MRSA στελεχών .	28
Πίνακας 3.4: Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης Real Time PCR. Καταγραφή τιμών Ct για κάθε δείγμα και ποσότητας αντιγράφων.	30
Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του γονιδίου <i>mecA</i> σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.	31
Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής επεξεργασίας των δειγμάτων.	23

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ	Σελ.
Εικόνα 1: Εμφάνιση λευκών συσσωμάτων (συγκολλητική αντίδραση), ενδεικτικό της ταυτοποίησης του <i>S. aureus</i> με το Microgen Staph Latex test	24
Εικόνα 2: Χαρακτηριστικές ροζ - μωβ αποικίες MRSA στο εκλεκτικό – διαφοροποιητικό υπόστρωμα Chromagar MRSA	24
Εικόνα 3: Δοκιμή της πηκτάσης σε απομονωθέν MRSA στέλεχος	24
Εικόνα 4: Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο, σε στελέχη MRSA.	25
Εικόνα 5: Καμπύλες αποδιάταξης στις οποίες εμφανίζονται κορυφές, που αντιστοιχούν στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος, των MRSA στελεχών.	25
Εικόνα 6: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες.	27
Εικόνα 7: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες.	27
Εικόνα 8: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με το γονίδιο <i>mecA</i>	29
Εικόνα 9: Η καμπύλη αναφοράς με τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης.	29
Εικόνα 10: Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο, σε δείγματα λυμάτων.	31

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών προφυλακτικά ή για τη θεραπεία λοιμώξεων, η χρήση τους στο παρελθόν ως αυξητικών παραγόντων των ζώων, καθώς και η χρησιμοποίησή τους στη γεωργία, έχουν προκαλέσει τη διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων, αλλά και των γονιδίων ανθεκτικότητάς τους σε διάφορα οικοσυστήματα. Η ευρεία χρήση αυτών των παραγόντων σε συνδυασμό με τη μεγάλη σταθερότητά τους, έδρασαν ως επιλεκτική πίεση επιλογής στον φυσικό πληθυσμό των βακτηρίων καθιστώντας την σημαντικό καθοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη, διάδοση και εμμονή της αντιβιοανθεκτικότητας (McArdell et al., 2003; Miao et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, διαφαίνεται ότι και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων μπορεί να παίζουν ρόλο στην εξάπλωση και την ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, λόγω του ότι δεν μπορούν να απομακρύνουν ή να εξουδετερώσουν τελείως τους αντιμικροβιακούς παράγοντες ή τους μικροοργανισμούς (Böjesson et al., 2010; Rizzo et al., 2013).

Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι αυτοί του γένους *Staphylococcus*. Ένα πανταχού παρόν περιβαλλοντικό βακτήριο (έδαφος, νερό, σκόνη, σκεύη, άνθρωποι, ζώα, τρόφιμα) που αναφέρεται ως φυσιολογική μικροχλωρίδα των βλεννογόνων, του δέρματος και των νυχιών θηλαστικών και πτηνών (Huijbers et al., 2015). Ωστόσο, μπορεί να συμπεριφέρεται ως ευκαιριακά παθογόνο προκαλώντας ήπιες ή σοβαρές λοιμώξεις λόγω της παραγωγής διαφορετικών παραγόντων μολυσματικότητας (Said et al., 2017). Μεταξύ όλων των ειδών σταφυλόκοκκου, το είδος *S. aureus*, ένα ευκαιριακά παθογόνο, θεωρείται το πιο λοιμογόνο, καθώς σχετίζεται με την εκδήλωση ευρέως φάσματος βλαβών που κυμαίνονται από ήπιες δερματικές λοιμώξεις και χειρουργικές επιμολύνσεις έως ασθένειες απειλητικές για τη ζωή, όπως ενδοκαρδίτιδες και νεκρωτικές πνευμονίες (Akpraka et al., 2007; Ippolito et al., 2010; Casey et al., 2011). Οι ανωτέρω παθολογικές καταστάσεις είναι όχι μόνο ενδονοσοκομειακές, αλλά μπορεί να αποκτηθούν και στην κοινότητα (Lindsay & Holden, 2004; Deurenberg & Stobberingh 2008). Αν και ο *S. aureus* είναι το αντιπροσωπευτικότερο είδος στο γένος, ο αρνητικός στην κοαγκουλάση *Staphylococcus* (CoNS) κερδίζει ενδιαφέρον λόγω της αυξανόμενης ταυτοποίησής του ως υπεύθυνος παράγοντας λοιμώξεων (Becker et al., 2014).

Πριν από τη διαθεσιμότητα των αντιβιοτικών, οι διεισδυτικές μολύνσεις του *S. aureus* ήταν συχνά θανατηφόρες. Η εισαγωγή της πενικιλίνης βελτίωσε σημαντικά την πρόγνωση για ασθενείς με σοβαρές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις, αλλά μετά από μερικά χρόνια κλινικής χρήσης, παρουσιάστηκε ανθεκτικότητα λόγω της παραγωγής β-λακταμασών. Η ημισυνθετική πενικιλίνη-μεθικιλίνη χρησιμοποιήθηκε αρκετά χρόνια αργότερα. Χαρακτηρίστηκε από υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των παθογόνων σταφυλόκοκκων, αλλά ομοίως με την πενικιλίνη, τα βακτήρια απέκτησαν ειδική αντίσταση και σε αυτό το αντιβιοτικό έπειτα από αρκετά χρόνια χρήσης (Foster, 2017). Πλέον, ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) είναι μια από τις σημαντικότερες αιτίες ανησυχίας για τη δημόσια υγεία, αποτελώντας σοβαρή απειλή. Θεωρείται ανθεκτικό σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και προκαλεί επιδημίες σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα της Ευρώπης (π.χ. Ελλάδα, Ηνωμένο Βασίλειο), της Ιαπωνίας και των ΗΠΑ. Σε μερικές, μάλιστα, περιοχές, το 40–60% των στελεχών του *S. aureus* που απομονώθηκαν σε νοσοκομεία είναι MRSA (Grundmann & Hanssen, 2006).

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την αντοχή στη μεθικιλίνη στους MRSA, αλλά και στους αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους (CoNS), είναι το *mecA*. Ο

μοναδικός φορέας *mecA*, που έχει περιγραφεί, είναι το χρωμόσωμα της κινητής σταφυλοκοκκικής κασέτας (staphylococcal cassette chromosome- SCC*mec*). Λόγω της μη εξαρτώμενης από το είδος διατήρησης του γονιδιακού συμπλόκου, πιστεύεται ότι η μεταφορά του χρωμοσώματος της κασέτας συμβαίνει συχνά (Ericson-Sollid et al., 2006). Η βανκομυκίνη είναι το αντιβιοτικό επιλογής για τη θεραπεία λοιμώξεων από MRSA. Ωστόσο, η εμφάνιση στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη βανκομυκίνη, τα τελευταία χρόνια, είναι αιτία μεγάλης ανησυχίας για τη δημόσια υγεία, αφού έχει καταστήσει τη θεραπεία των MRSA λοιμώξεων ακόμη πιο δύσκολη.

Στη συνέχεια, θα συζητηθεί η κλινική και επιδημιολογική σημασία των MRSA στελεχών, θα παρουσιαστούν οι μηχανισμοί της μικροβιακής αντοχής τους, αλλά και οι μέθοδοι διερεύνησής τους, που αποτελούν πολύτιμο εργαλείο προάσπισης της δημόσιας υγείας.

2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Staphylococcus* - ΕΙΔΟΣ *Staphylococcus aureus*

Το γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνει 57 είδη (Euzebey, 2022), εκ των οποίων τα 17 μπορούν να απομονωθούν από ανθρώπινα βιολογικά δείγματα. Ανήκει στην οικογένεια των Micrococcaceae και πρόκειται για Gram θετικούς, ακίνητους, μη σπορογόνους κόκκους (0,8- 1,0 μm), που διατάσσονται σε ζεύγη, τετράδες ή ομάδες που μοιάζουν με τσαμπιά. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι, θετικοί στη δοκιμή της καταλάσης και αρνητικοί στη δοκιμή της οξειδάσης (Le Loir et al., 2003).

Ο *S. aureus* αποτελεί το περισσότερο παθογόνο είδος για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πρόκειται για θερμοευαίσθητο μεσόφιλο μικροοργανισμό με θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης μεταξύ 6 °C και 48,5° C και βέλτιστη θερμοκρασία αυτή των 34-37° C (Gustafson & Wilkinson, 2005). Οι τιμές pH στις οποίες μπορεί να αναπτυχθεί κυμαίνονται μεταξύ 4,2 και 9,3, με βέλτιστο εύρος από pH 7,0 έως 7,5 (Hudson, 2004). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε τρόφιμα με πολύ χαμηλή τιμή aw (aw ~0,83 - 0,86) (Le Loir et al., 2003; Bennett, 2005). Είναι αλαντοάντοχος μικροοργανισμός και ορισμένα στελέχη του μπορεί να επιβιώσουν ακόμη και σε συγκέντρωση NaCl 20% (Fernandes, 2009), ενώ η ανάπτυξή του μπορεί να παρεμποδιστεί από τον μικροβιακό ανταγωνισμό, αφού δεν μπορεί να ανταγωνιστεί στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το υπόστρωμα τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα βακτήρια που ανήκουν στα *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae και Lactobaciliaceae (ICMSF, 1996).

Στο γένος διακρίνονται δύο βασικές ομάδες: οι πηκτάση θετικοί σταφυλόκοκκοι, με κύριο εκπρόσωπο τον *S. aureus*, και οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS). Ο *S. aureus* ή «χρυσίζων σταφυλόκοκκος», οφείλει το όνομά του στο χαρακτηριστικό «χρυσό» χρώμα των αποικιών του σε αιματούχο άγαρ, λόγω της σταφυλοξανθίνης, ουσίας που ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των καροτενοειδών (Clauditz et al., 2006). Διαθέτει δε μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων μολυσματικότητας, όπως η πεπτιδογλυκάνη, το τειχοϊκό οξύ, ένζυμα και τοξίνες, μόρια προσκόλλησης και αρκετούς τύπους κυτταροτοξινών (Bannerman et al., 2003). Μπορεί να προκαλέσει διαφορετικούς τύπους λοίμωξης, πολλές εκ των οποίων ενδονοσοκομειακά. Περίπου το 20% έως 30% του γενικού ανθρώπινου πληθυσμού είναι φορείς αυτού του μικροοργανισμού, το οποίο έχει κύριο σημείο αποίκησης του τον ρινικό βλεννογόνο (Springer et al., 2009). Ο *S. aureus*, όπως και τα άλλα είδη του γένους, χαρακτηρίζεται

από υψηλό ποσοστό επιβίωσης υπό δυσμενείς συνθήκες σε ξηρά περιβάλλοντα, παρόλο που είναι μη σπορογόνος, π.χ. σε επιφάνειες ή άλλα υλικά, και επιπλέον παραμένει μολυσματικός για τους εκτιθέμενους ακόμη και μετά από μήνες (Kramer et al., 2006; Gupta et al., 2017).

Ο *S. aureus* διαθέτει ποικίλους παράγοντες παθογένειας στους οποίους οφείλεται η υψηλή διεισδυτικότητά του και οι επαγόμενες λοιμώξεις. Σε αυτούς περιλαμβάνονται δομικά συστατικά του, όπως οι παράγοντες επιφανείας (ο πολυσακχαρίτης της κάψας και η πρωτεΐνη Α), που συνδέονται με κύτταρα, πρωτεΐνες και κύτταρα του αίματος του προσβεβλημένου οργανισμού, οι παράγοντες συγκόλλησης (ο παράγων συσσωμάτωσης, η πρωτεΐνη δέσμευσης της ινονηκτίνης), αλλά και η παραγωγή ενζύμων (καταλάση, πηκτάση, ινωδολυσίνη, αιμολυσίνη, υαλουρονιδάση, λιπάσες, πρωτεϊνάσες, νουκλεάσες) και τοξινών όπως εντεροτοξίνες, η τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας και η λευκοκοκτίνη Panton-Valentine (PVL) (Gordon & Lowy, 2008; Rossato et al., 2018). Όσον αφορά στην PVL, αυτή καταστρέφει τα λευκά αιμοσφαίρια του ανθρώπου και του κονίκλου και ανακαλύφθηκε το 1932. Αποτελείται από δύο εξωπρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από δύο συνεχόμενα, μεταγραφόμενα και κωδικοποιημένα με φάγο γονίδια, τα lukS-PV και lukF-PV. Η PVL έχει συσχετιστεί επιδημιολογικά με τα μολυσματικά και εξαιρετικά μεταδοτικά στελέχη του *S. aureus* (Beyrouthy et al., 2013). Αυτά τα στελέχη μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, καθώς και απειλητικές για τη ζωή διεισδυτικές ασθένειες, όπως η νεκρωτική φασιίτιδα, η κεραυνοβόλος πορφύρα και η νεκρωτική αιμορραγική πνευμονία (Shreshtha et al., 2014). Παρά το γεγονός ότι οι λοιμώξεις του *S. aureus* επιτηρούνται σε μεγάλο βαθμό και τα συμπτώματά τους είναι αναγνωρίσιμα, η ταχεία ανάπτυξη και εξάπλωση των στελεχών *S. aureus* που φέρουν την PVL δεν θα πρέπει να υποεκτιμάται.

Επιπλέον, μερικά στελέχη του *S. aureus* είναι ικανά να παράγουν συγκεκριμένες ανοσορρυθμιστικές τοξίνες - υπεραντιγόνα, συμπεριλαμβανομένης της συνδρομετοξίνης-σοκ-1 (TSST-1), οι οποίες εμφανίζουν διεγερτικά και μιτογενετικά αποτελέσματα στα Τ λεμφοκύτταρα, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει το σύνδρομο κατάρρευσης και τοξικής καταπληξίας (Sergelidis & Angelidis, 2017). Μια άλλη κατηγορία τοξινών του *S. aureus* είναι οι εντεροτοξίνες (SEA-E και SEG-O), που τον καθιστούν ως ένα σοβαρό τροφιμογενές παθογόνο. Αυτές διακρίνονται σε πέντε αντιγονικούς τύπους, Α, Β, C, D, και Ε, είναι θερμοανθεκτικές και προκαλούν τροφοτοξίνωση στον άνθρωπο (Alfatemi et al., 2014; Denayer et al., 2017). Υπεύθυνα τρόφιμα θεωρούνται το κρέας και τα προϊόντα του, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα πουλερικά και τα αυγά, τα ιχθυηρά και γενικότερα τα κάθε λογής έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Hudson, 2004).

Το σημαντικότερο ένζυμο που προάγει την παθογένεια του *S. aureus* είναι η πηκτάση, η οποία μετατρέποντας το ινωδογόνο του αίματος σε ινώδες εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση του παθογόνου (Cheng et al., 2010). Τέλος, άλλοι παράγοντες μολυσματικότητας περιλαμβάνουν τον σχηματισμό βιοϋμενίων, συμβάλλοντας όχι μόνο στις επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αλλά και στην επιβίωση και ανάπτυξη του μικροοργανισμού, προστατεύοντάς τον από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, τα αντιμικροβιακά φάρμακα και τα απολυμαντικά (Singh et al., 2010; Conlon, 2014).

Τα στελέχη του *S. aureus* βρίσκονται σε στενή επαφή με άλλα βακτήρια στο πολύ-μικροβιακό περιβάλλον του δέρματος και των βλεννογόνων του ίδιου ξενιστή.

Επιπροσθέτως, ο *S. aureus* μπορεί να ανταλλάσσεται μεταξύ ανθρώπων ή/και ζώων, όπως με άμεση επαφή, με εισπνοή αερολυμάτων και σκόνης που περιέχουν *S. aureus*, μέσω εκκρίσεων ή μέσω του χειρισμού ή της κατάποσης τροφίμων επιμολυσμένων με *S. aureus* (Schwarz et al., 2017). Έχει αποκαλυφθεί ότι μέσω αυτών των διαδικασιών ο *S. aureus* μπορεί να δράσει ως δότης και λήπτης γονιδίων ανθεκτικότητας. Η απόκτηση νέων γονιδίων ανθεκτικότητας από τον *S. aureus* είναι μια συνεχής διαδικασία που προκύπτει από την αλληλεπίδρασή του με άλλα βακτήρια (Kadlec et al., 2012; Wendlandt et al., 2013).

3. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Έχουν περιγραφεί τρεις βασικές κατηγορίες MRSA στελεχών που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία: α) Τα **νοσοκομειακά στελέχη** (Hospital-acquired - **HA**), τα οποία απαντώνται σε υγειονομικές δομές, εμφανίζονται σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου και συχνά οδηγούν σε σοβαρή νόσο (Miller et al., 2005). β) Τα **στελέχη κοινότητας** (Community-acquired - **CA**), τα οποία βρίσκονται εκτός υγειονομικών εγκαταστάσεων και μπορούν να προσβάλουν υγιή, κατά τα άλλα, άτομα. Μεταδίδονται μέσω της στενής άμεσης επαφής και επηρεάζουν κυρίως το δέρμα και τους μαλακούς ιστούς. Τα HA-MRSA και CA-MRSA στελέχη είναι γνωστό ότι επιβιώνουν στο νερό της θάλασσας και των ποταμών για τουλάχιστον 14 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους (Tolba et al., 2008). γ) Τέλος, η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τα MRSA στελέχη **ζωικού κεφαλαίου** (Livestock-acquired - **LA**).

Μία από τις κύριες ιδιότητες των MRSA στελεχών, και των τριών κατηγοριών, είναι η ικανότητά τους να προσαρμόζονται αποτελεσματικά σε περιβαλλοντικές αλλαγές χάρη στην ανταλλαγή γενετικού υλικού με άλλους μικροοργανισμούς μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Giedraitiene, 2011; Santajit & Indrawattana, 2016). Αυτή η απόκτηση καθοριστικών παραγόντων αντοχής από κλινικά συναφή βακτήρια μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συχνότητα αποτυχημένων θεραπειών, ειδικά εάν η ανθεκτικότητα αφορά αντιμικροβιακά που χαρακτηρίζονται ως κρίσιμα ή εξαιρετικά σημαντικά για την ανθρώπινη ιατρική (Santajit & Indrawattana, 2016; WHO, 2017).

3.1 Νοσοκομειακά MRSA Στελέχη (Hospital Associated - HA-MRSA)

Τα πρώτα στελέχη MRSA απομονώθηκαν από νοσοκομειακούς ασθενείς στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και σήμερα ο MRSA θεωρείται η κύρια αιτία ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων παγκοσμίως (Deurenberg & Stobberingh 2008). Τα HA-MRSA στελέχη δεν περιορίζονται πλέον μόνο στα νοσοκομεία, αλλά έχουν εξαπλωθεί και σε άλλες εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης, όπως σε δομές μακροχρόνιας αποκατάστασης (Furuno et al., 2008). Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες και δαπανηρές (Magiorakos et al., 2012). Από τη στιγμή που εμφανίστηκε η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη, παρατηρείται μια τεράστια ενδοноσοκομειακή διάδοση των MRSA στελεχών παγκοσμίως, τα οποία προκαλούν μεγάλη ποικιλία παθήσεων σε νοσηλευόμενους ασθενείς, που περιλαμβάνουν μικρές λοιμώξεις του δέρματος, αλλά και το αποφολιδωτικό σύνδρομο αποκολλησεως της επιδερμίδας, το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας, πνευμονία και μετεγχειρητικές λοιμώξεις με κίνδυνο σηψαιμίας (Rosenthal et al., 2012). Αυτές οι

νοσοκομειακές λοιμώξεις MRSA είναι επιβαρυντικές τόσο για τους ασθενείς όσο και για τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, αλλά και για το σύνολο της οικονομίας, λόγω της συσχέτισής τους με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, του αυξημένου κόστους νοσηλείας και της απουσίας από την εργασία (Abramson & Sexton 1999; Cosgrove et al., 2005; Antonanzas et al., 2015). Τη δεκαετία του 1990 μάλιστα έφτασαν σε πολύ υψηλά ποσοστά, της τάξης του 60% τόσο στις ΗΠΑ, όσο και στις χώρες της Νότιας Ευρώπης, με τα MRSA στελέχη να επικρατούν έναντι των ευαίσθητων στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων (O'Hara et al., 2012; Lindsay, 2013).

