ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρίζα Τσολιά

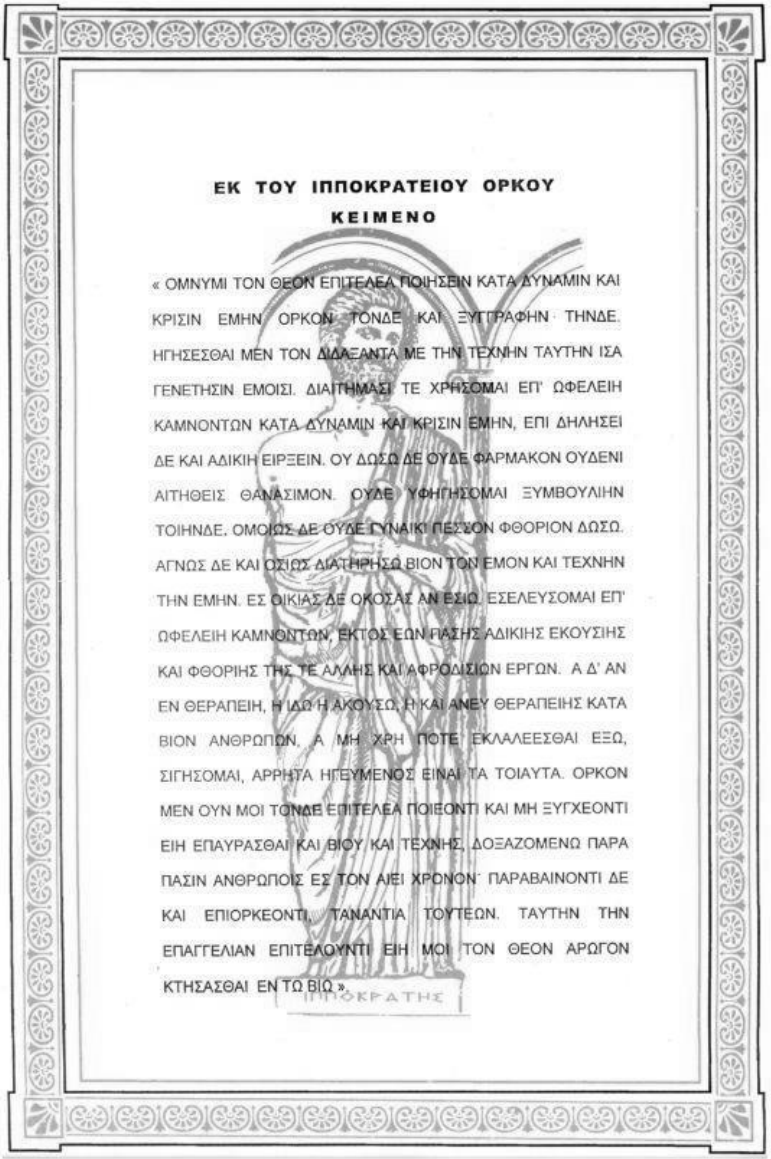
«ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ»

ΔΟΥΔΟΥΛΑΚΑΚΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018


ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ
« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ »
ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

2

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 10/7/2013 (Αρ. πρωτ. 10649)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΠΡΟΟΔΩΝ: 1η 13/1/2014, 2η 2/10/2015 και 3η 30/9/2016

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 23/5/2018 (Αρ. Πρωτ. 28805)

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

• **ΜΑΡΙΖΑ ΤΣΟΛΙΑ** - Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ** - Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΙΡΙΣ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ** - Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

• **ΜΑΡΙΖΑ ΤΣΟΛΙΑ** - Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ** - Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΙΡΙΣ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ** - Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

• **ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ** - Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

• **ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ** - Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΙΧΟΣ** - Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

• **ΣΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ** – Αναπλ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Doudoulakakis A, Spiliopoulou I, Spyridis N, Giormezis N, Kopsidas J, Militsopoulou M, Lebessi E, Tsolia M.

Emergence of a *Staphylococcus aureus* Clone Resistant to Mupirocin and Fusidic Acid Carrying Exotoxin Genes and Causing Mainly Skin Infections.