3.2 Τα στελέχη κοινότητας (Community Associated - CA-MRSA)

Ήδη εδώ και μία εικοσαετία εμφανίζονται στην κοινότητα στελέχη MRSA, ακόμη και σε νέους, τα οποία προκαλούν λοιμώξεις ατόμων που δεν έχουν τους παράγοντες κινδύνου που συνήθως σχετίζονται με τα HA-MRSA στελέχη, όπως πρόσφατη νοσηλεία, χρόνιες παθήσεις, αιμοκάθαρση, λοίμωξη από τον ιό HIV και ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών (Palavecino, 2004; Kluytmans-Vandenbergh & Kluytmans, 2006). Η πλειοψηφία των κλινικά απομονωθέντων CA-MRSA στελεχών ανακτάται από το δέρμα ή τους μαλακούς ιστούς, κάτι που άλλωστε παρατηρείται και για τα ευαίσθητα στη μεθικιλίνη στελέχη κοινότητας (MSSA) (Maltezou & Giamarellou, 2006). Παρόλο που τα CA-MRSA στελέχη προκαλούν κυρίως δερματικά αποστήματα και δοθιήνωση, εν τούτοις η σοβαρή νεκρωτική πνευμονία και η καταπληξία με κατάληξη τον θάνατο έχουν επίσης συσχετιστεί με τα CA-MRSA (Panlilio et al., 1992; Miller et al., 2005). Αυτά τα νέα στελέχη CA-MRSA είναι συνήθως ανθεκτικά στις β-λακτάμες, αλλά ευαίσθητα σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών και φέρουν ως επί το πλείστον τις σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες (*SCCmec*) τύπου IV, V ή VII. Τα στελέχη CA-MRSA είναι επίσης πιθανό να διαθέτουν μοναδικούς συνδυασμούς παραγόντων μολυσματικότητας και φαίνεται να διαφέρουν γενετικά από τα HA-MRSA (Naïmi et al., 2003; Fey et al., 2003; Palavecino, 2004). Υποστηρίζεται ότι τα CA-MRSA στελέχη έχουν προκύψει από διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα και όχι από την παγκόσμια εξάπλωση ενός μόνο κλώνου (Okuma et al., 2002), καθώς και ότι οι περισσότερες γενεαλογίες του *S. aureus* έχουν την ικανότητα να γίνουν CA-MRSA (Deurenberg & Stobberingh 2008).

Αρχικά, τα CA-MRSA στελέχη απομονώνονταν αποκλειστικά από λοιμώξεις που αποκτιούνταν στην κοινότητα. Διαπιστωνόταν δε, ότι διέφεραν φαινοτυπικά και γονοτυπικά από τα HA-MRSA στελέχη. Ωστόσο, η διάκριση μεταξύ HA-MRSA και CA-MRSA στελεχών έχει αρχίσει να εξασθενεί, καθώς ένας αυξημένος αριθμός αναφορών έδειξε ότι τα CA-MRSA είναι πλέον ενδημικά σε πολλά νοσοκομεία (Maree et al., 2007). Επιπλέον, τα CA-MRSA στελέχη έχουν αναδειχθεί ως αίτια λοιμώξεων που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη και έχουν αρχίσει να αντικαθιστούν τα παραδοσιακά HA-MRSA στελέχη σε πολλά συστήματα υγειονομικής περίθαλψης (Otter & French 2011). Επειδή, όμως, οι λοιμώξεις CA-MRSA μπορούν να εμφανιστούν σε ασθενείς χωρίς παράγοντες κινδύνου, η πιθανή ομάδα κινδύνου μόλυνσης είναι μεγαλύτερη εκείνης των παραδοσιακών HA-MRSA στελεχών. Επιπλέον, παρόλο που είχε θεωρηθεί ότι τα CA-MRSA στελέχη δεν θα μπορούσαν να επιβιώσουν στο νοσοκομειακό περιβάλλον λόγω της ευαισθησίας τους σε παράγοντες εκτός των β-λακταμών, είναι πλέον προφανές ότι οι CA-MRSA κλώνοι έχουν τη δυνατότητα να αποκτήσουν νέα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας και να καταστούν ανθεκτικοί και σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων (Varga et al., 2012). Έτσι, τα CA-

MRSA στελέχη είναι σήμερα ενδημικά στην κοινότητα σε συγκεκριμένες χώρες, όπως στις ΗΠΑ, και έχουν αναδειχθεί σε μείζονος σημασίας πολυανθεκτικούς ενδονοσοκομειακούς κλώνους (Otto, 2013).

3.3 Τα στελέχη ζωικού κεφαλαίου (Livestock Associated - LA-MRSA)

Η τακτική χρήση αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων ανάπτυξης των ζώων, μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των MRSA στελεχών στις κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις (Greenen et al., 2010). Επιπλέον, η υπερβολική χορήγηση βαρέων μετάλλων (π.χ. χαλκός, ψευδάργυρος) ως πρόσθετα ζωοτροφών μπορεί να ενθαρρύνει την ανάπτυξη των LA-MRSA, λόγω της συνεπιλογής γονιδίων αντοχής στα βαρέα μέταλλα, όπως συνέβη με τη χορήγηση ψευδαργύρου στους χοίρους και την ανάδυση LA-MRSA στελεχών (Cavaco et al., 2010; Moodley et al., 2011). Έτσι, η ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες έχει επεκταθεί σε κτηνοτροφικά περιβάλλοντα όπου συγκεκριμένοι MRSA κλώνοι, όπως ο ST398 έχουν καταστεί συχνοί αποικιστές των παραγωγικών ζώων, αλλά και των ανθρώπων που έρχονται σε επαφή με αυτά (Harper et al., 2010; Fluit, 2012), αποτελώντας έναν αυξανόμενο κίνδυνο υγείας.

Τα LA-MRSA στελέχη πρωτοπεριγράφηκαν το 2005, οπότε αναγνωρίστηκε ένας νέος MRSA κλώνος της αλληλουχίας ST398 που ομαδοποιήθηκε στο κλωνικό σύμπλεγμα CC3981 (Voss et al., 2005). Η ολική αλληλούχιση του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) έδειξε ότι τα LA-MRSA στελέχη φαίνεται να προέρχονται από έναν προγονικό MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) κλώνο με ανθρώπινη προέλευση (Price et al., 2012; Vandendriessche et al., 2014), υποστηρίζοντας την άποψη ότι σχεδόν πάντοτε τα στελέχη *S. aureus* ζωικής προέλευσης, προέρχονται από ανθρώπινα στελέχη, κατόπιν προσαρμογής τους (Boss et al., 2016). Η γενεαλογία LA-MRSA CC398, που πρωτοεμφανίστηκε σε χοίρους της Ευρώπης μεταξύ 2003 και 2005 έχει έκτοτε εντοπιστεί σε άλλα είδη παραγωγικών και ζώων συντροφιάς πολλών ευρωπαϊκών χωρών, ακόμη και σε Αμερική, Ασία και Αυστραλία, μπορεί να αποικεί το ζώο αλλά σπάνια προκαλεί λοιμώξεις (Smith et al., 2013; Goerge et al., 2017). Ο ασυμπτωματικός αποικισμός είναι κοινός, αν και μπορεί να προκαλέσει ποικιλία λοιμώξεων σε ανθρώπους, ακόμη να επιφέρει και τον θάνατο (Cuny et al., 2015). Ωστόσο, η επίπτωση της νόσου των LA-MRSA στον άνθρωπο είναι μικρότερη σε σύγκριση με άλλες MRSA γενεαλογίες, πιθανώς επειδή οι ασθενείς που προσβάλλονται από το κλωνικό σύμπλεγμα MRSA CC398 παρουσιάζουν γενικά διαφορετικά δημογραφικά στοιχεία, όπως είναι νεότεροι ή παραμένουν για μικρότερο χρονικό διάστημα στο νοσοκομείο, οπότε και τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι συνήθως λιγότερο σοβαρά (Becker et al., 2017). Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το LA-MRSA CC398 θεωρείται ότι δεν είναι εγγενώς λιγότερο παθογόνο για τον άνθρωπο από τον *S. aureus*, αλλά αποτελεί μια αναδύομενη κατηγορία *S. aureus* παγκοσμίως (Cuny et al., 2015; Smith, 2015).

Αν και τα προσαρμοσμένα στα ζώα LA-MRSA στελέχη είναι γνωστά εδώ και αρκετά χρόνια, οι πρόσφατες αναφορές υποδηλώνουν μια πιθανή αυξανόμενη τάση στη ζωνωτική τους μετάδοση στην Ευρώπη, επιβεβαιώνοντας ότι άτομα σε επαφή με ζώα μπορεί να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αποικιστούν με LA-MRSA. Έτσι, ο αποικισμός με LA-MRSA CC398 έχει ανιχνευθεί στο 24-86% των χοίρων, στο 31-37% των βοοειδών, στο 9-37% των κτηνοτρόφων πουλερικών, καθώς και στο 44-45% των κτηνιάτρων χοίρων στις ευρωπαϊκές χώρες (Goerge et al., 2017). Όσον αφορά τους

χοίρους, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η ευαισθητοποίηση σχετικά με την πιθανή δεξαμενή των MRSA σε ζώα και ιδιαίτερα σε χοίρους, αφού έχει δειχτεί ότι μεγάλος επιπολασμός της ρινικής φορέας στελεχών MRSA ανήκει στον τύπο MLST ST398 και απαντάται σε ανθρώπους σε επαφή με χοίρους (Mammìna et al., 2010). Ωστόσο, ο αποικισμός πιστεύεται ότι εξαρτάται από τη συχνότητα, την ένταση της επαφής με τα ζώα και τη διάρκεια της έκθεσης, καθώς τα ζώα θεωρούνται παροδικοί και όχι μόνιμοι αποικιστές (Bangerter et al., 2016). Επίσης, η μόλυνση ανθρώπων από σφάγια ή προϊόντα κρέατος σε σφαγεία ή μονάδες επεξεργασίας κρέατος μπορεί να συμβεί και να αποτελέσει πηγή MRSA στελεχών, τα οποία δεν σχετίζονται με την κτηνοτροφία (Hadjirin et al., 2015). Παρόλο που το CC398 είναι η κύρια γενεαλογία που σχετίζεται με τα LA-MRSA που απομονώνονται από ζώα, και άλλα κλωνικά σύμπλοκα και τύποι αλληλουχιών (STs) εκτός του CC398, έχουν επίσης συσχετιστεί με ζώα και ζωικά προϊόντα (EFSA & ECDC, 2015). Η επιτήρηση των LA-MRSA σε ζώα και τρόφιμα είναι προαιρετική στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Αν και η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) συνιστά την τακτική παρακολούθηση των LA-MRSA στελεχών σε κρεοπαραγωγά ορνίθια, χοίρους πάχυνσης και γαλακτοπαραγωγικά βοοειδή, σε αυτή δεν συμμετέχουν όλα τα Κράτη Μέλη (EFSA & ECDC, 2017).

4. MRSA ΣΕ ΛΥΜΑΤΑ

Εκτός από τις νοσοκομειακές και κτηνιατρικές εγκαταστάσεις και τα μη κλινικά περιβάλλοντα, όπως τα λύματα, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διάδοση της αντιβιοαντοχής (Martinez, 2006). Μεγάλο μέρος των αντιβιοτικών που καταναλώνονται δεν απορροφώνται και μπορεί να καταλήξουν στα λύματα. Έτσι, β-λακταμικά αντιβιοτικά έχουν ανιχνευθεί τόσο σε επιφανειακά νερά όσο και σε λύματα (Watkinson et al., 2009), παρόλο που δεν εμμένουν σε υδάτινα περιβάλλοντα, λόγω υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου (Cha et al., 2006). Μελέτες έδειξαν ότι οι βιολογικοί καθαρισμοί μπορεί να είναι ένα μέσον διάδοσης αντιμικροβιακών και αντιβιοανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, κυρίως μέσω των υδάτων εκροής και της ιλύος, όπου βρέθηκαν σημαντικά υψηλότεροι αριθμοί ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων σε σύγκριση με το φυσικό περιβάλλον (Kim & Aga, 2007; Rizzo et al., 2013).

Αν και οι περισσότερες μελέτες για τον χαρακτηρισμό των ανθεκτικών βακτηρίων στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων επικεντρώνονται σε βακτήρια δείκτες κοπρανόδους μόλυνσης, ωστόσο κάποιες μελέτες έχουν αναφέρει την παρουσία στελεχών *S. aureus* (Porrero et al., 2014), MRSA (Rosenberg et al., 2012) και CoNS (Colomer-Lluch et al., 2014), καθώς και την παρουσία γονιδίων αντιβιοαντοχής σε βιολογικούς καθαρισμούς (Heß & Gallert, 2014). Σε όλες τις περιπτώσεις η παρουσία του *S. aureus* μετά την επεξεργασία φαίνεται να είναι χαμηλή. Ωστόσο, οι MRSA θεωρούνται αναδυόμενοι μολυντές στα υδάτινα περιβάλλοντα και τα απομονωθέντα από τα λύματα στελέχη μπορεί να είναι πιο μολυσματικά και περισσότερο πολυανθεκτικά (Borjesson et al., 2010).

Τα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων αποδεικνύονται σημαντικές δεξαμενές για διάφορα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των MRSA, τα οποία προέρχονται από νοσοκομειακά στελέχη (Farzana et al., 2011; Chen & Zhang, 2013). Πράγματι, το γονίδιο *mecA*, που κωδικοποιεί την αντίσταση στη μεθικιλίνη, καθώς και MRSA στελέχη είναι ταυτόχρονα ανιχνεύσιμα σε νοσοκομειακά και αστικά λύματα

(Borjesson et al., 2009a; 2009b), υποδεικνύοντας ότι οι αστικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι σημεία διάδοσης του γονιδίου *mecA* και των MRSA στελεχών (Rosenberg et al., 2012). Ομοίως, έχει αναφερθεί ότι τα απομονωθέντα MRSA στελέχη από τα αστικά λύματα έχουν στενή γενετική σχέση με κλινικά απομονωθέντα στελέχη, αντανακλώντας πιθανότατα τη διασπορά αυτών των στελεχών μεταξύ των ανθρώπων (Borjesson et al., 2010). Θα μπορούσε, επομένως, να ειπωθεί ότι η διαδικασία επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι ικανή να μειώσει το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηρίων κατά την έξοδό τους από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας (Silva et al., 2006).

Αναλόγως, τα λύματα των σφαγείων ζώων, θεωρούνται πηγή ανθεκτικών μικροοργανισμών με κλινική σημασία, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διασπορά αυτών των στελεχών στο περιβάλλον. Λόγω του μεγάλου αριθμού των προσερχομένων ζώων, τα λύματα από τα διαφορετικά στάδια παραγωγής στα σφαγεία αποτελούν πηγές MRSA βακτηρίων. Επιπλέον, η ανεπαρκής επεξεργασία στις εσωτερικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων των σφαγείων θα μπορούσε να αποτελέσει τον αγωγό απόρριψης στο περιβάλλον και την κοινότητα κλινικά σημαντικών και/ή ανθεκτικών βακτηρίων (Diallo et al., 2013; Wan & Chou, 2014; 2015). Επί παραδείγματι, έχει αναφερθεί ότι σε μονάδες επεξεργασίας σφαγείων χοίρων τα λύματα εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του γονιδίου *mecA* από ό, τι τα απόβλητα σε μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Αυτό δείχνει ότι η συνεχής απόρριψη των λυμάτων σφαγείων μπορεί να διοχετεύσει το γονίδιο *mecA* σε φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα με συνέπεια τη μετατροπή του περιβαλλοντικού *S. aureus* σε MRSA μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, καθιστώντας έτσι, τα λύματα των σφαγείων χοίρων πιθανές δεξαμενές του *S. aureus* (Wan & Chou, 2014). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε λύματα πτηνοσφαγείου, όπου οι τύποι spa που προσδιορίστηκαν αντιπροσώπευαν τα συχνότερα απομονωθέντα LA-MRSA στελέχη, τα οποία ανακτήθηκαν από νοσοκομειακούς και περιπατητικούς ασθενείς στη Γερμανία σε αναπτυγμένες κτηνοτροφικά περιοχές (Savin et al., 2020).

Έτσι, το νερό επεξεργασίας που συσσωρεύεται κατά τη σφαγή είναι μια σημαντική δεξαμενή για τα πολυανθεκτικά βακτήρια ζωικού κεφαλαίου. Με αυτό τον τρόπο, τα ανθεκτικά και παθογόνα στελέχη *Staphylococcus* spp. μπορούν να φτάσουν στα επιφανειακά ύδατα και τον αέρα με τα λύματα που διοχετεύονται στο περιβάλλον. Αυτά τα στελέχη αυξάνουν την περιβαλλοντική δεξαμενή των γενετικών καθοριστών που προσδίδουν αυξημένη μολυσματικότητα και αντιβιοανθεκτικότητα, συνιστώντας κίνδυνο για τους εργαζόμενους των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων που έρχονται σε καθημερινή επαφή με τα βιοαερόλυματα, αλλά και για τους κατοίκους των γύρω περιοχών, καθώς απελευθερώνονται στον αέρα κατά την ανάδευση και τον αερισμό των λυμάτων (Maki et al., 2017; Roodbari et al., 2013). Συνεπώς, απαιτείται η χρήση προηγμένων τεχνολογιών επεξεργασίας λυμάτων και η απολύμανση αυτών, όπως ο συνδυασμός οξειδωτικών και προσροφητικών τεχνολογιών, αλλά και διηθητικών μεμβρανών, προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση του περιβάλλοντος με προαιρετικά παθογόνα βακτήρια και τους καθοριστικούς παράγοντες αντιβιοαντοχής τους (Hembach et al., 2019).

Τέλος, τα επεξεργασμένα λύματα επαναχρησιμοποιούνται με διάφορους τρόπους, όπως στη γεωργία, σε υδατοκαλλιέργειες και σε βιομηχανικούς σκοπούς, διαδίδοντας τα ανθεκτικά και μολυσματικά βακτήρια, που αποτελούν απειλή για τη δημόσια υγεία. Κατά τη διάρκεια αυτών των δραστηριοτήτων, τα άτομα μπορεί να έρθουν σε επαφή με

αυτά τα επαναχρησιμοποιημένα λύματα και να εκτεθούν δυνητικά στα παραμένοντα βακτήρια (Said et al., 2017). Έτσι, είναι κρίσιμα σημεία η διαδικασία εξυγίανσης των λυμάτων με στόχο τη μείωση της εκροής βακτηρίων, η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας, που βασίζεται στην παρακολούθηση των συμβατικών παραμέτρων ποιότητας του νερού, καθώς και οι παρεμβάσεις κατά της περαιτέρω μετάδοσης και διάδοσης αυτών των παραγόντων κινδύνου (Gómez et al., 2016). Αναμφίβολα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί η παρουσία των MRSA στελεχών στα λύματα, καθώς και η επίδραση των διαδικασιών επεξεργασίας λυμάτων στα MRSA στελέχη.

5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ *Staphylococcus aureus* - MRSA

Η αντιβιοανθεκτικότητα του *Staphylococcus* είχε γίνει ήδη γνωστή από τη δεκαετία του 1940, οπότε και εμφανίστηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη του *S. aureus*. Τα στελέχη αυτά διέθεταν την ικανότητα παραγωγής του ενζύμου β-λακταμάση, το οποίο ευθύνεται για την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της αντιβιοτικής δράσης της πενικιλίνης. Ως απάντηση σε αυτή την αντίσταση χρησιμοποιήθηκε η μεθικιλίνη, μια πενικιλινασοάντοχη πενικιλίνη, ωστόσο φαινόμενα ανθεκτικότητας δεν άργησαν να εμφανιστούν και πάλι (Lowy, 2003). Οι περισσότεροι ερευνητές φαίνεται να συμφωνούν ότι τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (MRSA) στελέχη εμφανίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1960 με την απόκτηση του γονιδίου αντίστασης στη μεθικιλίνη, του *mecA*, το οποίο κωδικοποιεί μια πενικιλλοδεσμευτική πρωτεΐνη (PBP), καθιστώντας τους σταφυλοκόκκους ικανούς να συνθέτουν το κυτταρικό τους τοίχωμα παρουσία του αντιβιοτικού (Ubukata et al., 1985; Foster, 2017). Το γονίδιο *mecA* φέρεται από το γενετικό στοιχείο (νησίδιο λοιμογονικότητας) *SCCmec*. Η δομή του στοιχείου *SCCmec* ποικίλει, περιλαμβάνει 13 τύπους (I-XIII), καθώς και υποτύπους στελεχών του *S. aureus* (Baig et al., 2018) και δεν απαντάται σε κανένα άλλο βακτηριακό γένος (Hiramatsu et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Robinson & Enright, 2003; Deurenberg & Stobberingh 2008). Το γενετικό στοιχείο *SCCmec*, περιέχει τα ακόλουθα δύο βασικά συστατικά: το σύμπλεγμα γονιδίων *mec* και το σύμπλεγμα γονιδίων *ccr* (Zong et al., 2011). Το σύμπλεγμα γονιδίων *mec*, το οποίο σχετίζεται με τη ρύθμιση της ανοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, αποτελείται από το γονίδιο *mecA*, τα ρυθμιστικά γονίδια και τις σχετικές ακολουθίες εισαγωγής και έχει ταξινομηθεί σε έξι διαφορετικές κατηγορίες (A, B, C1, C2, D και E) μαζί με τα γονίδια κασέτας της ανασυνδυάσης (ρεκομπινάσης) του χρωμοσώματος (*ccr*)- (*ccrC* ή το ζεύγος *ccrA* και *ccrB*), που διέπουν την κινητικότητα της *SCCmec* και κωδικοποιούν τις ανασυνδυάσεις που μεσολαβούν στην ενσωμάτωση και την εκτομή του *SCCmec* μέσα και από το χρωμόσωμα. Επιπλέον, το *SCCmec* περιέχει και λίγα άλλα γονίδια όπως αλληλουχίες εισαγωγής, τρανσποζόνια και πλασμίδια (Zong et al., 2011). Το *SCCmec* είναι ενσωματωμένο κοντά στο σημείο έναρξης της αντιγραφής του *S. aureus*, και αυτή η θέση μπορεί να είναι κρίσιμη λόγω της δυνατότητας απόκτησης γονιδίων αντιβιοαντοχής των MRSA στελεχών (Hiramatsu et al., 2001; Deurenberg & Stobberingh 2008). Τα πρώιμα απομονωθέντα MRSA στελέχη έμοιαζαν φαινοτυπικά και γενετικά με τα πρώιμα απομονωθέντα MSSA στελέχη, υποδηλώνοντας ότι τα πρώιμα MSSA στελέχη πιθανώς αντιπροσωπεύουν τους απογόνους ενός στελέχους που χρησίμευσε ως ένας από τους πρώτους αποδέκτες αντίστασης στη μεθικιλίνη του *S. aureus* στην Ευρώπη (Crisostomo et al., 2001).

Μερικές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν την εξελικτική προέλευση των MRSA στελεχών. Η υπόθεση του μονού κλώνου, βασισμένη σε πρώιμες αναλύσεις των πολυμορφισμών του μήκους θραύσματος περιορισμού με τη χρήση ανιχνευτών για *mecA* και Tn554, υποδηλώνει ότι το *mecA* εισήλθε κάποτε στον πληθυσμό του *S. aureus* και κατέληξε στον σχηματισμό ενός μονού MRSA κλώνου που έκτοτε έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως (Kreiwirth et al., 1993). Η δεύτερη υπόθεση, βασισμένη στην ανίχνευση του *mecA* με διάφορους τύπους ηλεκτροφόρησης (MLEE) του *S. aureus*, προτείνει ότι τα στελέχη MRSA εξελίχθηκαν πολλές φορές μέσω της οριζόντιας μεταφοράς του *mecA* σε φυλογενετικά διακριτά πρόδρομα MSSA στελέχη (Musser & Kapur, 1992; Enright et al., 2000). Επίσης, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία μικροσυτοιχιών DNA (microarray), το *mecA* ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον πέντε αποκλίνουσες γενεές, υποδηλώνοντας ότι η οριζόντια μεταφορά του *mecA* έπαιξε θεμελιώδη ρόλο στην εξέλιξη του MRSA (Fitzgerald et al., 2001). Έχει διατυπωθεί ότι ο MRSA έχει εμφανιστεί τουλάχιστον 20 φορές από την απόκτηση του γονιδίου *mecA* (Bartel et al., 2007; Deurenberg & Stobberingh 2008). Ακόμη, η μεταφορά του *mecA* από τον *S. epidermidis* στον *S. aureus* παρατηρήθηκε και *in vivo*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *mecA* μπορεί να μεταφέρεται στον MSSA με μεγάλη συχνότητα (Wielders et al., 2001). Η ανακάλυψη του γονιδίου *mecC* οδήγησε στην υιοθέτηση νέων διαγνωστικών κριτηρίων και οδηγιών για την ανίχνευση των MRSA στελεχών (García-Álvarez et al., 2011).

Πιο πρόσφατα δεδομένα που ελήφθησαν από πολλαπλές μελέτες έδειξαν ότι το *mecA* προήλθε από ένα αβλαβές βασικό γονίδιο (*mecA1*) που κωδικοποιεί την πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη D (PBPD) σε σταφυλοκοκκικά είδη ζωικής προέλευσης (ομάδα *S. sciuri*), λόγω της εκτεταμένης χρήσης β-λακταμών. Η εμφάνιση του παράγοντα ανθεκτικότητας περιελάμβανε την παραμόρφωση της ενεργού θέσης PBPD, αύξηση της έκφρασης του *mecA1*, προσθήκη ρυθμιστών (*mecR1*, *mecI*) και ενσωμάτωση στο κινητό γενετικό στοιχείο *SCCmec*. Το *SCCmec* μεταφέρθηκε στη συνέχεια σε είδη σταφυλόκοκκων πηκτάση αρνητικών (CoNS) ικανών να αποικίσουν ζώα και ανθρώπους και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στον *S. aureus* ανθρώπινης προέλευσης. Η προσαρμογή του *S. aureus* στο εξωγενώς αποκτηθέν *SCCmec*, περιελάμβανε τη διαγραφή και μετάλλαξη γονιδίων που εμπλέκονται στο γενικό μεταβολισμό (βοηθητικά γονίδια), τη γενική απόκριση στο στρες και την προσαρμογή των μεταβολικών δικτύων. Όλα αυτά συνοδεύτηκαν από την αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης β-λακταμών και από τη μετάβαση από ένα ετερογενές σε ένα ομοιογενές προφίλ ανθεκτικότητας (Miragaia, 2018). Ειδικά, το μικρό μέγεθος του *SCCmec* IV μπορεί να διευκολύνει την ενσωμάτωσή του σε σταφυλόκοκκους διαφορετικών γενεών. Αυτό είναι πολύ ενδιαφέρον επειδή το *SCCmec* IV έχει βρεθεί στα περισσότερα απομονωμένα CA-MRSA στελέχη. Γενικά, τα CA-MRSA στελέχη έχουν μεγαλύτερη κλωνική ποικιλομορφία από τα στελέχη HA-MRSA, που υποδηλώνει ότι αυτοί οι κλώνοι διαθέτουν ένα γενετικό περιβάλλον που διευκολύνει την ενσωμάτωση του *SCCmec*. Οι πανδημικοί κλώνοι που σχετίζονται με νοσοκομειακές λοιμώξεις φέρουν τα *SCCmec* I, II ή III, και η επιλογή και η εξάπλωση των HA-MRSA στελεχών που φιλοξενούν αυτά τα στοιχεία στα νοσοκομεία πιθανότατα συμβαίνει λόγω της έκθεσης σε αντιβιοτικά στο πέρασμα του χρόνου. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα στελέχη CA-MRSA με διαφορετικούς τύπους *SCCmec* απομονώνονται όλο και περισσότερο σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα και σε ορισμένες περιοχές αντικαθιστούν τα στελέχη HA-MRSA σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις (Bartel et al., 2007; Deurenberg & Stobberingh 2008).

Σήμερα, ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) που φέρει το SCCmec αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παγκόσμιες πανδημίες. Είναι εντυπωσιακό ότι τα περισσότερα από τα γεγονότα που οδήγησαν στην ανάπτυξη αντοχής στη β-λακτάμη συνέβησαν στην ομάδα των πιο πρωτόγονων ειδών *Staphylococcus* που σχετίζονται με τα ζώα και τα οποία απομονώθηκαν από παραγωγικά ζώα ή από ανθρώπινες μολύνσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για μια στρατηγική επιβίωσης αυτών των βακτηρίων κατά της ανθρώπινης χρήσης αντιμικροβιακών. Η μεταπήδηση του SCCmec από ζώα σε είδη *Staphylococcus* που συνδέονται με τον άνθρωπο, όπως ο *S. aureus*, ήταν ένα βασικό γεγονός που οδήγησε σε πολλές πανδημίες παγκοσμίως (Miragaia, 2018). Πράγματι, πολλές δημοσιεύσεις περιέγραψαν την παρουσία στελεχών MRSA που φέρουν το *mecA* σε ανθρώπους και ζώα, με τα ίδια χαρακτηριστικά, δείχνοντας τη ζωνοτική μετάδοση αυτών των στελεχών (Feßler et al., 2010; Smith et al., 2013; van den Eede et al., 2013; Grontvedt et al., 2016).

6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ MRSA ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ

Η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης της αντιβιοαντοχής του MRSA είναι θεμελιώδης για την εκ των προτέρων προειδοποίηση και προεπισκόπηση της μεγάλης διάδοσης της αντιβιοανθεκτικότητας, επιτρέποντας, παράλληλα, τον σχεδιασμό στρατηγικών για την πρόληψη της εξάπλωσής της.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ανθεκτικές στη δράση των β-λακταμασών πενικιλίνες, όπως η μεθικιλίνη, αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν β-λακταμάσες. Ωστόσο, σύντομα εμφανίστηκαν στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά σε αυτούς τους παράγοντες (Barber, 1961), καθιστώντας τα MRSA στελέχη υψηλής σπουδαιότητας, καθώς εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η κύρια κινητήρια δύναμη για την εμφάνιση αντοχής στις β-λακτάμες στους σταφυλόκοκκους ήταν η συνεχής έκθεση σε β-λακτάμες σε πολλαπλά περιβάλλοντα, όπως σε εδάφη όπου έπρεπε να συνυπάρχουν με μύκητες που παράγουν πενικιλίνη, σε κτηνοτροφικές μονάδες παραγωγής, όπου μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών β-λακτάμης χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα τροφίμων, καθώς και κατά τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων (National Research Council, 1980; Westh et al., 2004; Castanon 2007).

Η αντίσταση των *Staphylococcus* spp. στα αντιβιοτικά β-λακτάμης οφείλεται κυρίως σε τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς οι οποίοι, ωστόσο, μπορούν να αλληλεπιδράσουν. Ο πρώτος μηχανισμός συνίσταται στην υπερπαραγωγή της β-λακταμάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει το αντιβιοτικό (McDougal & Thornsberry, 1986). Ο δεύτερος μηχανισμός οφείλεται στην τροποποίηση των φυσιολογικών πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs), που εμπλέκονται στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, του κύριου δομικού συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου (Tomasz et al., 1989). Τα στελέχη του *S. aureus* διαθέτουν τέσσερις φυσιολογικές PBPs προσκολλημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτές οι φυσιολογικές PBPs έχουν δραστηριότητα παρόμοια με τις πρωτεάσες σερίνης και παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με τους παράγοντες της β-λακτάμης. Όταν συμβεί αυτή η σύνδεση, οι PBPs δεν είναι σε θέση να λειτουργήσουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου, προκαλώντας τον βακτηριακό θάνατο (Chambers, 1997).

Ο τρίτος μηχανισμός αντιβιοαντοχής, τον οποίο παρουσιάζουν τα περισσότερα κλινικά στελέχη, σχετίζεται με την αλλαγή του τόπου δράσης των β-λακταμών με την παραγωγή μιας νέας πενικιλλοδεσμευτικής πρωτεΐνης, της PBP2a, η οποία απουσιάζει σε ευαίσθητους σταφυλόκοκκους. Η PBP2a δεν αποτελεί μέρος του εγγενούς συνόλου των PBP's του *S. aureus*, αλλά είναι μια μοναδική, επίκτητη πρωτεΐνη που παράγεται μόνο από σταφυλόκοκκους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* (Deurenberg & Stobberingh 2008). Έχει χαμηλή συγγένεια με τις β-λακτάμες, και ως εκ τούτου είναι σε θέση να υποκαταστήσει τις βιοσυνθετικές λειτουργίες των φυσιολογικών PBP's ακόμη και παρουσία των β-λακταμών, εμποδίζοντας έτσι την κυτταρική λύση (Ubukata et al., 1985). Στελέχη που διαθέτουν τον μηχανισμό αντίστασης που προκαλείται από την PBP2a είναι ανθεκτικά σε όλες τις διαθέσιμες β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των πενικιλινών, κεφαλοσπορινών, σε συνδυασμούς αναστολέων β-λακτάμης/β-λακταμάσης, στις μονοβακτάμες και στις καρβαπενέμες (Fasola & Peterson, 1992; Chambers, 1997)], αλλά και σε αμινογλυκοσίδες, μακρολίδια, στη χλωραμφενικόλη, την τετρακυκλίνη και τις φθοροκινολόνες, καθιστώντας έτσι την αντοχή στα αντιβιοτικά ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, με σημαντικό οικονομικό και κοινωνικό κόστος (Capitano et al., 2003). Στις λιγότερες β-λακτάμες στις οποίες το *mecA* δεν παρέχει ανθεκτικότητα περιλαμβάνονται οι κεφτομπιρόλη και κεφταρολίνη που είναι δραστικές κατά του MRSA (Entenza et al., 2002; Ishikawa et al., 2003).

Τα τελευταία χρόνια, η ευρεία χρήση αντιβιοτικών β-λακτάμης έχει αυξηθεί. Οι μελέτες επιτήρησης στην Ευρώπη δείχνουν ότι το 25% της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών (σε mg/PCU) που αφορά κτηνιατρική χρήση σχετίζεται με την πενικιλίνη (Report SE, 2015). Πολλά από τα αυτά τα σκευάσματα χρησιμοποιούνται για μη θεραπευτικούς σκοπούς σε κοτόπουλα, βοοειδή και χοίρους, ενώ μια μικρή μόνο ποσότητα, συγκριτικά, χρησιμοποιείται για κλινικές θεραπείες (World Organization for Animal Health, 2016). Φυσική συνέπεια αυτού είναι η εμφάνιση MRSA στελεχών που έχουν αποκτήσει γονίδια πολλαπλής ανθεκτικότητας ακόμη και στα γλυκοπεπτιδία, όπως στη βανκομυκίνη και στην τεϊκοπλανίνη (Azhar et al. 2017). Ως εκ τούτου, η επίγνωση του επιπολασμού του MRSA και του αντιμικροβιακού του προφίλ καθίστανται απαραίτητα στην επιλογή εύχρηστων εμπειρικών μεθόδων θεραπείας αυτών των λοιμώξεων.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΩΝ MRSA ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΤΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η μελέτη της γενετικής συγγένειας των στελεχών που ανακτώνται από μια επιδημιολογική συρροή κρουσμάτων ή κατά τη διάρκεια της λοίμωξης ενός μεμονωμένου ασθενούς αποτελεί μια χρήσιμη πρακτική σε πολλά κλινικά εργαστήρια και εργαστήρια ελέγχου λοιμώξεων. Ο στόχος αυτών των τεχνικών είναι να προσδιοριστεί εάν τα απομονωθέντα προϊόντα που ανακτήθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς ή πηγές αντιπροσωπεύουν ένα μόνο στέλεχος ή πολλαπλά διαφορετικά στελέχη. Οι πληροφορίες που παρέχονται από μοριακές διαδικασίες συμπληρώνουν την επιδημιολογική έρευνα, ενώ οι κλινικοί ιατροί, βάσει αυτών των πληροφοριών, μπορούν να διακρίνουν την υποτροπή και την επανεμφάνιση της λοίμωξης σε έναν μεμονωμένο ασθενή. Οι κλινικοί μικροβιολόγοι έχουν χρησιμοποιήσει φαινοτυπικές μεθόδους για να διακρίνουν στελέχη του ίδιου είδους. Αυτές οι φαινοτυπικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την οροτυπία, βιοτυπία, τυποποίηση βακτηριοφάγου, προφίλ αντιμικροβιακής ευαισθησίας,

την ανοσοαποτύπωση ή πρωτεϊνοτυπία με τη μέθοδο western blot (western blot immunoblotting) και την πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (multi-locus enzyme electrophoresis - MLST). Από αυτές, η τυποποίηση βακτηριοφάγου (λυσιτυπία) χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν σε εργαστήρια αναφοράς για τη διαφοροποίηση μη σχετιζόμενων απομονωθέντων στελεχών *S. aureus*, αλλά λόγω των τεχνικών απαιτήσεων και της κακής αναπαραγωγιμότητας, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται πλέον σπάνια.

7.1 Αντιμικροβιακό προφίλ ευαισθησίας

Το αντιμικροβιακό προφίλ ευαισθησίας είναι η φαινοτυπική τεχνική που χρησιμοποιείται συχνότερα από τα κλινικά εργαστήρια μικροβιολογίας, επειδή τα δεδομένα είναι άμεσα διαθέσιμα. Αυτή πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία τυποποιημένων χειρωνακτικών και εμπορικών μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν: α) τη μέθοδο διάχυσης με τη χρήση δισκίων αντιβιοτικού σε άγαρ – μέθοδος των εμποτισμένων δισκίων με αντιβιοτικό (disk-diffusion method, Kirby- Bauer), β) τη μέθοδο της διάλυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ (agar dilution method) ή ζωμό (broth microdilution method) σε συγκέντρωση που επιλέγεται με βάση την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) και γ) τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με τη χρήση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (antimicrobial gradient diffusion in agar method, Epsilometer test, E-test) (CLSI 2017, EUCAST, 2020). Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Κλινικών Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI), ένας μικροοργανισμός θεωρείται ευαίσθητος, ενδιάμεσος ή ανθεκτικός σύμφωνα με τα καθορισμένα όρια αντοχής. Μια «ευαίσθητη» ερμηνεία δηλώνει ότι το προϊόν απομόνωσης αναστέλλεται από τη συνήθως επιτεύξιμη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, όταν χρησιμοποιείται η συνιστώμενη δοσολογία για τη θεραπεία συγκεκριμένης λοίμωξης (CLSI 2017).