J Clin Microbiol. 2017 Aug;55(8):2529-2537

Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, **Doudoulakakis A**, Jelastopulu E, Chini V, Spiliopoulou A, Levidiotou S, Panagea T, Vogiatzi A, Lebessi E, Petinaki E, Spiliopoulou I.

A 12-year survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Greece: ST80-IV epidemic?

Clin Microbiol Infect. 2014 Mar 19, O796-803

Doudoulakakis AG, Bouras D, Drougka E, Kazantzi M, Michos A, Charisiadou A, Spiliopoulou I, Lebessi E, Tsolia M.

Community-associated Staphylococcus aureus pneumonia among Greek children: epidemiology, molecular characteristics, treatment, and outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016 May 2. PubMed PMID: 27140201.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. An**astassios Doudoulakakis**, Panagiota Pnevmatikou, George Paradisis, Nikolaos Spyridis, Maria Tsolia, Irene Paraskakis, Evangelia Lebessi

Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus aureus* strains resistant to mupirocin and fusidic acid are emerging in Athens, Greece

34th ESPID 10-14 May 2016, Brighton

2. **A. Doudoulakakis**, E. Bozavoutoglou[1], D. Hatzaki, E.E Vetouli, C. Goumenopoulos, M. Matsas, A. Troupi, E. Paraskaki, M. Tsolia, E. Lebessi

Epidemiological study of childhood bacteraemia during a 7-year period (2007-2013).

33th ESPID 12-16 May 2015, Leipzig

3. **A. Doudoulakakis**, E. Drougka, D. Bouras, M. Kazantzi, A. Michos, A. Charisiadou, M. Tsolia, I. Spiliopoulou, E. Lebessi

Microbiological and molecular study of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* pneumonia among children in Greece

33th ESPID 12-16 May 2015, Leipzig

4. **Anastassios Doudoulakakis**, Panagiota Pnevmatikou, Elissavet Bozavoutoglou, Evangelia-Eirini Vetouli, Iris Spiliopoulou, Maria Tsolia, Evangelia Lebessi

A hospital-based study of Community-acquired *Staphylococcus aureus* pneumonia among children: Epidemiology, treatment and outcome (2007-2012)

32th ESPID 6-10 May 2014, Dublin

5. **Anastassios Doudoulakakis**, Panagiota Pnevmatikou, Nikoleta Palaiologou, Minos Matsas, Irene Paraskakis, Iris Spiliopoulou, Maria Tsolia, Evangelia Lebessi

Invasive *Staphylococcus aureus* disease in children during a 6 years period

32th ESPID 6-10 May 2014, Dublin

6. **A. Doudoulakakis**, N. Palaiologou, C. Goumenopoulos, E. Vetouli, A. Troupi, M. Matsas, E. Lebessi (Athens, GR)

Trends in antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* isolates among paediatric patients in Greece (2007-2011)

23nd ECCMID Berlin, 26-29 April 2013

7. **A. Doudoulakakis**, E. Drougka, N. Palaiologou, A. Foka, M. Tsolia, I. Spiliopoulou, E. Lebessi (Athens, Patras, GR)

Epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greek children over a five-year period

23nd ECCMID Berlin, 26-29 April 2013

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. **Α. Δουδουλακάκης**, Π. Πνευματικού, Ν. Παλαιολόγου, Μ. Μάτσας, Ε. Παρασκάκη, Ι. Σπηλιοπούλου, Μ. Τσολιά, Ε. Λεμπέση

Διεισδυτικές λοιμώξεις από *Staphylococcus aureus* σε παιδιά (2007-1013)

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 29-31 Μαϊου 2014, Αθήνα

2. **Α. Δουδουλακάκης**, Π. Πνευματικού, Ε. Μποζαβούτογλου, Ε.Ε. Βετούλη, Ι. Σπηλιοπούλου, Μ. Τσολιά, Ε. Λεμπέση

Κλινικοεργαστηριακή μελέτη πνευμονίας της κοινότητας από *Staphylococcus aureus* σε παιδιά (2007-2013)

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 29-31 Μαϊου 2014, Αθήνα

3. **Α. Δουδουλακάκης**, Ε. Δρούγκα, Δ. Μπούρας, Μ. Καζαντζή, Α. Μίχος, Α. Χαρισιάδου, Μ. Τσολιά, Ι. Σπηλιοπούλου, Ε. Λεμπέση

Ο Ευρωπαϊκός κλώνος MRSA ST80-IV-PVL(+) επικρατεί στη σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας στα παιδιά.