7.2 Ανίχνευση Αντοχής στην οξακιλλίνη (μεθικιλίνη)

Ένα διακριτικό χαρακτηριστικό της αντίστασης στη μεθικιλίνη είναι η ετερογενής έκφρασή της, με την πλειοψηφία των κυττάρων να είναι ευαίσθητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξακιλλίνης και μόνο ένα μικρό ποσοστό κυττάρων να αναπτύσσεται σε συγκέντρωση οξακιλλίνης μεγαλύτερη από 50 µg/ml. Κατά συνέπεια, οι δοκιμές in vitro τροποποιήθηκαν για να ενισχύσουν την έκφραση της αντίστασης στην οξακιλλίνη προς ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών (Chambers & Hackbarth, 1987; Fasola & Peterson, 1992). Τα περισσότερα από τα MRSA στελέχη που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη είναι ανθεκτικά σε πολλαπλές κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως αμινογλυκοσίδες, κλινδαμυκίνη, μακρολίδια, κινολόνες, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνη (Fasola & Peterson, 1992; Chambers, 1997). Ωστόσο, τα περισσότερα στελέχη CA-MRSA που φέρουν το SCC_{mec} τύπου IV είναι συνήθως ανθεκτικά στα αντιβιοτικά β-λακτάμης και στα μακρολίδια, αλλά ευαίσθητα σε άλλες κατηγορίες (Palavecino, 2004). Το Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), δίνει συστάσεις για διάφορες τυποποιημένες μεθόδους για την ανίχνευση αντοχής στην οξακιλλίνη του *S. aureus*, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων αραιώσης σε ζωμό και άγαρ και μεθόδους ελέγχου σε άγαρ (Takano et al, 2008). Όλες αυτές οι δοκιμές απαιτούν επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασίες περί τους 35 °C. Η ενίσχυση του ζωμού ή

του Mueller-Hinton άγαρ με 2 % NaCl πρέπει να γίνεται για τις δοκιμές διάχυσης (CLSI, 2012). Οι δοκιμές ελέγχου σε άγαρ έχουν αξιολογηθεί σε πολυάριθμες μελέτες και έχει διαπιστωθεί ότι είναι εξαιρετικές για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών. Έχουν χρησιμοποιηθεί από εργαστήρια ελέγχου λοιμώξεων για τον έλεγχο αποικισμένων ασθενών και αποτελούν τη συνιστώμενη επιβεβαιωτική μέθοδο, εκτός από τις μεθόδους αραίωσης, ελέγχου της αντίστασης στη μεθικιλίνη του *S. aureus* (CLSI,2012).

Για τη δοκιμή διάχυσης δίσκου (Kirby-Bauer), οι ερευνητές απέδειξαν ότι οι δίσκοι κεφοξιτίνης αποδίδουν ισοδύναμα αποτελέσματα με τη μικροδιάλυση ζωμού οξακιλλίνης και είναι ευκολότερο να διαβαστούν σε σχέση με τη διάχυση δίσκου (Swenson & Tenover, 2005). Με βάση αυτά τα ευρήματα, το CLSI υιοθέτησε τη χρήση της διάχυσης δίσκου κεφοξιτίνης για την πρόβλεψη της μεσολαβούμενης από *mecA* αντίστασης στην οξακιλλίνη στους σταφυλόκοκκους. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται για την οξακιλλίνη και όχι για την κεφοξιτίνη. Τα αυτοματοποιημένα συστήματα έχουν επιτύχει ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση αντοχής του *S. aureus* στην οξακιλλίνη σε επίπεδο αποδεκτό για κλινική εργαστηριακή χρήση (Swenson et al., 2001). Ωστόσο, λόγω της ετερογενούς φύσης της αντοχής στην οξακιλλίνη, οι φαινοτυπικές μέθοδοι ενδέχεται να μην είναι απολύτως αξιόπιστες και τα κλινικά εργαστήρια εξετάζουν τη δοκιμή με εναλλακτικές μεθόδους για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Για την ταχύτερη ταυτοποίηση των MRSA στελεχών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται κυρίως στα νοσοκομεία αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου της αντιμικροβιακής αντοχής (π.χ. Vitek 2, Phoenix, Microscan, TDR, κτλ.) (Zhou et al., 2018). Ωστόσο, η μέθοδος τυποποίησης με βάση την αντιμικροβιακή ευαισθησία έχει μικρή διακριτική ικανότητα για την ανάλυση των νοσοκομειακών MRSA, επειδή τα περισσότερα στελέχη είναι πολυανθεκτικά και συνεπώς αυτή η μέθοδος δεν επιτρέπει τη διαφοροποίηση σχετιζόμενων και μη σχετιζόμενων στελεχών.

7.3 Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης των MRSA στελεχών

Οι μέθοδοι δοκιμής αντιμικροβιακής ευαισθησίας, όπως η διάχυση δίσκου, η μικροδιάλυση ζωμού και ο έλεγχος αντίστασης στην οξακιλλίνη απαιτούν επώαση 24 ωρών μετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια. Ωστόσο, η ταχεία και ακριβής αναγνώριση των MRSA είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη φροντίδα των ασθενών, αλλά και για την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων ελέγχου των λοιμώξεων για τον περιορισμό της εξάπλωσης του MRSA. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί αρκετές και γρήγορες εμπορικές δοκιμές για την ανίχνευση του MRSA απευθείας από ρινικά επιχρίσματα και καλλιέργειες αίματος για χρήση σε κλινικά εργαστήρια.

Επιπλέον, λόγω της χαμηλής διακριτικής ικανότητας των φαινοτυπικών τεχνικών, οι τεχνικές βασισμένες στο DNA ή γονοτυπικές ή μοριακές τεχνικές είναι πλέον η μέθοδος επιλογής για τη διερεύνηση των MRSA στελεχών και έχουν αντικαταστήσει πλήρως τις φαινοτυπικές μεθόδους (Mehndiratta & Bhalla, 2012). Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης του *S. aureus* και του MRSA βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού, το

οποίο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται η ύπαρξη γενετικού υλικού (DNA), εκκινητών (primers), νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης, η οποία αποτελεί το ένζυμο κλειδί, αφού καταλύει την αντίδραση, ενώνοντας ανεξάρτητα νουκλεοτίδια, ώστε να σχηματίσουν το προϊόν της αντίδρασης PCR, μέσω του εκθετικού πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA (Garibyan & Avashia, 2013).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται σε πολλαπλούς διαδοχικούς κύκλους. Το πρώτο στάδιο (αποδιάταξη- denaturation), περιλαμβάνει τον διαχωρισμό του δίκλωνου DNA σε δύο αλυσίδες, έπειτα από την εφαρμογή θερμότητας (94-95 °C για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό). Το δεύτερο στάδιο αφορά στην πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων των αλυσίδων DNA (annealing), έπειτα από μείωση της θερμοκρασίας (55-65 °C για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό). Κατά το τελευταίο στάδιο, η μικρή αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C επιτρέπει την προέκταση των προσδεσμένων εκκινητών και την προέκταση των νέων νουκλεοτιδικών αλυσίδων (extension). Για την εξασφάλιση των απαιτούμενων συνθηκών για τις αντιδράσεις των παραπάνω σταδίων επιβάλλεται η ταχεία και ακριβής εναλλαγή θερμοκρασιών, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια του θερμοκυκλοποιητή (thermocycler).

Αν και η πιο συνηθισμένη μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την επιδημιολογική διερεύνηση των MRSA ήταν η ηλεκτροφόρηση γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PGFE), τελευταία οι ερευνητές φαίνεται να προτιμούν τη χρήση της πρωτεϊνικής A (spa) τυποποίησης, την μέθοδο τυποποίησης πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multi-locus Sequence Typing, MLST), τη μέθοδο της ολικής αλληλούχησης του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) και SCCmec μεθόδους. Παρακάτω δίδεται μια σύντομη περιγραφή των περισσότερο χρησιμοποιούμενων τεχνικών και η χρησιμότητά τους για τη διάκριση των MRSA στελεχών.

7.3.1 Τυποποίηση με βάση το γονίδιο της πρωτεΐνης A (spa typing)

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας της πολυμορφικής περιοχής X ή της περιοχής επανάληψης βραχείας ακολουθίας (short sequence repeat - SSR) του γονιδίου της πρωτεΐνης A και χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της γονοτυπικής αλληλουχίας του *S. aureus* (Mathema et al., 2009). Η περιοχή X περιέχει μεταβλητό αριθμό (3-17) επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Variable-Number Tandem Repeats, VNTR) μήκους 24 ζευγών βάσεων (base pair, bp). Οι αλληλουχίες διαφοροποιούνται μεταξύ τους από απαλείψεις και εισδοχές ολόκληρων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και σπανιότερα από σημειακές μεταλλάξεις (Deurenberg et al., 2007). Λόγω του ότι αυτές οι περιοχές έχουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, η τυποποίηση spa είναι κατάλληλη για τη διερεύνηση τόσο των επιδημικών εξάρσεων σε περιορισμένο χώρο και χρόνο, όσο και για τη μελέτη της παγκόσμιας επιδημιολογίας και διασποράς των στελεχών του *S. aureus* και των MRSA (Koreen et al., 2004). Αυτή η μέθοδος τυποποίησης απαιτεί τη δυνατότητα εκτέλεσης PCR και πρόσβασης σε έναν αυτοματοποιημένο προσδιοριστή αλληλουχίας για την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Οι πληροφορίες που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση spa λαμβάνονται από έναν μόνο τόπο, σε αντίθεση με το MLST, το οποίο συνδυάζει πληροφορίες από επτά τόπους για την τυποποίηση του *S. aureus*. Η τυποποίηση spa έχει αξιολογηθεί ως πολύ καλή για την τυποποίηση των

αναγνωρισμένων *S. aureus* (Shopsin et al., 1999; Fey et al., 2003). Είναι γρήγορη, ευκολότερη στην εκτέλεση και ερμηνεία, σε σχέση με άλλες διαθέσιμες μοριακές τεχνικές, και είναι χαμηλού κόστους. Επιπλέον, αυτή η τεχνική φαίνεται να έχει εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα και οι ακολουθίες που προκύπτουν μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο πακέτο λογισμικού, καθιστώντας την τυποποίηση spa μια καλή επιλογή στον έλεγχο των λοιμώξεων (Stefani et al., 2012). Μια διεθνής βάση δεδομένων έχει δημιουργηθεί για την τυποποίηση της ονοματολογίας των τύπων spa (<http://spaserver.ridom.de>). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος μπορεί να αντικατοπτρίζει την ομοπλασία (Nubel et al., 2008), η διακριτική της δύναμη είναι κάτω από της PFGE (Basset et al., 2009), ενώ η ανάλυση των δεδομένων spa δεν είναι απλή.

7.3.2 Τυποποίηση βάσει ηλεκτροφόρησης γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PGFE)

Η PFGE θεωρείτο το χρυσό πρότυπο για την τυποποίηση του *S. aureus*, λόγω του ότι δείχνει την υψηλότερη διακριτική ικανότητα. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στον περιορισμό ολόκληρου του DNA με ένα ένζυμο (περιοριστική ενδονουκλεάση), που τέμνει το γενετικό υλικό σε συγκεκριμένες θέσεις, απομονώνοντας μεγάλα συνήθως θραύσματα (He et al., 2014). Το ένζυμο SmaI χρησιμοποιείται γενικά για τον *S. aureus*. Η πέψη με αυτό το ένζυμο δίνει μεταξύ 20 και 50 μεγάλων θραυσμάτων (μεταξύ 10 και 700 kb) που μπορούν να διαχωριστούν μόνο με ηλεκτροφόρηση γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Αν και αυτή η μέθοδος είναι αναπαραγώγιμη εντός εργαστηρίου, τα δεδομένα μπορεί να είναι διφορούμενα (Blanc et al., 2004), ενώ οι διεργαστηριακές μελέτες έχουν αναδείξει το πρόβλημα της τυποποίησης, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με αυστηρό έλεγχο όλων των παραμέτρων (Murchan et al., 2003).

7.3.3 Τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multi-locus Sequence Typing, MLST)

Η MLST είναι μια τυποποίηση που βασίζεται στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πολλών γονιδίων που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία (housekeeping genes) (Enright & Spratt, 1999). Η MLST έχει σχεδιαστεί για να αναλύει και να συγκρίνει γενετικές παραλλαγές σε παγκόσμιες συλλογές βακτηριακών παθογόνων. Δίνει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη νουκλεοτιδική απόκλιση του γονιδιώματος του πυρήνα, την κλωνική προέλευση μιας ομάδας στελεχών, τον ρυθμό ανασυνδυασμού και τη φυλογενετική σχέση μεταξύ των στελεχών. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δίνει σαφή δεδομένα που είναι αναπαραγώγιμα μεταξύ των εργαστηρίων. Οι περιορισμοί της είναι το κόστος και η σχετικά χαμηλή διακριτική της ικανότητα που εμποδίζουν τη χρήση της για εφαρμογή σε επίπεδο τοπικής επιδημιολογίας. Για τον *S. aureus*, έχει ανακτηθεί η ενίσχυση και η αλληλουχία 450e500 bp των επτά γονιδίων *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* και *yqiL* (Enright et al., 2000). Τα αλληλόμορφα γονίδια σε κάθε τόπο ταξινομούνται σύμφωνα με τις διαφορές στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Το αλληλόμορφο προφίλ των επτά τόπων καθορίζει τον τύπο αλληλουχίας (sequence type-ST). Μια διεθνής βάση δεδομένων που περιέχει περισσότερα από 3000 απομονωμένα στελέχη και 1600 ST είναι διαθέσιμη στη διεύθυνση <http://www.mlst.net>.

7.3.4 Ολική αλληλούχησης του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS)

Πρόσφατα, οι τεχνολογίες αλληλουχίας υψηλής απόδοσης ή ολόκληρου του γονιδιώματος παρέχουν μια σημαντικά βελτιωμένη δύναμη διάκρισης για τη μελέτη των πλήρων γονιδιωμάτων διαφόρων βακτηριακών παθογόνων. Οι τεχνικές WGS παράγουν πολλαπλές σύντομες αναγνώσεις βακτηριακών δειγμάτων που μπορούν να συναρμολογηθούν με βάση επικαλυπτόμενες περιοχές (de novo assembly) ή/και να χαρτογραφηθούν σε προηγουμένως δημοσιευμένα γονιδιώματα αναφοράς, τα οποία στη συνέχεια καθιστούν δυνατή τη σύγκριση βακτηριακών στελεχών που αποκλίνουν γενετικά σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Τα δεδομένα αυτά επιτρέπουν την αναγνώριση, σε οποιοδήποτε στέλεχος *S. aureus*, ενός μεγάλου αριθμού στοιχείων όπως είναι ο spa τύπος, ο MLST, τα γονίδια αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, τα γονίδια λοιμογονικότητας και διάφορα άλλα γενετικά στοιχεία. Τα στελέχη *S. aureus* από συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές τείνουν να συσσωρεύονται μαζί σε φυλογενετικά δέντρα και τα στοιχεία που προκύπτουν μπορούν να φανερώσουν την ακριβή προέλευση των εξεταζόμενων στελεχών. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων της WGS μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση των οδών μετάδοσης και διασποράς των στελεχών *S. aureus* και MRSA (Tong et al., 2015). Ο ακριβής προσδιορισμός και η ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών, καθώς και η παράλληλη αλληλούχηση διαφορετικών βακτηριακών στελεχών με χαμηλότερο κόστος και ταχύτερους χρόνους ανάκτησης, έχουν καταστήσει το WGS το πιο βολικό εργαλείο για κλινικές διαγνωστικές έρευνες, σε εξειδικευμένα εργαστήρια, σε πραγματικό χρόνο, καθώς και για την παρακολούθηση επιδημιών.

7.3.5 Τυποποίηση βάσει SCCmec

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση πολλαπλής PCR (multiplex PCR) για τον προσδιορισμό της δομής του συμπλέγματος *mec* και την παρουσία των διαφορετικών γονιδίων *ccr* (Milheirico et al., 2007). Ένα από τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η πολυπλοκότητα του συστήματος τυποποίησης με τους πολλούς αλγόριθμους τυποποίησης και υποτυποποίησης. Ωστόσο, η αλληλουχία του τόπου *ccrB* αποδείχθηκε χρήσιμη για τον προσδιορισμό των SCCmec τύπων I έως IV και VI (Oliveira et al., 2006). Η τυποποίηση SCCmec έχει κερδίσει έδαφος στην επιδημιολογική και εξελικτική ανάλυση των στελεχών CA-MRSA, επειδή αυτά σχετίζονται κυρίως με έναν συγκεκριμένο τύπο SCCmec. Ωστόσο, η περιοχή SCCmec είναι μεταβλητή και νέοι τύποι ορίζονται συνεχώς, αυξάνοντας την ανάγκη για συνεχή ενημέρωση των PCR στόχων.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση των βακτηρίων. Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), η οποία θεωρείται μέθοδος υψηλής διακριτικής ικανότητας, είναι ταχεία και ακριβής, και βασίζεται στην τυποποίηση των βακτηρίων με βάση την ανάλυση του διαφορετικού πρωτεϊνικού τους αποτυπώματός (πρωτεωμική τεχνική) (Böhme et al., 2016).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Από τη βιβλιογραφία διαφαίνεται ότι τα λύματα των σφαγείων αποτελούν πηγή βακτηρίων κλινικής σημασίας ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά, καθιστώντας τα σημαντικό μέσο διασποράς αυτών των μικροοργανισμών στο περιβάλλον (Wan & Chou, 2014; Savin et al., 2020). Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία υπό το πρίσμα της «Ενιαίας Υγείας», η οποία αναγνωρίζει ότι η υγεία του ανθρώπου συνδέεται άμεσα με την υγεία των ζώων, αλλά και με το περιβάλλον στο οποίο ζει ο άνθρωπος (CDC, 2018).

Ωστόσο, το γονίδιο *mecA* και οι MRSA δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί διεξοδικά σε σχέση με την παρουσία τους σε λύματα σε σφαγεία χοίρων. Στόχος της διπλωματικής μελέτης είναι η διερεύνηση της παρουσίας και των χαρακτηριστικών των MRSA στελεχών σε λύματα σφαγείων χοίρων της περιοχής της Θεσσαλίας, μέσω της εξέτασης του φαινοτύπου αυτών και της ποσοτικοποίησης του *mecA* γονιδίου ανθεκτικότητας με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των λυμάτων σφαγείου χοίρων της περιοχής της Θεσσαλίας για ένα μήνα. Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν τρεις φορές την εβδομάδα κατά τη σφαγή των χοίρων. Συλλέχθηκαν 12 δείγματα λυμάτων (των 500 ml) προ του βιολογικού καθαρισμού και 12 δείγματα λυμάτων (των 500 ml) μετά την επεξεργασία τους από τις εγκαταστάσεις του βιολογικού καθαρισμού του σφαγείου. Μετά τη λήψη τους, τα δείγματα εξετάστηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιούνταν το αργότερο εντός μίας (1) ώρας από το πέρας της δειγματοληψίας, ενώ η προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση ολοκληρωνόταν την ίδια ημέρα, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

2.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Δείγματα λυμάτων των 100 ml φυγοκεντρήθηκαν στα 8000 g για 30 min. Το ίζημα της φυγοκέντρησης ενοφθαλμίστηκε σε 10 ml Tryptone Soy Broth (TSB; LAB M), εμπλουτισμένου με 6,5% (w/v) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany). Στη συνέχεια ακολούθησε ενοφθαλμισμός στο εκλεκτικό υποστρώμα CHROMagar™ MRSA (Bioprep) και επώαση στους 37°C για 24 h. Οι ύποπτες MRSA αποικίες ενοφθαλμίστηκαν ξεχωριστά σε 5 ml brain heart infusion broth και στη συνέχεια έγινε έλεγχος δοκιμής της πηκτάσης με πλάσμα κόνικλου (Coagulase Plasma EDTA; Biolife).

Ένα kit ταχείας ανίχνευσης της από κοινού παρουσίας της συνδεδεμένης πηκτάσης και πρωτεΐνης A (Microgen Staph Rapid Test; Microgen Bioproducts, Surrey, UK) στο κυτταρικό τοίχωμα των προς εξέταση βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του *S. aureus*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην παρουσία σωματιδίων latex τα οποία επικαλύπτονται με ινωδογόνο και ανοσοσφαιρίνη G (IgG), που έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με την πηκτάση και την πρωτεΐνη A που απαντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus*, αντίστοιχα, προκαλώντας συγκολλητική αντίδραση, η οποία εκδηλώνεται ορατά με την εμφάνιση λευκών συσσωματωμάτων.

Τα δείγματα από τα οποία ανακτήθηκε μία τουλάχιστον αποικία με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του MRSA (μωβ αποικίες στο Chromagar MRSA), χαρακτηρίστηκαν δυνητικά θετικά. Ένα απομονωθέν στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα, αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20 °C, μέσα σε κρυοφιαλίδια, που περιείχαν θρεπτικό ζωμό TSB (LAB M) εμπλουτισμένο με κρυοπροστατευτικό παράγοντα (γλυκερόλη, 20,0% v/v), ώστε να είναι εφικτή η διενέργεια επιπρόσθετων δοκιμών.

2.3 Μέθοδος Ελέγχου Αντοχής στα Αντιβιοτικά

Όλα τα στελέχη (σύνολο 10) που αναγνωρίστηκαν με το Microgen Staph Rapid Test ως *S. aureus* διερευνήθηκαν ως προς την αντοχή τους σε έντεκα (11) αντιμικροβιακές ουσίες, που ανήκουν σε δέκα (10) αντιμικροβιακές κλάσεις. Ο έλεγχος της μικροβιακής

αντοχής πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων εμποτισμένων με αντιβιοτικά σε άγαρ (Kirby Bauer).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση τη χρήση τους στην ιατρική και κτηνιατρική πράξη. Αυτές ήταν: οξακιλλίνη (1 µg), κεφοξιτίνη (30 µg), βανκομυκίνη (30 µg), γλωραμφαινικόλη (30 µg), σιπροφλοξασίνη (5 µg), ερυθρομυκίνη (15µg), πενικιλίνη G (10 µg),– σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg), τετρακυκλίνη (30 µg), λινεζολίδα (30 µg) και κλινταμυκίνη (2 µg).

Συγκεκριμένα, από καθαρή 24ωρη καλλιέργεια MRSA στο υπόστρωμα Tryptone Soya Yeast Extract Agar (LABM) λαμβάνονταν 2-3 αποκίες, οι οποίες εναιωρούνταν σε 5 ml στείρου υδατικού διαλύματος 0,85% NaCl, με σκοπό τη δημιουργία βακτηριδιακού εναιωρήματος 0,5 της κλίμακας Mc Farland. Εντός 15 min από την παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος, γινόταν εμβάπτιση στείρου βαμβακοφόρου στειλεού στο μικροβιακό εναιώρημα και απομάκρυνση της περίσσειας ποσότητας με πίεση στα τοιχώματα. Ακολουθούσε επίστρωση σε Mueller -Hinton agar (LABM 39-UK). Στη συνέχεια, εντός 5-15 min από την επίστρωση του υλικού γινόταν η τοποθέτηση των αντιβιοτικών δισκίων με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 18-24 ώρες και ακολουθούσε η ανάγνωση των αποτελεσμάτων μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου, με βάση την οποία έγινε και ο χαρακτηρισμός του κάθε στελέχους ως: Ευαίσθητο (διάμετρος της ζώνης αναστολής ίση ή μεγαλύτερη από αυτή του πρότυπου στελέχους), Μετρίως Ευαίσθητο (διάμετρος ζώνης αναστολής μικρότερη κατά 2 mm τουλάχιστον σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος), και Ανθεκτικό (δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή) σύμφωνα με τους ερμηνευτικούς πίνακες που προτείνονται από το CLSI (2018). Στελέχη που παρουσίασαν ευαισθησία σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων θεωρήθηκαν πολυανθεκτικά (Multi Drug Resistant-MDR) (Schwarz et al., 2010).

2.4 Εξαγωγή ολικού DNA

Η εξαγωγή του ολικού DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το kit PURELINK GENOMIC DNA KIT (Life Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Για τον σκοπό αυτό, δείγματα λυμάτων των 100 ml φυγοκεντρώνταν στα 8000 g για 30 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν προσθήκη 180 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 mM EDTA, 1% Triton X-100) που περιείχε 20 mg/ml Lysozyme και το εναιώρημα επωάζονταν στους 37 °C για 30 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο. Ακολουθούσε η λύση των βακτηριακών κυττάρων με την προσθήκη 20 µl αποδιατακτικού διαλύματος Πρωτεΐνάσης K και 200 µl διαλύματος PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer και την περαιτέρω επώαση του εναιωρήματος για 30 λεπτά, στους 55 °C σε υδατόλουτρο. Η κατακρήμνιση του DNA και η λήψη ομοιογενούς εναιωρήματος επιτυγχάνονταν με τη χρήση 200 µl απόλυτης αιθανόλης (100%) και την ανάμειξη του εναιωρήματος στον κυκλομίκτη. Στη συνέχεια ακολουθούσε η δέσμευση και απομόνωση του βακτηριακού DNA, μέσω διαδοχικών σταδίων φυγοκέντρησης και τη χρήση των στηλών απομόνωσης και των διαλυμάτων πλύσης και έκλυσης, που περιέχονται στο σύστημα αντιδραστηρίων (kit).

2.5 Έλεγχος της παρουσίας του γονιδίου *mecA* στα δείγματα λυμάτων

Η ποσοτικοποίηση του *mecA* γονιδίου έγινε με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Wan & Chou, 2014. Δείγματα ολικού DNA αναλύθηκαν με τη χρήση του Kara-SYBR green και στην συσκευή Roche LightCycler 2.0. Τα στάδια των θερμικών κύκλων ήταν: 1. Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 10 min. 2. 40 κύκλοι στους 95°C για 20 sec (αποδιάταξη), 60°C για 60 sec (προσαρμογή) και 60°C για 60 sec (επιμήκυνση). 3. Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min. Το μήκος των εκκινητών για το *mecA* γονίδιο είναι μήκους 25 νουκλεοτιδίων με θερμοκρασία προσαρμογής τους 60°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης έγινε ανάλυση των παραγόμενων τμημάτων DNA με θερμική αποδιάταξη, με τήξη από 65°C μέχρι 95°C. Με βάση την παραγόμενη καμπύλη εξαγόταν το συμπέρασμα ότι η παρουσία μίας κορυφής στο αναμενόμενο σημείο τήξης σήμαινε την ύπαρξη ενός (επιθυμητού) προϊόντος DNA της PCR. Για την ενίσχυση του γονιδίου *mecA* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και οι συνθήκες, όπως περιγράφηκαν στην έρευνα των McClure et al. (2006), τα χαρακτηριστικά των οποίων αποτυπώνονται στους Πίνακες 2.1 και 2.2.

Πίνακας 2.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *mecA*

Γονίδιο	Εκκινητής	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5' - 3')	Προϊόν (bp)	Βιβλιογραφία
<i>mecA</i>	F	5-GTAGAAATGACTGAA CGTCCGATAA-3	310	McClure et al. 2006
	R	5-CCAATTCACATTGT TTCGGTCTAA-3		

F: Forward, R: Reverse

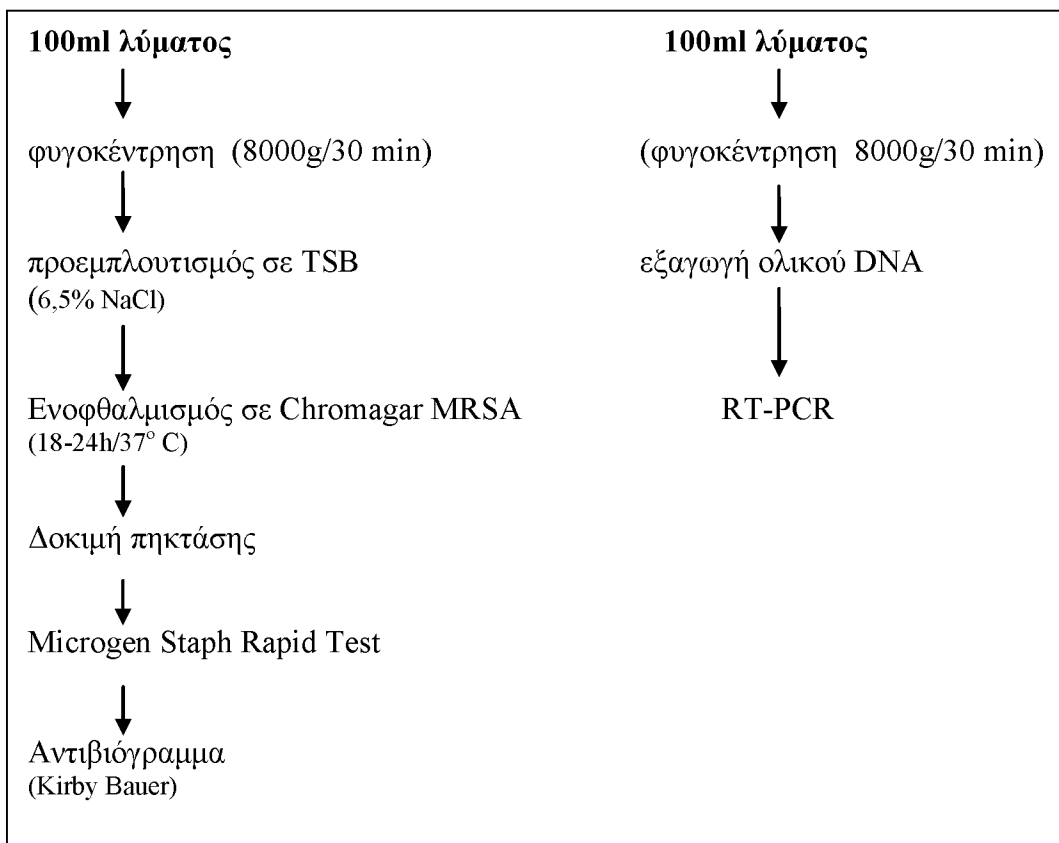
Πίνακας 2.2: Συνθήκες θερμοκυκλοποίησης που εφαρμόστηκαν κατά την ενίσχυση του γονιδίου *mecA*

Γονίδιο	Συνθήκες/ Στάδιο					
	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη (προσαρμογή)	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>mecA</i>	95 °C για 10 min	95 °C για 20 sec	60 °C για 1 min	72 °C για 1 min	40	72 °C για 5 min

2.6 Ποσοτικοποίηση του *mecA* γονιδίου στα δείγματα λυμάτων

Στη συνέχεια ακολούθησε αλληλούχηση για την επιβεβαίωση της αλληλουχίας του *mecA* γονιδίου. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% και οι προκύπτουσες μπάντες απομονώθηκαν, εκχυλίστηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση της πρωτοταγούς δομής των τμημάτων DNA των δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με το κατώφλι ανίχνευσης κύκλου (Ct) για κάθε δείγμα και σύγκριση με πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε με γνωστές ποσότητες DNA του γονιδίου *mecA*.

Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζονται συνοπτικά τα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής επεξεργασίας των δειγμάτων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Συνολικά εξετάστηκαν 24 δείγματα λυμάτων που ελήφθησαν από σφαγείο της περιοχής της Θεσσαλίας. Από τα παραπάνω δείγματα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δέκα (10) στελέχη MRSA, υποδεικνύοντας επιπολασμό της τάξης του (8/12) 66,67 % προ της επεξεργασίας τους και επιπολασμό της τάξης (2/12) 16,67 % μετά την επεξεργασία τους. Η αρχική απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών ως *S. aureus* βασίστηκε σε μεθόδους κλασικής μικροβιολογίας (Εικόνες 1,2,3). Σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανιχνεύτηκε το γονίδιο *mecA* και χαρακτηρίστηκαν ως MRSA, υποδηλώνοντας ποσοστό ανίχνευσης ίσο με 100% (Πίνακας 3.1), (Εικόνες 4,5).



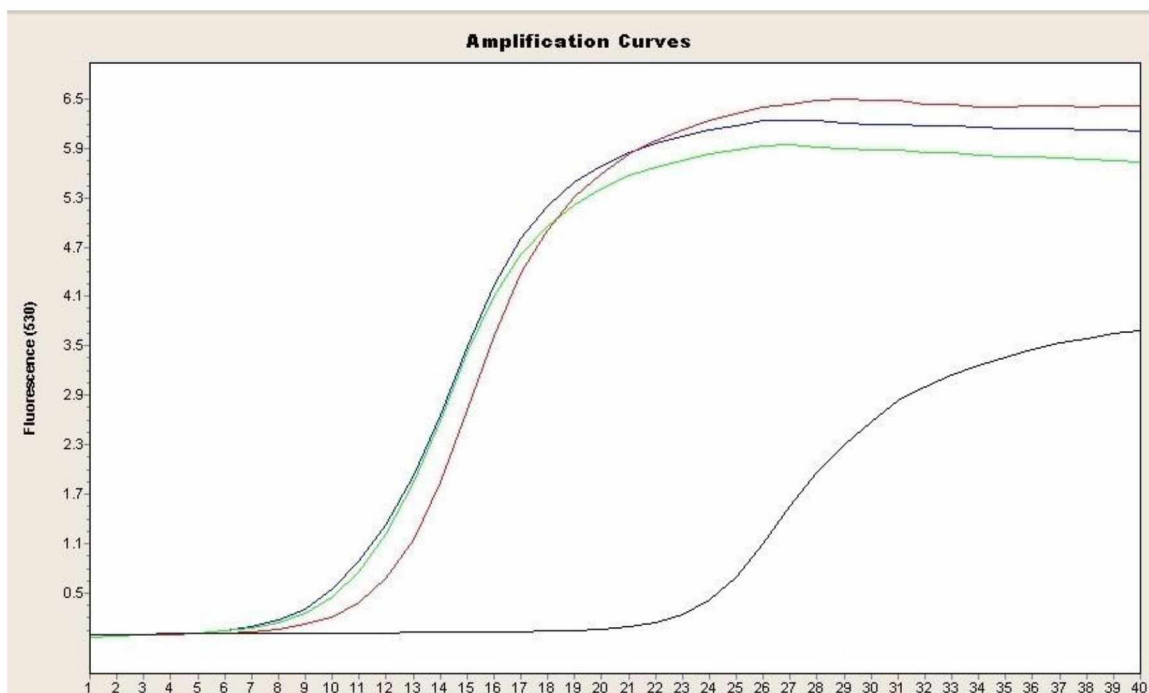
Εικόνα 1: Εμφάνιση λευκών συσσωμάτων (συγκολλητική αντίδραση), ενδεικτικό της ταυτοποίησης του *S. aureus* με το Microgen Staph Latex test



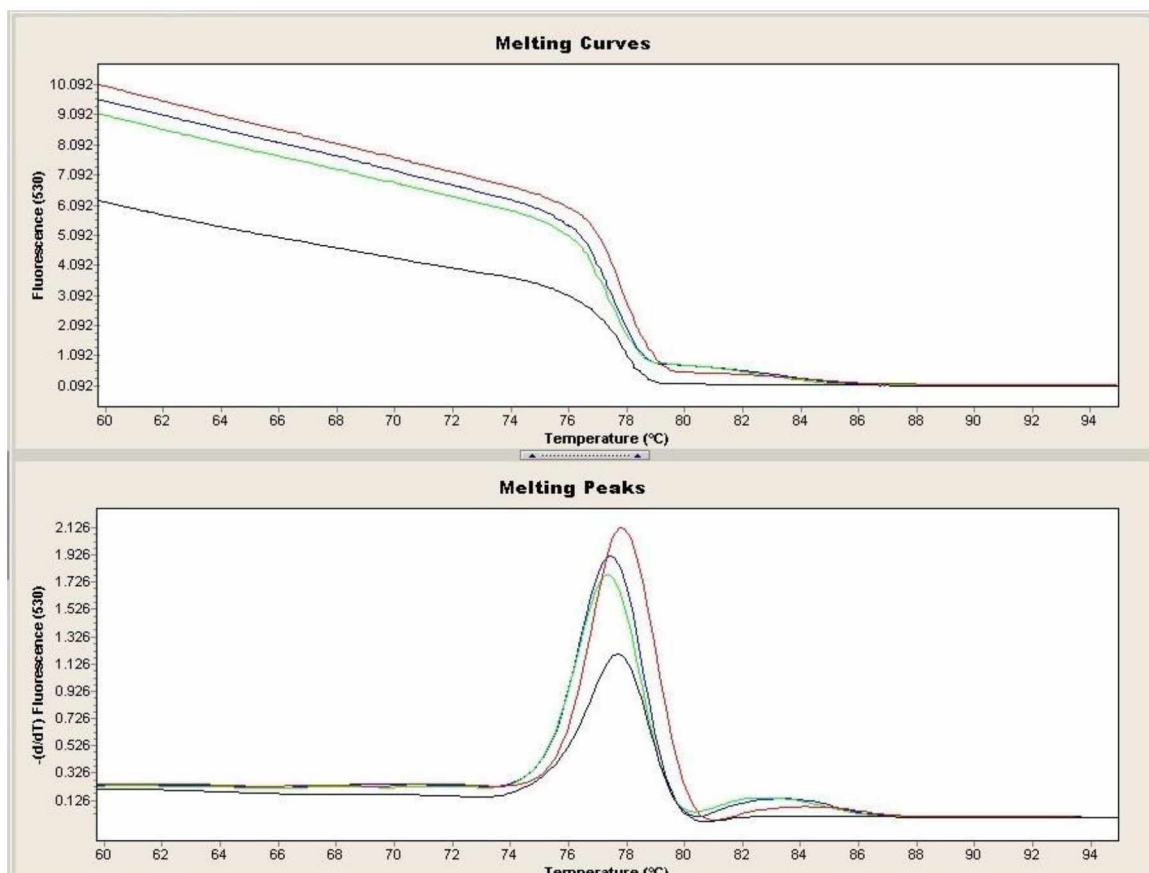
Εικόνα 2: Χαρακτηριστικές ροζ - μωβ αποικίες MRSA στο εκλεκτικό – διαφοροποιητικό υπόστρωμα Chromagar MRSA



Εικόνα 3: Δοκιμή της πηκτάσης σε απομονωθέν MRSA στέλεχος



Εικόνα 4: Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο, σε στελέχη MRSA.



Εικόνα 5: Καμπύλες αποδιάταξης στις οποίες εμφανίζονται κορυφές, που αντιστοιχούν στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος, των MRSA στελεχών.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θετικότητας σε MRSA σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.

Αριθμός θετικών δειγμάτων σε MRSA	Ποσοστό (%) θετικών δειγμάτων σε MRSA	Προέλευση δείγματος	Σύνολο
8	66,67% (9/12)	Προ επεξεργασίας	10/24 (41,67%)
2	16,67 % (2/12)	Μετά της επεξεργασίας	

3.2 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες

Τα δέκα (10) στελέχη που αναγνωρίστηκαν ως MRSA διερευνήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία τους σε 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Το σύνολο (10/10, 100,0%) των απομονωθέντων στελεχών ήταν πολυανθεκτικά, αφού εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι τουλάχιστον πέντε εκ των 11 αντιμικροβιακών ουσιών. Τα ευρήματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στις ουσίες: οξακιλλίνη (1 µg) (100%), κεφοξιτίνη (30 µg) (100%), πενικιλίνη G (10 µg) (100%), τετρακυκλίνη (30 µg) (100%), σιπροφλοξασίνη (5 µg) (60%), ερυθρομυκίνη (15µg) (60%) και κλινταμυκίνη (2 µg) (60%) και μικρότερα στα χλωραμφαινικόλη (30 µg) (40%) και σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg) (30%) (Πίνακες 3.2, 3.3), (Εικόνες 6,7).

Η λινεζολίδη, η βανκομυκίνη, η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη και η κλινταμυκίνη συγκαταλέγονται μεταξύ των αντιμικροβιακών ουσιών με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι του *S. aureus* (Liu et al., 2011). Τα εξετασθέντα στελέχη ήταν ευαίσθητα στις προαναφερθείσες αντιμικροβιακές ουσίες σε ποσοστό 100%, 100%, 70% και 40%, αντίστοιχα. Η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών MRSA στελεχών έναντι όλων των εξετασθέντων αντιβιοτικών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2. Η εξέταση της αντοχής των MRSA στελεχών έναντι των επιλεγθέντων αντιμικροβιακών παραγόντων αποκάλυψε την ύπαρξη εννέα (9) διακριτών προφίλ, που συνίσταντο από πέντε έως οκτώ αντιμικροβιακές ουσίες (Πίνακας 3.3).