9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 2-4 Ιουνίου 2016, Αθήνα

Η εργασία αυτή βραβεύτηκε στο 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 4 Ιουνίου 2016.

4. **Α. Δουδουλακάκης**, Ι. Σπηλιοπούλου, Χ. Γουμενόπουλος, Ν. Γιορμέζης, Δ. Χατζάκη, Μ. Μηλιτσοπούλου, ΕΕ Βετούλη, Α. Τρουπή, Μ. Τσολιά, Ε. Λεμπέση

Αναδυόμενος τοξινογόνος κλώνος *Staphylococcus aureus* ανθεκτικός στα τοπικά αντιβιοτικά προκαλεί επιφανειακές λοιμώξεις δέρματος σε παιδιά

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 9-11 Μαρτίου 2017, Αθήνα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο *Staphyloccocus aureus* είναι από τα συχνότερα μικροβιακά παθογόνα στον άνθρωπο. Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στα παιδιά είναι καθημερινή πρόκληση για τον μικροβιολόγο και τις παιδιατρικές ειδικότητες. Η παγκόσμια επιδημία του ανθεκτικού στη μεθικιλλίνη *S. aureus* ιδιαίτερα απασχολεί και τη χώρα μας από τα τέλη της δεκαετίας του 90. Τελευταία, παρατηρήσαμε και την ανάδυση ενός νέου ευαίσθητου στη μεθικιλλίνη κλώνου σταφυλοκόκκου που προκαλεί λοιμώξεις, κυρίως μολυσματικό κηρίο στα παιδιά της περιοχής μας.

Προσωπικό ενδιαφέρον για το παθογόνο αυτό είχα ως ειδικευόμενος Βιοπαθολόγος στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», αλλά η συστηματική μελέτη για τον σταφυλόκοκκο και τις σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις ξεκίνησε το 2011, ένα χρόνο πριν την κατάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής. Συνεχίζεται, και ευοδώθηκε με μια ενδελεχή μοριακή ανάλυση στελεχών στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σταφυλοκόκκων στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Πατρών (Μάϊος - Ιούλιος 2016) υπό την επιστημονική ευθύνη της καθηγήτριας κυρίας Ίριδας Σπηλιοπούλου. Στο Κέντρο αυτό εφαρμόζονται σύγχρονες τεχνικές Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας και αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις.

Στην προσπάθεια αυτή, αρωγοί στάθηκαν κορυφαίοι επιστήμονες ο καθένας στο χώρο του. Με την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Τσολιά η συνεργασία υπήρξε άψογη, στο σχεδιασμό και τη διερεύνηση των ερωτημάτων της μελέτης, στη συγγραφή των δημοσιεύσεων και του παρόντος πονήματος, ενώ διέθεσε προσωπικά και χρήματα για το πειραματικό μέρος της μελέτης. Ευχαριστώ τη διευθύντρια μου στο Μικροβιολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων «Α. & Π. Κυριακού» κα Ευαγγελία Λεμπέση, με την οποία υπάρχει καθημερινή δημιουργική επικοινωνία σε επιστημονικό και σε ανθρώπινο επίπεδο. Η συνδρομή της ήταν για μένα αξιοσημείωτη, μιας και σε κάθε νέο ερευνητικό και συγγραφικό εγχείρημα οι δυσκολίες δεν είναι αμελητέες. Οι επιβλέποντες της διατριβής καθηγητές Νικόλαος Σπυρίδης και Ίρις Σπηλιοπούλου ήταν κοντά μου και διαθέσιμοι όλα αυτά τα χρόνια, τους ευχαριστώ θερμότατα ενώ η δίμηνη ερευνητική δραστηριότητα στο εργαστήριο της κας Σπηλιοπούλου είναι μια σημαντική εμπειρία για μένα. Η εμπιστοσύνη των παραπάνω συναδέλφων και πανεπιστημιακών με τίμησε και υπήρξε κίνητρο εξέλιξης για μένα. Ελπίζω να βρίσκομαι σε επιστημονική διάδραση μαζί τους για καιρό ακόμη.