Σε επίπεδο κλάσης αντιμικροβιακών παραγόντων, το 20% των πολυανθεκτικών MRSA στελεχών εμφάνισε αντοχή σε τέσσερις, έξι και επτά κλάσεις, εξίσου και το 40% εμφάνισε ανθεκτικότητα σε πέντε κλάσεις (Πίνακας 3.3). Τα απομονωθέντα MRSA στελέχη εμφανίστηκαν ανθεκτικά κατά 100%, έναντι των πενικιλινών, τετρακυκλινών και κεφαμυκινών, ενώ καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά αντοχής και έναντι των λινκοζαμινών (60%), των μακρολίδων (60%) και των κινολόνων (50%). Αντίθετα, οι κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών με καθόλου αντοχή ήταν τα γλυκοπεπτίδια οι οξαζολιδόνες με ποσοστό 0% (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 6: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες



Εικόνα 7: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες

Πίνακας 3.2: Συγκενρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες MRSA στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων

	OX	FOX	VA	C	CIP	E	P	SXT	TE	LZD	CC
Αριθμός ανθεκτικών στελεχών	10	10	0	3, 1I	4, 1I	4, 2I	10	3I	10	0	6
Ποσοστό ανθεκτικότητας σε σύνολο 10 στελεχών (%)	100	100	0	40	50	60	100	30	100	0	60

OX οξυακιλλίνη (1 µg), FOX κεφοξιδίνη (30 µg), VA βανκομυκίνη (30 µg), C χλωραμφαινικόλη (30 µg), CIP σιπροφλοξασίνη (5 µg), E ερυθρομυκίνη (15µg), P πενικιλίνη G (10 µg), SXT σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg), TE τετρακυκλίνη (30 µg), LZD λινεζολίδα (30 µg), CC κλινταμυκίνη (2 µg) - (I)= Intermediate (ενδιάμεσης ευαισθησίας)

Πίνακας 3.3: Προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής των απομονωθέντων MRSA στελεχών

Αριθμός αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά	Αριθμός στελεχών MRSA (%)	Προέλευση δείγματος λύματος	Αριθμός κλάσεων αντιβιοτικών (%)
0	(πολυευαίσθητο)	0 (0)		0
5	OX, FOX, P, TE, CC	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	4 (40)
	OX, FOX, P, TE, C	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	4 (40)
6	OX, FOX, E, P, TE, CC	1 (10)	Μετά της επεξεργασίας	5 (50)
	OX, FOX, CIP, E, P, TE	1 (10)	Μετά της επεξεργασίας	5 (50)
	OX, FOX, C, E, P, TE	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	5 (50)
	OX, FOX, C, CIP, P, TE	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	5 (50)
7	OX, FOX, E, P, SXT, TE, CC	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	6 (60)
	OX, FOX, CIP, E, P, TE, CC	1 (10)	Προ της επεξεργασίας	6 (60)
8	OX, FOX, C, CIP, P, SXT, TE, CC	2 (20)	Προ της επεξεργασίας	7 (70)

OX οξακιλλίνη (1 µg), FOX κεφοξίτινη (30 µg), VA βανκομυκίνη (30 µg), C χλωραμφαινικόλη (30 µg), CIP σιπροφλοξασίνη (5 µg), E ερυθρομυκίνη (15µg), P πενικιλίνη G (10 µg), SXT σουλφομεθοξάζολη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg), TE τετρακυκλίνη (30 µg), LZD λινεζολίδη (30 µg), CC κλινταμυκίνη (2 µg) - (I)= Intermediate (ενδιάμεσης ευαισθησίας)

3.3 Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με το γονίδιο *mecA*

Η ευθυγράμμιση αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα CLUSTALW. Οι ληφθείσες αλληλουχίες που απομονώθηκαν με PCR από το πολυανθεκτικό στέλεχος *S. aureus*, συγκρίθηκαν με το τμήμα 310 bp του γονιδίου *mecA* με κωδικό πρόσβασης GenBank: KX139525.1 της τράπεζας πληροφοριών του NCBI (NIH, ΗΠΑ). Η ομοιότητα του γονιδίου που απομονώθηκε (και είναι ευανάγνωστο από την αλληλούχιση) και του γονιδίου *mecA* (το KX139525.1) είναι 100% (Εικόνα 8).

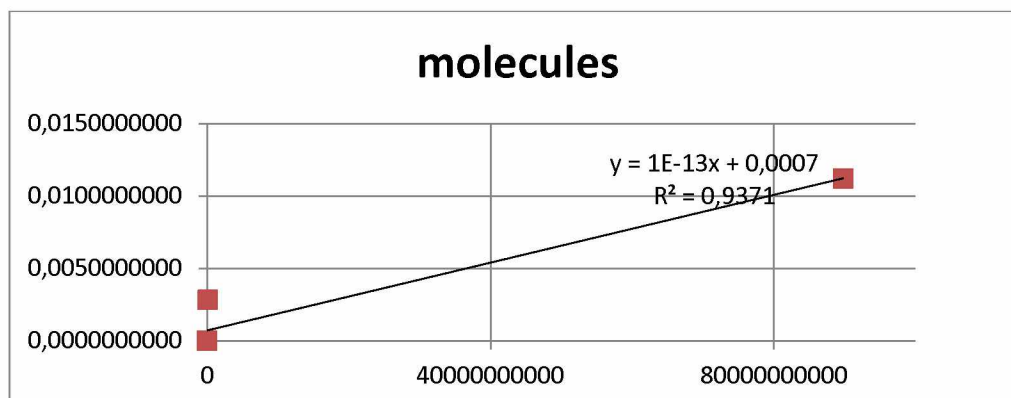


Εικόνα 8: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με το γονίδιο *mecA*

3.4 Ποσοτικοποίηση του *mecA* γονιδίου στα δείγματα λυμάτων

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς (standard curve), σύμφωνα με την οποία υπολογίστηκε η ποσότητα των αντιγράφων σε κάθε δείγμα μετά το τέλος της αντίδρασης. Το threshold (κατώφλιο ουδούς) ορίστηκε στην τιμή 26 Ct. Η αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης Real Time PCR (Εικόνα 10) απεικονίζεται στον Πίνακα 3.4.

Από τα 24 δείγματα λυμάτων που εξετάστηκαν με την RT-PCR, το γονίδιο *mecA*, ποσοτικοποιήθηκε σε εννέα (9) από τα δείγματα λυμάτων προ της επεξεργασίας τους (9/12, 75%), καθώς και σε 5 από τα 12 δείγματα λυμάτων (41,67%) μετά την επεξεργασία τους από τον βιολογικό καθαρισμό του σφαγείου (Πίνακες 3.4, 3.5).



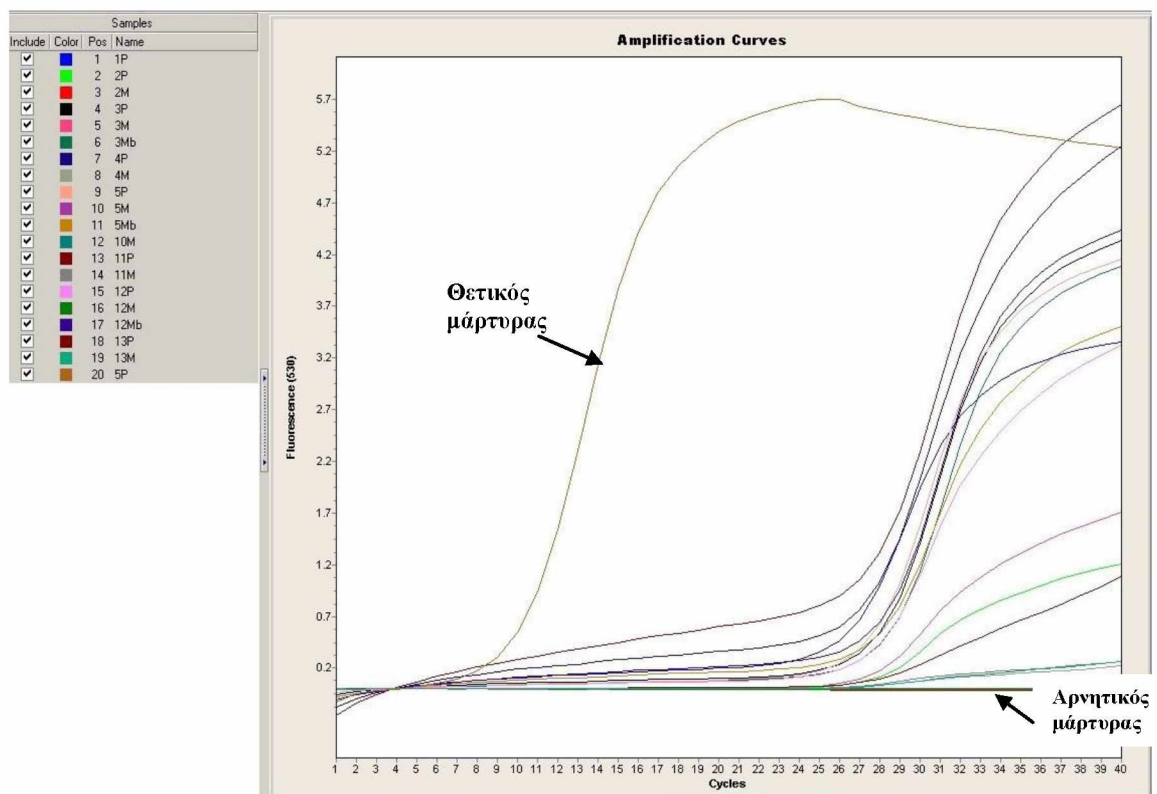
Εικόνα 9: Η καμπύλη αναφοράς με τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης.

Πίνακας 3.4: Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης Real Time PCR. Καταγραφή τιμών Ct για κάθε δείγμα και ποσότητας αντιγράφων.

A/A δείγματος	Προέλευση δείγματος λύματος	Αριθμός κύκλου (Ct)	Μόρια (molecules) /ml	Αποτέλεσμα
1	Προ επεξεργασίας	37,87	1991	Αρνητικό
2	Μετά την επεξεργασία	-	0	Αρνητικό
3	Προ επεξεργασίας	12,55	83376480515	Θετικό
4	Μετά την επεξεργασία	26,86	4104916	Αρνητικό
5	Προ επεξεργασίας	10,62	317710413926	Θετικό
6	Μετά την επεξεργασία	33,19	51025	Αρνητικό
7	Προ επεξεργασίας	10,8	280443934325	Θετικό
8	Μετά την επεξεργασία	11,38	187606833653	Θετικό
9	Προ επεξεργασίας	11,34	192881179654	Θετικό
10	Μετά την επεξεργασία	18,3	1549248498	Θετικό
11	Προ επεξεργασίας	10,62	317710413926	Θετικό
12	Μετά την επεξεργασία	32,3	94559	Αρνητικό
13	Προ επεξεργασίας	11,63	157757913896	Θετικό
14	Μετά την επεξεργασία	11,08	230971105158	Θετικό
15	Προ επεξεργασίας	10,9	261663443002	Θετικό
16	Μετά την επεξεργασία	33,42	43506	Αρνητικό
17	Προ επεξεργασίας	26	7450581	Θετικό
18	Μετά την επεξεργασία	25,3	12103504	Θετικό
19	Προ επεξεργασίας	29,3	756469	Αρνητικό
20	Μετά την επεξεργασία	25,7	9172741	Θετικό
21	Προ επεξεργασίας	27,73	2245992	Αρνητικό
22	Μετά την επεξεργασία	27,3	3025876	Αρνητικό
23	Προ επεξεργασίας	18,9	1022122824	Θετικό
24	Μετά την επεξεργασία	37,2	3167	Αρνητικό

Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του γονιδίου *mecA* σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.

Αριθμός θετικών δειγμάτων στο γονίδιο <i>mecA</i>	Ποσοστό (%) θετικών δειγμάτων στο γονίδιο <i>mecA</i>	Προέλευση δείγματος	Σύνολο
9	9/12 (75%)	Προ επεξεργασίας	14/24 (58,83%)
5	5/12 (41,67%)	Μετά της επεξεργασίας	



Εικόνα 10: Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο, σε δείγματα λυμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί, σε περιορισμένη κλίμακα, η κατανομή του MRSA και του γονιδίου *mecA* σε δύο διαφορετικές πηγές λυμάτων, προ και μετά της επεξεργασίας τους από τον βιολογικό καθαρισμό σφαγείου χοίρων και να εξεταστεί η δυνατότητα διασποράς τους. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε ο επιπολασμός και τα χαρακτηριστικά των MRSA στελεχών, προερχόμενων από προς σφαγή χοίρους, τα οποία καταλήγουν στο περιβάλλον.

Διαπιστώθηκαν τα εξής: Πρώτον, το γονίδιο *mecA* βρέθηκε ότι διανέμεται ευρέως στα λύματα σφαγείων χοίρων. Δεύτερον, υψηλά επίπεδα γονιδίου *mecA* βρέθηκαν να υπάρχουν στα λύματα τόσο πριν όσο και μετά του βιολογικού καθαρισμού. Τρίτον, τα απομονωθέντα MRSA στελέχη παρουσίασαν πολυανθεκτικότητα στις εξεταζόμενες αντιμικροβιακές ουσίες.

4.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Η εμφάνιση και η διασπορά του LA-MRSA (Livestock-Associated MRSA) από τα παραγωγικά ζώα αποτελεί πρόβλημα σε πολλές χώρες και εγείρει ανησυχία λόγω της πιθανής μετάδοσής του, τόσο από τα ζώα στους ανθρώπους που βρίσκονται σε επαφή με αυτά λόγω της εργασίας τους, όσο και αντίστροφα (Anjum et al., 2019). Η συχνότητα μάλιστα απομόνωσης του LA-MRSA από τους χοίρους σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες είναι αρκετά υψηλή, με επιπολασμό που κυμαίνεται από 0,1% έως 100,0% (EFSA & ECDC, 2021), κάτι που αδιαμφισβήτητα τους ανάγει ως σημαντική πηγή διασποράς του παθογόνου.

Παρόλα αυτά, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα για την παρουσία των MRSA σε λύματα σφαγείων χοίρων είναι αρκετά περιορισμένα (Wan & Chou, 2014). Είχε ήδη αναφερθεί ότι αστικά λύματα, τα οποία δεν έχουν υποστεί επεξεργασία φέρουν υψηλά επίπεδα MRSA (Levin-Edens et al., 2012). Ιδιαίτερα δε, τα λύματα σφαγείων βρέθηκε να παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις του γονιδίου *mecA* σε σχέση με τα αστικά απόβλητα (Wan & Chou, 2014), καταδεικνύοντας το σφαγείο ως πηγή διασποράς MRSA στο περιβάλλον. Στην παρούσα μελέτη δέκα (10) (41,67%) από τα συνολικά 24 δείγματα λυμάτων ήταν θετικά MRSA. Εξ' αυτών, τα οκτώ (8) (80%) αφορούσαν δείγματα προ της επεξεργασίας τους, ενώ τα 2 (20%), αντιστοιχούσαν σε λύματα προ της διάθεσής τους στο περιβάλλον. Άξιο επισημάνσης είναι το ότι η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών προέρχεται από μη επεξεργασμένα λύματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον κακό μικροβιακό ανταγωνισμό του *S. aureus* έναντι των ταχύτερα αναπτυσσόμενων βακτηρίων (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae), με τα οποία συνυπάρχει στα λύματα (ICMSF, 1996). Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς του μικροβιακού ανταγωνισμού, το ποσοστό απομόνωσης MRSA από τα λύματα ήταν υψηλό, κάτι, άλλωστε αναμενόμενο, δεδομένου του υψηλού επιπολασμού του MRSA που παρατηρείται στον ζωικό πληθυσμό των χοίρων (Guegga et al., 2020). Το γεγονός αυτό εγείρει ανησυχίες για τη διασπορά αυτού του παθογόνου στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στην κοινότητα. Πράγματι, μελέτες επιβεβαιώνουν τον κίνδυνο έκθεσης στον αερομεταφερόμενο *S. aureus* στο οικιστικό περιβάλλον (Madsen et al., 2018) και σε δημόσιους χώρους (Peng et al., 2015; Lin et al., 2016). Έτσι, η πανταχού παρούσα κατανομή του MRSA με ανθεκτικότητες σε πολύ σημαντικά αντιμικροβιακά κατά τη διαδικασία επεξεργασίας του νερού και των λυμάτων σφαγείων

είναι ανησυχητική, καθώς μπορεί να αποικίσουν τους εργαζόμενους στο σφαγείο και να επανεισαχθούν στην τροφική αλυσίδα μέσω της διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του σφάγιου. Επιπλέον, αυτά τα στελέχη απελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω των επιφανειακών υδάτων, λόγω της ανεπαρκούς επεξεργασίας των αποβλήτων. Αναμφίβολα, η εφαρμογή νέων μέτρων για τη μείωση της εισόδου ανθεκτικών βακτηρίων στα σφαγεία και της επακόλουθης μεταφοράς τους στα λύματα, καθώς και οι στρατηγικές για τη βελτίωση της κατάστασης των υδάτων απορρίψεων και των διαδικασιών επεξεργασίας αυτών, θα πρέπει να αξιολογούνται συνεχώς και να παρακολουθούνται στενά.

4.2 Αντιμικροβιακή αντοχή των MRSA στελεχών

Στην παρούσα μελέτη το σύνολο (100%) των απομονωθέντων MRSA στελεχών, εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι τουλάχιστον πέντε εκ των έντεκα αντιμικροβιακών παραγόντων (Πίνακας 3.3). Τα ευρύματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας κυρίως για τα «φτηνά» αντιβιοτικά, ενδεικτικό της πολιτικής των κτηνοτρόφων ως προς την επιλογή των αντιβιοτικών και των επιπτώσεων στη δημόσια υγεία, που μπορεί να έχει αυτό. Έτσι, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στα οξακιλλίνη (1 μg) (100,0%), κεφοξιτίνη (30 μg), τετρακυκλίνη (30 μg) (100,0%), κλινταμυκίνη (2 μg) (60%), ερυθρομυκίνη (15μg) (60%), σιπροφλοξασίνη (5 μg) (50%), χλωραμφαινικόλη (30 μg) (40%) και την σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 μg) (30%), που θεωρούνται «Κρίσιμης και Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Critically and Highly Important Antimicrobials for Human Health) (WHO, 2011) (Πίνακας 3.2). Τα αποτελέσματα αφενός δεν αποτελούν έκπληξη, δεδομένου της ευρείας κυκλοφορίας σκευασμάτων με τις περισσότερες εκ των ανωτέρω δραστικές ουσίες, της ευκολίας χορήγησης (per os), του μικρού κόστους και της ευκολίας διάθεσής τους, αφετέρου δε συμβαδίζουν με άλλες έρευνες σε Ελλάδα και Ευρώπη, οι οποίες ανασκοπούνται από τον Κομοδρόμο 2021, όπου υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε MRSA στελέχη από χοίρους παρατηρήθηκαν για τέσσερις έως επτά κλάσεις αντιμικροβιακών, επιβεβαιώνοντας την εκτεταμένη χρήση τους στη χοιροτροφία (Burch, 2005), όχι μόνο για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά για προληπτικούς λόγους, καθώς και ως αυξητικούς παράγοντες. Αυτές οι πρακτικές και κυρίως η αυξημένη χρήση πενικιλινών και τετρακυκλινών, έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο φορέας MRSA στελεχών, τουλάχιστον στους χοίρους, καθιστώντας τον τελικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου επιμόλυνσης του χοιρινού κρέατος και του περιβάλλοντος των σφαγείων (Dierikx et al., 2016).