Τέλος, ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Θάνο Μίχο, τον βιοπαθολόγο κ. Δημήτρη Μπούρα και την παιδίατρο κ. Μαρία Καζαντζή από το νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» για την ωραία συνεργασία, τον κ. Γιάννη Κοψιδά, κ. Ελένη Κουρκούνη για τη βοήθεια στη στατιστική ανάλυση, την κ. Μαρία Μηλιτσοπούλου και τον κ. Νίκο Γιορμέζη στην Πάτρα για τη πολύτιμη βοήθεια τους για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της μελέτης και φυσικά όλο το προσωπικό του Μικροβιολογικού Τμήματος του νοσοκομείου Παίδων «Π. & Α. Κυριακού», συναδέλφους μου ιατρούς και τεχνολόγους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ»

Σκοπός: Ο *Staphylococcus aureus* (SA) είναι μείζον βακτηριακό παθογόνο, συχνά ανθεκτικό σε διάφορα αντιμικροβιακά και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα αλλά και θνησιμότητα στην κοινότητα και το νοσοκομείο. Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις της κοινότητας από ανθεκτικό στη μεθικιλλίνη SA (community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA) είναι αρκετά συχνές στα παιδιά στην περιοχή μας. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η επιδημιολογική, κλινική και μικροβιολογική διερεύνηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων της κοινότητας και η μοριακή μελέτη των στελεχών που απομονώθηκαν στο Νοσοκομείο Παίδων «Π. & Α. Κυριακού» κατά την δεκαετία 2007-2016. Αναλυτικά, μελετήθηκαν οι λοιμώξεις της κοινότητας από MRSA (CA-MRSA), οι λοιμώξεις από ανθεκτικό στη μουπιροκίνη - ευαίσθητο στη μεθικιλλίνη SA (2013-2016) και οι περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας (2007-2014).

Υλικό και Μέθοδοι: Καταγράφηκαν αναδρομικά μέχρι το 2012 και προοπτικά στη συνέχεια, όλες οι λοιμώξεις από *S. aureus* εξωνοσοκομειακών και νοσηλευόμενων ασθενών και κατηγοριοποιήθηκαν σε λοιμώξεις κοινότητας (community-associated, CA) και νοσοκομειακές (health care-associated, HA). Η καταγραφή των ασθενών βασίσθηκε στα αρχεία του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Παίδων «Π. και Α. Κυριακού». Για τη μελέτη της πνευμονίας έγινε ανασκόπηση και των αρχείων του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκ. Παίδων «η Αγία Σοφία» καθώς και ανάλυση των αντιστοίχων στελεχών σταφυλοκόκκου. Οι καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων έγιναν σύμφωνα με τις μεθόδους του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου, η ταυτοποίηση του μικροβίου με συμβατικές μεθόδους και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά φάρμακα έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Για αμφίβολα αποτελέσματα στην κεφοξιτίνη χρησιμοποιήθηκε το latex PBP2a Slidex MRSA Detection Kit (bioMerieux SA, France), και το D-test για τον προσδιορισμό του τύπου της αντοχής στην κλινδαμυκίνη. Στα διεισδυτικά στελέχη έγινε προσδιορισμός των MICs των αντιμικροβιακών

βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη και λινεζολίδη με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης. Μοριακή μελέτη με PCRs έγινε σε επιλεγμένα στελέχη για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στη μουπιροκίνη (*mupA*), το φουσιδικό οξύ (*fusB*) και την κλινδαμυκίνη (*ermA, ermC*), αλλά γονιδίων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες, όπως PVL (*lukS/lukF-PV*), επιδερμολυσίνες (*eta, etb*), fibronectin binding protein A (*fnbA*). Γονοτυπικές μέθοδοι (*SCCmec* και *agr* τυποποίηση), ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο πεδίο (PFGE) και πολυτοπική ανάλυση αλληλουχιών (MLST) εφαρμόστηκαν για τον χαρακτηρισμό των κλώνων.