Η αντοχή στη χλωραμφαινικόλη ήταν ακόμη μία ανησυχητική παρατήρηση, επειδή έχει απαγορευτεί η χορήγησή της στα παραγωγικά ζώα στην ΕΕ από το 1994 (EMEA, 1994). Η πιθανότερη αιτία γι' αυτό, είναι η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων που κωδικοποιούν παρόμοιες κατηγορίες αντιμικροβιακών. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών αλλάζει τα γονίδια ανθεκτικότητας και αυτές οι αλλαγές μπορούν να παραμείνουν για δεκαετίες (Sommer & Dantas, 2011). Έτσι, τα γονίδια που παρέχουν αντίσταση στη χλωραμφαινικόλη θα μπορούσαν να παραμείνουν στη μικροβιακή χλωρίδα των ζώων για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την κατάργησή της (Johnsen et al., 2011) και, ίσως, αυτό είναι αυτό που παρατηρήθηκε εδώ. Επίσης, η ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες, που είναι κρίσιμης σημασίας

αντιμικροβιακή ομάδα για την ανθρώπινη ιατρική, δείχθηκε εξίσου ανησυχητική, αφού ως συνέπεια της αντιβιοαντοχής των MRSA περιορίζεται το εύρος θεραπείας των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων του ανθρώπου, δηλώνοντας την ανάδυση στελεχών τα οποία δε θα αντιμετωπίζονται κλινικά και επομένως θα έχουν σοβαρές κλινικές επιπτώσεις.

4.3 Ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* σε λύματα

Πέραν της εξαιρετικά υψηλής απομόνωσης MRSA στελεχών στα λύματα σφαγείων, η υψηλή θετικότητα παρουσίας του *mecA* γονιδίου ανθεκτικότητας τόσο στα λύματα προ της επεξεργασίας τους (75% θετικότητα), όσο και σε εκείνα που είχαν επεξεργαστεί σε βιολογικό καθαρισμό (41,67% θετικότητα), αποτελεί μείζον θέμα συζήτησης. Σε ανάλογη μελέτη δείχθηκε, ότι ο MRSA μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον από τα λύματα σφαγείων, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία, καθώς βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του γονιδίου *mecA* στα λύματα των σφαγείων χοίρων, υποδεικνύοντας ότι τα λύματα του σφαγείου εξασφαλίζουν την ανάπτυξη του γονιδίου *mecA*, ενεργώντας ως πιθανό μέσο για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και συμβάλλοντας, έτσι, στην εξάπλωση επιβλαβών γενετικών προσδιοριστικών σε φυσικά περιβάλλοντα (Wan & Chou, 2014). Το γεγονός ότι πολλά γονίδια αντιβιοανθεκτικότητας που ανιχνεύονται στον *S. aureus* βρίσκονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια, υποστηρίζει την εξάπλωση αυτών των γονιδίων αντίστασης σε στελέχη, είδη, ακόμη και σε συγγενικά γένη του *Staphylococcus*. Από αυτή την άποψη, ο *S. aureus* μπορεί να ενεργήσει ως δότης και αποδέκτης γονιδίων αντίστασης, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διάδοση των γονιδίων αντίστασης εντός της θετικής κατά Gram δεξαμενής γονιδιακής ανθεκτικότητας. Συνεπώς, είναι υπαρκτή η δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας στα λύματα μέσω του *S. aureus*. Παρόλο που, η παρουσία του MRSA μετά την επεξεργασία φαίνεται να είναι χαμηλότερη σε σχέση με τα ακατέργαστα λύματα, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η συνεχής απόρριψη λυμάτων από τα σφαγεία χοίρων μπορεί να αποτελέσει την αιτία απελευθέρωσης του γονιδίου *mecA* σε φυσικά υδατικά περιβάλλοντα, μετατρέποντας τον περιβαλλοντικό *S. aureus* σε MRSA μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (HGT). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι τα λύματα σφαγείων χοίρων μπορεί να λειτουργήσουν ως πιθανή δεξαμενή του *S. aureus*, φιλοξενώντας γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Αν λάβουμε δε υπ' όψη ότι στελέχη MRSA επιβιώνουν σε υδάτινα συστήματα για τουλάχιστον 14 ημέρες (Tolba et al., 2008), η παρουσία τους στα λύματα σφαγείων δύναται να αποτελέσει απειλή για την υγεία των εργαζομένων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και κατ'επέκταση στην κοινότητα. Έτσι, είναι κρίσιμα σημεία η διαδικασία εξυγίανσης των λυμάτων με στόχο τη μείωση της εκροής βακτηρίων, η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας, που βασίζεται στην παρακολούθηση των συμβατικών παραμέτρων ποιότητας του νερού, καθώς και οι παρεμβάσεις κατά της περαιτέρω μετάδοσης και διάδοσης αυτών των παραγόντων κινδύνου.

Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απεικονίζουν τα λύματα των σφαγείων χοίρου ως δεξαμενή ανθεκτικών μικροοργανισμών που μπορούν να διασπαρούν όχι μόνο μεταξύ του ζωικού κεφαλαίου, αλλά στο ευρύτερο περιβάλλον και τελικά στην κοινότητα, καθιστώντας την προσέγγιση της «Ενιαίας Υγείας» στο πρόβλημα επιτακτική περισσότερο από κάθε άλλη φορά.

5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Αν και το πρόβλημα της δημόσιας υγείας που σχετίζεται με τα παθογόνα βακτήρια του είδους *Staphylococcus aureus* δεν είναι νέο (Duckworth & Jordens, 1990), ωστόσο, χρόνο με το χρόνο, όλο και περισσότεροι επιστημονικοί συναγερμοί και αναφορές σχετικά με τον αυξανόμενο επιδημιολογικό κίνδυνο έρχονται από όλες τις ηπείρους (Agostino et al., 2017; Chang & Lin, 2018), αναφερόμενοι στην απόκτηση γονιδίων αντιβιοαντοχής στην ομάδα των β-λακταμών και κυρίως του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) (Becker et al., 2014b; Arias & Murray, 2015). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα αναφέρεται επίσης και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών, όπως σε τετρακυκλίνες, μακρολίδια, τριμεθοπρίμη ή αμινογλυκοσίδες, που χρησιμοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στην ανθρώπινη και κτηνιατρική ιατρική, όπου παρατηρούνται φαινόμενα ανθεκτικότητας σε απομονωθέντα στελέχη *S. aureus* τόσο ανθρώπινης όσο και ζωικής προέλευσης (Paterson et al., 2014).

Αρχικά, ο MRSA αποτελούσε την κύρια αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, ένα πρόβλημα που δεν εξαφανίστηκε, αλλά ξεπέρασε τα όρια του νοσοκομειακού περιβάλλοντος (HA-MRSA) και πέρασε στον γενικό πληθυσμό (CA-MRSA) και στο ζωικό κεφάλαιο (LA-MRSA). Οι επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης του *S. aureus*, τόσο των ευαίσθητων όσο και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών, είναι η μεταφορά από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω υγιών κτηνοτρόφων (φορείς των βακτηρίων) στα μέλη της οικογένειάς τους (Nadimpalli et al., 2018). Αυτά τα βακτήρια είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην περίπτωση των ανθρώπων που εκτίθενται σε περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των κτηνοτροφικών μονάδων και των αστικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, όπου υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης παθογόνων και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών (Friese et al., 2013; Boorpathy, 2017).

Οι άμεσες πηγές βακτηρίων MRSA που υπάρχουν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι τα απόβλητα που προέρχονται από τα νοσοκομεία και από τις κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις (Wan & Chou, 2014). Μελέτες επιβεβαίωσαν τον κίνδυνο έκθεσης στον αερομεταφερόμενο *S. aureus* στο οικιστικό περιβάλλον (Madsen et al., 2018) και σε δημόσιους χώρους (Peng et al., 2015; Lin et al., 2016). Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ο MRSA μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον από τα λύματα σφαγείων, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία, καθώς βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του γονιδίου *mecA* στα λύματα των σφαγείων χοίρων (Wan & Chou, 2014). Ανάλογα αποτελέσματα σημειώθηκαν και στην παρούσα εργασία, υποδεικνύοντας ότι τα λύματα του σφαγείου εξασφαλίζουν την ανάπτυξη του γονιδίου *mecA*, ενεργώντας ως πιθανό μέσο για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και συμβάλλοντας, έτσι, στην εξάπλωση επιβλαβών γενετικών προσδιοριστικών σε φυσικά περιβάλλοντα.

Η μεσολαβούμενη *mecA* αντίσταση στη μεθικιλίνη, που παρέχει ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες ευρέως φάσματος, εξαπλώνεται παγκοσμίως στους σταφυλόκοκκους, συμπεριλαμβανομένων αυτών των νοσοκομείων, κτηνοτροφικών εκτροφών και κοινοτικών περιβαλλόντων, καθιστώντας αναποτελεσματική την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία αντιβιοτικών για τη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Η πίεση επιλογής, όπως επιβάλλεται από τη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο από αυτή την άποψη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά πλασμίδια ανθεκτικότητας του *S. aureus* διαθέτουν περισσότερα από ένα γονίδια ανθεκτικότητας, γεγονός που ευνοεί την επιλογή και την επιμονή αυτών

των γονιδίων ακόμη και απουσία άμεσης πίεσης επιλογής. Επειδή η πίεση επιλογής είναι μια σημαντική κινητήρια δύναμη στην ανάπτυξη και εξάπλωση των ιδιοτήτων της ανθεκτικότητας, πρωταρχικά θα πρέπει να δοθεί έμφαση στη μείωση της αντιμικροβιακής χρήσης στην ανθρώπινη και την κτηνιατρική ιατρική στο απαραίτητο ελάχιστο και να ληφθούν προσεκτικά υπόψη εναλλακτικές προσεγγίσεις για την πρόληψη και τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων. Σε αυτήν την προσπάθεια, οι μοριακές τεχνικές έχουν τον κύριο ρόλο στην αξιολόγηση των πιθανών κρουσμάτων, στην κατανόηση της εμφάνισης και της εξέλιξης των MRSA στελεχών και στα προγράμματα επιτήρησης αυτών στον άνθρωπο, το ζωικό κεφάλαιο και το περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ

Abramson MA, Sexton DJ. “Nosocomial methicillin-resistant and methicillinsusceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs?” **Infect Control Hosp Epidemiol.** 1999; 20:408–411

Agostino JW, Ferguson JK, Eastwood K, Kirk MD. “The increasing importance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections”. **Med J Aust** 2017; (9):388–393.

Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. “Analysis of Virulence Genes Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains”. **Jundishapur J. Microbiol.** 2014; 7 (6), e10741.

Akpaka PE, Monecke S, Swanston WH, Rao A, Schulz R, Levett PN. “Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin toxin in Trinidad & Tobago: a case report”. **J Med Case Rep.** 2011; 5:157.

Anjum MF, Marco-Jimenez F, Duncan D, Marín C, Smith RP, Evans SJ. “Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK”. **Front Microbiol.** 2019;10: 2136.

Antonanzas F, Lozano C, Torres C. “Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. **Pharmacoeconomics.** 2015; 33(4):285–325.

Arias CA, Murray BE. “A new antibiotic and the evolution of resistance”. **N Engl J Med.** 2015; 372(12):1168–1170.

Azhar A, Rasool S, Haque A, Shan S, Saeed M, Ehsan B, Haque A. “Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*”. **J. Med. Microbiol.** 2017; 66 (9), 1328–1331.

Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. “Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. **Infect Genet Evol.** 2018; 61: 74–76.

Bangerter PD, Sidler X, Perreten V, Overesch G. “Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms.” **Vet. Microbiol.** 2016; 183, 125–134.

Bannerman TL. “*Staphylococcus, Micrococcus and the other catalase-positive cocci that grow aerobically*”. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. **Manual of clinical microbiology.** 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003.

Barber M. “Methicillin-resistant staphylococci”. **J Clin Pathol.** 1961; 14:385–393.

Bartel MD, Boye K, Rhod LA. “Rapid increase of genetically diverse methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark”. **Emerg Infect Dis.** 2007; 13:1533–1540.

- Basset P, Hammer NB, Kuhn G, Vogel V, Sakwinska O, Blanc DS.** “*Staphylococcus aureus* *clfB* and *spa* alleles of the repeat regions are segregated into major phylogenetic lineages”. **Infect Genet Evol.** 2009; 9:941-7.
- Becker K, Heilmann C, Peters G.** “Coagulase-negative staphylococci.” **Clin. Microbiol. Rev.** 2014a; 27, 870-926.
- Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A.** “Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages”. **Int J Med Microbiol.** 2014b; 304(7):794–804.
- Becker K, Ballhausen B, Kahl BC, Kock R.** “The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans”. **Vet.Microbiol.** 2017; 200, 33–38.
- Bennett RW.** “*Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology*”. **J Food Prot.** 2005; 68: 1264–1270.
- Beyrouthy R, Hamze M, Hleis S, Mallat H, Dabboussi F.** “*Panton-Valentine leukocidin producing Staphylococcus aureus nasal carriage, in North-Lebanon*”. **Med. Mal. Infect.** 2013; 43, 386–390.
- Blanc DS.** “*The use of molecular typing for the epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections*”. **Infect Genet Evol;** 2004; 4:193-7.
- Böhme K, Antelo SC, Fernández-No IC, Quintela-Baluja M, Barros-Velázquez J, Cañas B, Calo-Mata P.** “*Detection of foodborne pathogens using MALDI-TOF Mass Spectrometry*”. In: **Antimicrobial Food Packaging.** Elsevier, 2016; pp 203–214.
- Boopathy R.** “*Presence of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in sewage treatment plant*”. **Bioresour Technol.** 2017; 240: 144–148.
- Borjesson S, Dienus O, Jarnheimer PA, Olsen B, Matussek A, Lindgren PE.** “*Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, β -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR*”. **Int J Environ Health Res.** 2009a; 19, 219–230.
- Borjesson S, Melin S, Matussek A, Lindgren PE.** “*A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant.*” **Water Res.** 2009b; 43, 925–932.
- Börjesson S, Matussek A, Melin S, Löfgren S, Lindgren PE.** “*Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat?*” **J. Appl. Microbiol.** 2010; 108, 1244–1251.
- Boss R, Cosandey A, Luini M, Artursson K, Bardiau M, Breitenwieser F, Hehenberger E, Lam T, Mansfeld M, Michel A, Mösslacher G, Naskova J, Nelson S, Podpečan O, Raemy A, Ryan E, Salat O, Zangerl P, Steiner A, et al.** “*Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer*”. **J Dairy Sci.** 2016; 99: 515–528.

Burch D. 2005. “*Problems of antibiotic resistance in pigs in the UK*”. In **Practice** 27, 37–43.

Capitano B, Leshem OA, Nightingale CH, Nicolau DP. “*Cost effect of managing methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a long- term care facility*”. **J Am Geriatr Soc.** 2003; 51:10–16.

Casey A, Lambert PA, Elliott T. “*Staphylococci*”. **Int J Antimicrob Agents.** 2007; 29:S23–S32.

Castanon JI. “*History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds*”. **Poult. Sci.** 2007; 86, 2466–2471.

Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM. “*Zinc resistance of Staphylococcus aureus of animal origin is strongly associated with methicillin resistance.*” **Vet. Microbiol.** 2010; 150 (3e4), 344-348.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>. Προσπέλαση την 28/01/2022.

Cha JM, Yang S, Carlson KH. “*Trace determination of beta-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry*”. **J. Chromatogr. A.** 2006; 1115 (1–2), 46–57.

Chambers HF, Hackbarth CJ. “*Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in Staphylococcus aureus*”. **Antimicrob Agents Chemother.** 1987; 31:1982–1988

Chambers HF. “*Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*”. **Clin Microbiol.** 1997; Rev 10:781–791.

Chang CW, Lin MH. “*Optimization of PMA-qPCR for Staphylococcus aureus and determination of viable bacteria in indoor air*”. **Indoor Air.** 2018; 28(1):64–72.

Chen H, Zhang M. “*Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China*”. **Environ. Int.** 2013; 55, 9-14.

Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. “*Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity*”. **PLoS Pathog.** 2010; 6: e1001036.

Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. “*Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress*”. **Infect Immun.** 2006; 74(8):4950-3. doi: 10.1128/IAI.00204-06. PMID: 16861688; PMCID: PMC1539600.

CLSI. “*Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*”; Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012.

CLSI. “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*”. 27th Ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.2017.

CLSI. “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*”. 28th Ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.2018.

Colomer-Lluch M, Calero-Caceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre J. “*Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population*”. **Environ. Int.** 2014; 73, 167-175.

Conlon B. “*Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease*”. **Bioessays.** 2014; 36(10):991–996.

Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS et al. “*The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges*”. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2005; 26:166–174

Crisostomo MI, Westh H, Tomasz A et al. “*The evolution of methicillin resistance in Staphylococcus aureus : similarity of genetic backgrounds in historically early methicillinsusceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones*”. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2001; 98:9865–9870.

Cuny C, Wieler LH, Witte W. “*Livestock-Associated MRSA: the Impact on Humans*”. **Antibiotics.** 2015; 4, 521–543.

Denayer S, Delbrassinne L, Nia Y, Botteldoorn N. “*Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of Staphylococcus aureus strains and importance of toxin detection*”. **Toxins (Basel).** 2017; 9(12):407.

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

Deurenberg RH, Stobberingh EE. “*The evolution of Staphylococcus aureus.*” **Infect. Genet. Evol.** 2008; 8, 747-763.

Diallo AA, Brugère H, Kérouédan M, Dupouy V, Toutain P-L, Bousquet- Mélou A, Oswald E, Bibbal D. “*Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater*”. **Water Res.** 2013; 47:4719–4729.

Dierikx CM, Hengeveld PD, Veldman KT, de Haan A, van der Voorde S, Dop PY, Bosch T, van Duijkeren E. “*Ten years later: Still a high prevalence of MRSA in slaughter pigs despite a significant reduction in antimicrobial usage in pigs the Netherlands*”. **J Antimicrob Chemother** 2016;71: 2414–2418.

Duckworth GJ, Jordens JZ. “*Adherence and survival properties of an epidemic methicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus compared with those of methicillin-sensitive strains*”. **J Med Microbiol.** 1990; 32(3):195–200.

Enright MC, Spratt BG. “*Multilocus sequence typing*”. **Trends Microbiol.** 1999; 7:482-7.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. “*Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*”. **J Clin Microbiol.** 2000; 38:1008-15.

Entenza JM, Hohl P, Heinze-Krauss I, Glauser MP, Moreillon P. “*BAL9141, a novel extended-spectrum cephalosporin active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in treatment of experimental endocarditis*”. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2002; 46, 171–177.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf.

European Committee for Veterinary Medicinal Products. 1994. “*Chloramphenicol summary report. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA)*”. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdg>. Προσπέλαση την 28/01/2022.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention, and Control. “*EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013*”. **EFSA J.** 2015; 13:4036.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention, and Control. “*EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015*”. **EFSA J.** 2017; 15:4694.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention, and Control. “*The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019*”. **EFSA J.** 2021; 19(4): 6490.

Euzeby J. “*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*”: LPSN. 2022. Available from: <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html>. Προσπέλαση την 28/01/2022.

Fasola EL, Peterson LR. “*Laboratory detection and evaluation of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus nosocomial infections*”. In: **Advances in pathology and laboratory medicine**, vol 5. Mosby-Year Book, Inc., Chicago, IL. 1992; pp 285–306.

Farzana K, Noreen S, Nasir B, Axhar S, Mumtaz A, Sethi A, Asad MHB, Khan BA et al. “*Comparative analysis of minimum inhibitory concentration of various brands of cephalosporin against clinical isolated of Staphylococcus aureus*”. **Sci Res Essays.** 2011; 6, 6428–6434.

Fernandes R. *Microbiology Handbook: Meat*, 3rd Edition. Royal Society of Chemistry. 2009.

Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. “*Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*”. **J. Antimicrob. Chemother.** 2010; 65 (4), 619–625.

Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME et al. “Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.” **Antimicrob Agents Chemother.** 2003; 47:196–203

Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. “Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2001; 98:8821–8826.

Fluit AC. “Livestock-associated *Staphylococcus aureus*”. **Clin. Microbiol. Infect.** 2012; 18, 735–744.

Foster TJ. “Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects”. **FEMS Microbiol. Rev.** 2017; 41 (3), 430–449.

Friese A, Schulz J, Zimmermann K, Tenhagen B et al. “Occurrence of livestock – associated methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air soil surfaces in their vicinity”. **Appl Environ Microbiol.** 2013; 79(8):2759–2766.

Furuno JP, Hebden JN, Standiford HC, Perencevich EN, Miller RR, Moore AC, et al. “Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* in a long-term acute care facility”. **Am J Infect Control.** 2008; 36:468–471.

García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RLR, Larsen AR, Skov RL, et al. “Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study”. **Lancet Infect Dis.** 2011; 11: 595–603.

Garibyan L, Avashia N. “Polymerase Chain Reaction”. **J Invest Dermatol.** 2013; 133: 1–4.

Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilionis A. “Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria”. **Medicina (Kaunas).** 2011; 47:137–146.

Goerge T, Lorenz MB, van Alen S, Hubner NO, Becker K, Kock R. “MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: prevalence, preventive options and evidence”. **Vet. Microbiol.** 2017; 200, 6–12.

Gómez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M, Torres C. “Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398”. **Environ Pollut.** 2016; 212:71-76.

Gordon RJ, Lowy FD. “Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection”. **Clin Infect Dis.** 2008; 46(5):350–359.

Greenen PL, Koene MGJ, Blaak H, Havelaar AH, van de Giessen AW. “Risk Profile on Antimicrobial Resistance Transmissible from Food Animals to Humans”. **National**

Institute for Public Health and the Environment. 2010; pp. 1e118. RIVM-rapport 330334001.

Grontvedt CA, Elstrom P, Stegger M, Skov RL, Skytt Andersen P, Larssen KW, Urdahl AM, Angen O, Larsen J, Åmdal S, Lotvedt SM, Sunde M, Bjornholt JV. “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in humans and pigs in Norway: a “One Health” perspective on introduction and transmission”. **Clin. Infect. Dis.** 2016; 63 (11), 1431–1438.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. “Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat”. **Lancet.** 2006; 368 (9538), 874–885.

Guerra B, Stoicescu A-V, Mulligan K, Nagy K, Cioacata G, Noerstrud K. “The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018”. **EFSA J.** 2020; 18: 6007.

Gupta M, Bisesi M, Lee J. “Comparison of survivability of *Staphylococcus aureus* and spores of *Aspergillus niger* on commonly used floor materials”. **Am J Infect Control.** 2017; 45(7):717–722.

Gustafson J, Wilkinson B. “Chapter 13: *Staphylococcus aureus* as a food pathogen: the staphylococcal enterotoxins and stress response systems”. In: Griffiths M, ed. **Understanding Pathogen Behaviour.** Elsevier 2005, pp 331–357.

Hadjirin NF, Lay EM, Paterson GK, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J. et al. “Detection of livestock-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* CC398 in retail pork, United Kingdom”. **Eurosurveillance.** 2015; 20, 1–4.

Hanssen AM, Ericson-Sollid JU. “SCCmec in staphylococci: genes on the move”. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 2006; 46 (1), 8–20.

Harper AL, Ferguson DD, Leedom Larson KR, Hanson BM, Male MJ, Donham KJ, Smith TC. “An overview of livestock-associated MRSA in agriculture”. **J. Agromed.** 2010; 15 (2), 101e104.

He Y, Xie Y, Reed S. “Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Staphylococcus aureus* isolates”. **Methods Mol Biol.** 2014; 1085: 103–111.

Hembach N, Alexander J, Hiller C, Wieland A, Schwartz T. “Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant”. **Sci Rep.** 2019; 9:12843.

Heß S, Gallert C. “Demonstration of staphylococci with inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance in sewage and river water and of the capacity of anhydroerythromycin to induce MLS_B”. **FEMS Microbiol. Ecol.** 2014; 88, 48-59.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M et al. “The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. **Trends Microbiol.** 2001; 9:486–493.

Hudson JA. “Microbiological safety of meat *Staphylococcus aureus*”. In: Devine C, Dikeman M, Werner J, eds. **Encyclopedia of Meat Sciences,** 1st Edition. Elsevier 2004, pp 820–825.

Huijbers PM, Blaak H, de Jong MC, Graat EA, Vandenbroucke-Grauls CM, de Roda Husman AM. “*Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review*”. **Environ. Sci. Technol.** 2015; 49, 11993–12004. doi: 10.1021/acs.est.5b02566

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods
Microorganisms in Foods 5: “Characteristics of Microbial Pathogens,” 1st Edition.
Springer US. 1996.

Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the superbug*”. **Int J Infect Dis.** 2010; 14:S7–S11.

Ishikawa T, Matsunaga N, Tawada H, Kuroda N, Nakayama Y, Ishibashi Y, et al. “*TAK-599, a novel N-phosphono type prodrug of anti-MRSA cephalosporin T-91825: synthesis, physicochemical and pharmacological properties*”. **Bioorg. Med. Chem.** 2003; 11, 2427–2437.

Johnsen PJ, Townsend JP, Bohn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM. “*Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures*”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2011; 66, 608–610.

Kadlec K, Feßler AT, Hauschild T, Schwarz S. “*Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”. **Clin. Microbiol. Infect.** 2012; 18 (8), 745–755.

Kim S, Aga DS. “*Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants*.” **J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.** 2007; 10 (8), 559–573.

Koreen L, Ramaswamy S V., Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. “*Spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation*”. **J Clin Microbiol.** 2004; 42: 792–799.

Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA. “*Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: current perspectives*”. **Clin Microbiol Infect.** 2006; 121, 9–15.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. “*How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*”. **BMC Infect Dis.** 2006; 16(6):130.

Kreiswirth B, J. Kornblum RD, Arbeit W, Eisner JN, Maslow A, McGeer DE, Novick RP. “*Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in Staphylococcus aureus*”. **Science.** 1993; 259:227–230.

Le Loir Y, Baron F, Gautier M. “*Staphylococcus aureus and food poisoning*.” **Genet Mol Res.** 2003; 2: 63–76.

Levin-Edens E, Soge OO, No D, Stiffarm A, Meschke JS, Roberts MC. “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Northwest marine and freshwater recreational beaches*”. **FEMS Microbiol Ecol** 2012;79 (2), 412-420.

Lin J, Peng Y, Xu P, Zhang T, Bai C, Lin D, Ou Q, Yao Z. “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in Chinese Children: A Prevalence Meta-Analysis and Review of Influencing Factors”. **PLoS One.** 2016; 21;11(7):e0159728.

Lindsay JA, Holden MTG. “*Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome?” **Trends Microbiol.** 2004; 12:378–385.

Lindsay JA. “Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance-what have we learned from genomics?” **Int. J. Med. Microbiol.** 2013; 303, 318–323.

Liu C, Bayer A, Cosgrove S, Daum R, Fridkin S, Gorwitz R, Kaplan S, Karchmer A, Levine D, Murray B, Rybak M, Talan D, Chambers H. “Clinical practice guidelines by the infectious disease society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections and adults and children”. **Clinical Infectious Disease** 2011;52(3):e18–e55.

Lowy FD. “Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*”. **J Clin Invest.** 2003; 111: 1265–1273.

Madsen AM, Moslehi-Jenabian S, Islam MZ, Frankel M et al. “Concentrations of *Staphylococcus* species in indoor air as associated with other bacteria, season, relative humidity, air change rate, and *S. aureus*-positive occupants”. **Environ Res.** 2018; 160:282–291.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth, S., Hindler, J.F. et al. “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance”. **Clin Microbiol Infect.** 2012; 18, 268–281.

Maki T, Hara K, Iwata A, Lee KC, Kawai K, Kai K, Kobayashi F, Pointing SB, Archer S, Hasegawa H, Iwasaka Y. “Variations in airborne bacterial communities at high altitudes over the Noto Peninsula (Japan) in response to Asian dust events”. **Atmos. Chem. Phys.** 2017; 17, 11877–11897.

Maltezou HC, Giamarellou H. “Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections”. **Int J Antimicrob Agents.** 2006; 27:87–96.

Mamma C, Cala C, Plano MR, Bonura C, Vella A, Monastero R, Palma DM. “Ventilator-associated pneumonia and MRSA ST398, Italy.” **Emerg Infect Dis.** 2010; 16:730–731.

Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S et al. “Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing health-care associated infections”. **Emerg Infect Dis.** 2007; 13:236–242

Martinez JF. “Role of non-clinical environments in the selection of virulence and antibiotic resistance determinants in pathogenic bacteria”. **J Biol Sci.** 2006; 6, 1–8.

Mathema B, Mediavilla JR, Chen L, Kreiswirth BN. 2009. “Chapter 3: Evolution and taxonomy of *Staphylococci*”. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG, eds. **Staphylococci in Human Disease**, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2009; pp 31–64.

McArdell CS, Molnar E, Suter MJF, Giger W. “Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed”. **Switz. Environ. Sci. Technol.** 2003; 37, 5479e5486.

McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zang K. “Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker *Panton-Valentine leukocidin* genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci”. **J Clin Microbiol** 2006;44 (3), 1141-1144.

McDougal LK, Thornsberry C. “The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins”. **J Clin Microbiol.** 1986; 23:832–839.

Mehndiratta PL, Bhalla P. “Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review”. **Indian J Med Microbiol.** 2012;30(1):16-23.

Miao XS, Bishay F, Chen M, Metcalfe CD. “Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada”. **Environ. Sci. Technol.** 2004; 38, 3533e3541.

Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. “Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*.” **Antimicrob Agents Chemother.** 2007; 51:3374–3377.

Miller L, Perdreau-Remington F, Reig G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, Tang AW, Phung T.O. et al. “Necrotizing fasciitis caused by community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles”. **N Engl J Med.** 2005; 352, 1445–1453.

Miragaia M. “Factors Contributing to the Evolution of *mecA*-Mediated β -lactam Resistance in *Staphylococci*: Update and New Insights From Whole Genome Sequencing (WGS)”. **Front Microbiol.** 2018; 9:2723.

Moodley A, Nielsen SS, Guardabass, L. “Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 in pigs”. **Vet. Microbiol.** 2011; 152 (3e4), 420e423.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. “Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains”. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(4): 1574-85.

Musser JM, Kapur V. “Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination”. **J. Clin. Microbiol.** 1992; 30:2058–2063.

Nadimpalli ML, Stewart JR, Pierce E, Pisanic N, Love DC, Hall D, Larsen J, Carroll KC, Tekle T, Perl TM, Heaney CD. “Face mask use and persistence of livestock-associated *Staphylococcus aureus* nasal carriage among industrial hog operation workers and household contacts, USA”. **Environ Health Perspect.** 2018; 126(12): 127005.

Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K et al. “*Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*”. **JAMA**. 2003; 290:2976–2984.

National Research Council. “*Committee to Study the Human Health Effects of Subtherapeutic Antibiotic Use in Animal Feeds*”. Washington, DC: National Academies Press. 1980.

Nubel U, Roumagnac P, Feldkamp M, et al. “*Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008; 105:14130-5.

O’Hara FP, Amrine-Madsen H, Mera RM et al. “*Molecular characterization of Staphylococcus aureus in the United States 2004–2008 reveals the rapid expansion of USA 300 among inpatients and outpatients*”. **Microb Drug Resist**. 2012; 18:555

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD et al. “*Dissemination of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in the community.*” **J Clin Microbiol**. 2002; 40:4289–4294

Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. “*Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”. **Lancet Infect Dis**. 2002; 2:180–189.

Oliveira DC, Milheirico C, Vinga S et al. “*Assessment of allelic variation in the ccrAB locus in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones*”. **J Antimicrob Chemother**. 2006; 58:23–30.

Otter JA, French GL. “*Community associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains as a cause of healthcare associated infection.*” **J Hosp Infect**. 2011; 79:189–193.

Otto M. “*Community-associated MRSA: what makes them special?*” **Int. J. Med. Microbiol**. 2013; 303, 324–330.

Palavecino E. “*Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*”. **Clin Lab Med**. 2004; 24:403–418

Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP et al. “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in U.S. hospitals, 1975–1991.*” **Infect Control Hosp Epidemiol**. 1992; 13:582–586

Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. “*The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”. **Trends Microbiol**. 2014; 22(1):42–47.

Peng Y, Ou Q, Lin D, Xu P et al. “*Metro system in Guangzhou as a hazardous reservoir of methicillin – resistant Staphylococci: findings from a point – prevalence molecular epidemiologic study*”. **Sci Rep**. 2015; 5:16087.

Porrero MC, Valverde A, Fernandez-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S, Canton R, Fernandez-Garayzabal JF, Domínguez L. “*Staphylococcus aureus carrying mecC gene in animals and urban wastewater*”. **Spain. Emerg. Infect. Dis**. 2014; 20, 899-901.

Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I, Battisti A, Franco A, Zmudzki J, Schwarz S, et al. “*Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock.” *MBio*. 2012; 3: 1–6.

Report SE (2010/2015). “*Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015*”.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassions D. “*Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review.*” *Sci. Total Environ*. 2013; 447, 345–360.

Robinson DA, Enright MC. “*Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:3926–3934.

Roodbari A, Naddafi K, Javid A. “*Measurements of bioaerosols in the air around the facilities of waste collection and disposal*”. *Environ. Protect. Eng*. 2013; 39 (4), 105–112.

Rosenberg Goldstein RE, Micallef SA, Gibbs SG, Davis JA, He X, George A, Kleinfelter LM, Schreiber NA, Mukherjee S, Sapkota A, Joseph SW, Sapkota AR. “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants*”. *Environ. Health Perspect*. 2012; 120, 1551-1558.

Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG et al. “*International Nosocomial Infection control consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004–2009*”. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:700–702.

Rossato AM, Reiter KC, d’Azevedo PA. “*Coexistence of virulence genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates*”. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2018; 51 (3), 361–363.

Said MB, Abbassi MS, Gómez P, Ruiz-Ripa L, Sghaier S, Ibrahim C, Torres C, Hassen A. “*Staphylococcus aureus isolated from wastewater treatment plants in Tunisia: occurrence of human and animal associated lineages*”. *Journal of Water and Health*. 2017; 15(4):638-643. doi: 10.2166/wh.2017.258

Santajit S, Indrawattana N. “*Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens*”. *Biomed Res Int*. 2016:2475067.

Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. “*ESKAPE bacteria and extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli isolated from wastewater and process water from German poultry slaughterhouses*”. *Appl Environ Microbiol*. 2020. 86:e02748-19.

Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. “*Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals*”. *Veterinary Microbiology*. 2010; 141, 1–4.

Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. “Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine”. **Vet. Dermatol.** 2017; 28 (1), 82-e19.

Sergelidis D, Angelidis AS. “Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food – borne pathogen”. **Lett Appl Microbiol.** 2017; 64(6):409–418.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO et al. “Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains”. **J Clin Microbiol.** 1999; 37:3556–3563.

Shreshta B, Singh, W, Raj VS, Pokhrel BM, Mohapatra TM. “High Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes in Nosocomial-Acquired *Staphylococcus aureus* Isolated from Tertiary Care Hospitals in Nepal”. **Biomed. Res. Int.** 2014; 10, 790350.

Silva J, Castillo G, Callejas L, Lopez H, Olmos J. “Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile”. **Electron J. Biotechnol.** 2006; 9 (5), 533–540.

Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. “Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms”. **J Antimicrob Chemother.** 2010; 65: 1955–1958.

Sommer MOA and Dantas G. “Antibiotics and the resistant microbiome”. **Current Opinion in Microbiology** 2011;14, 556–563.

Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, et al. “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA”. **PLoS One.** 2013; 8:e63704.

Smith TC. “Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience”. **PLoS Pathog.** 2015; 11:e1004564. doi: 10.1371/journal.ppat.1004564

Springer B, Orendi U, Much P, et al. “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new zoonotic agent?” **Wien KlinWochenschr.** 2009; 121:86–90.6.

Stefani S, Chung DR, Lindsay JA. “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods”. **Int J Antimicrob Agents.** 2012; 39:273–282.

Swenson JM, Williams PP, Killgore G et al. “Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms”. **J Clin Microbiol.** 2001; 39:3785–3788.

Swenson JM, Tenover FC. “Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp*”. **J Clin Microbiol.** 2005; 43:3818–3823.

Takano T, Higuchi W, Otsuka T et al. “Novel Characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan”. **Antimicrob Agents Chemother.** 2008; 52:837–845.

Tolba O, Loughrey A, Goldsmith CE, Millar C, Rooney PJ, Moore JE. “Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA)

methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in river-, sea- and swimming pool water". **Int. J. Hyg. Environ. Health.** 2008; 211 (3e4), 398e402.

Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM et al. "New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* : clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity". **Antimicrob Agents Chemother.** 1989; 33:1869–1874.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. "*Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management". **Clin Microbiol Rev.** 2015; 28: 603–661.

Ubukata K, Yamashita N, Konno M. "Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci". **Antimicrob Agents Chemother.** 1985; 27:851–857

van den Eede A, Martens A, Floré K, Denis O, Gasthuys F, Haesebrouck F, Van den Abeele A, Hermans K. "MRSA carriage in the equine community: an investigation of horse-caretaker couples". **Vet. Microbiol.** 2013; 163 (3–4), 313–318.

Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Larsen J, de Mendonca R, Hallin M, Butaye P, Hermans K, Haesebrouck F, Denis O. "High genetic diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from humans and animals on livestock farms and presence of SCCmec remnant DNA in MSSA CC398." **J Antimicrob Chemother.** 2014; 69: 355–362.

Varga M, Kuntova L, Pantucek R et al. "Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". USA 300 clone. **FEMS Microbiol Lett.** 2012; 332:146–152

Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming". **Emerg. Infect. Dis.** 2005; 11, 1965– 1966.

Wan MT, Chou CC. "Spreading of -lactam resistance gene (*mecA*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through municipal and swine slaughterhouse wastewaters." **Water Res.** 2014; 64: 288 –295.

Wan MT, Chou CC. "Class 1 integrons and the antiseptic resistance gene (*qacEΔ1*) in municipal and swine slaughterhouse wastewater treatment plants and wastewater-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." **Int J Environ Res Public Health.** 2015; 12:6249–6260.

Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. "The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water". **Sci Total Environ.** 2009; 407, 2711–2723.

Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K. "The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin". **Int. J. Med. Microbiol.** 2013; 303 (6–7), 338–349.

Westh H, Zinn CS, Rosdahl VT. "An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries". **Microb. Drug Resist.** 2004; 10, 169–176.

Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. “*Evidence for in-vivo transfer of mecA DNA between strains of Staphylococcus aureus*”. **Lancet.** 2001; 357:1674–1675.

World Health Organization and WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. “*Critically important antimicrobials for human medicine. Ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use*”. 5th revision. World Health Organization, Geneva, Switzerland.2017.

World Organization for Animal Health. “*OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals. Better Understanding of The Global Situation*”. **OIE Annual report.** 2016.

World Health Organization. 2011. 3rd Revision. “*WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA)*”.

World Health Organization. 2018. “*Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017*”.

Zhou M, Wang Y, Liu C, Kudinha T, Liu X, Luo Y, Yang Q, Sun H, Hu J, Xu Y-C. “*Comparison of five commonly used automated susceptibility testing methods for accuracy in the China Antimicrobial Resistance Surveillance System (CARSS) hospitals*”. **Infect Drug Resist.** 2018; 11: 1347–1358.

Zong Z, Peng C, Lü X. “*Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates*”. **PLoS ONE.** 2011; 6(5):e20191.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Κομοδρόμος Δημήτριος. «*Συγκριτική επιδημιολογική μελέτη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα Σταφυλόκοκκου, στα παραγωγικά ζώα, στο κρέας τους, στο περιβάλλον και το προσωπικό σφαγείων και εγκαταστάσεων επεξεργασίας κρέατος της Βόρειας Ελλάδας*». **Διδακτορική Διατριβή.** Θεσσαλονίκη 2021.