Αποτελέσματα:

Γενικά. Κατά το χρονικό διάστημα 2007-2016, καταγράφηκαν 5.423 περιστατικά σταφυλοκοκκικκών λοιμώξεων της κοινότητας (CA-SA). Η πλειονότητα των περιπτώσεων αφορούσε λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (85.2%). Μεταξύ των 119 περιπτώσεων διεισδυτικής σταφυλοκοκκικής λοίμωξης, συχνότερες ήταν οι οι οστεοαρθρικές (ν=66, 55.5%) λοιμώξεις ακολουθούμενες από τις μικροβιαιμίες (25, 21%) και τις πνευμονίες (22, 18.5%). Ανθεκτικός στη μεθικιλλίνη σταφυλόκοκκος (MRSA) ήταν το αίτιο σε ποσοστό 41,2% του συνόλου των περιπτώσεων διεισδυτικής λοίμωξης και ήταν σημαντικά συχνότερος μεταξύ των περιπτώσεων πνευμονίας (86.4%, p<0.01). Συνολικά, η επίπτωση του MRSA ελαττώθηκε με την πάροδο των ετών από 37.3% (2008) σε 15.7% (2016). Η συχνότητα αντοχής των ως άνω στελεχών MRSA σε καναμυκίνη, τετρακυκλίνη και φουσιδικό οξύ ήταν υψηλή (>50%), στην ερυθρομυκίνη 20% (9.45 – 34.9) και στην κλινδαμυκίνη 17.8% (8.7 – 33.3).

Λοιμώξεις από ανθεκτικά στη μουπιροκίνη στελέχη σταφυλοκόκκου. Συνολικά, καταγράφηκαν 437 περιπτώσεις λοιμώξεων από ανθεκτικό στη μουπιροκίνη SA κατά την χρονική περίοδο 2013-2016. Όλα τα ως άνω στελέχη πλην τριών ήταν ευαίσθητα στη μεθικιλλίνη. Το μολυσματικό κηρίο ήταν η συχνότερη κλινική οντότητα (371, 84.9%), και δεύτερο σε συχνότητα το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο δερματικής αποφολίδωσης (staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) (21, 4.8%), ενώ δεν διαπιστώθηκε περιστατικό αποστήματος οφειλόμενου στο στέλεχος αυτό. Οι λοιμώξεις από ανθεκτικό στη μουπιροκίνη SA παρουσίασαν αυξητική τάση κάθε έτος και ήταν συχνότερες κατά τους θερινούς μήνες. Αντοχή υψηλού επιπέδου στη μουπιροκίνη διαπιστώθηκε στο 99% και ιδιοσυστασιακή αντοχή στην κλινδαμυκίνη στο 20.1% των στελεχών. Μοριακή διερεύνηση διενεργήθηκε σε 102 αντιπροσωπευτικά στελέχη και εξ αυτών 100 (98%) ήταν *mupA*- και 97 (95%) *fusB*-θετικά, 83 (81.4%) *lukS/lukF*-θετικά, 95 (93%) *eta/etb*-

θετικά συγχρόνως, και 99 (97%) *fnbA*-θετικά. 26/27 (96.3%) των ανθεκτικών στην κλινδαμυκίνη ήταν *ermC*-θετικά Γονοτυπικός έλεγχος των στελεχών με PFGE έδειξε ότι 96/99 (96.7%) στελέχη ανήκαν στον κύριο PFGE τύπο 1, ενώ ο έλεγχος με MLST σε τυχαία επιλεγμένα από κάθε τύπο στελεχη έδειξε ότι όλα ανήκαν στον ST121 κλώνο.

Σταφυλοκοκκικές πνευμονίες. Κατά την περίοδο 2007-201 καταγράφηκαν 41 περιπτώσεις CA-SA πνευμονίας σε παιδιά (αγόρια 61%, διάμεσης ηλικίας 4.3 μηνών, IQR 2.8-28 μήνες) που νοσηλεύτηκαν στα δύο Παιδιατρικά Νοσοκομεία «Π. & Α. Κυριακού» και «Η Αγία Σοφία». MRSA απομονώθηκε σε 31 περιπτώσεις (75.6%). Οι συχνότερες επιπλοκές ήταν το εμπύημα (25/41, 61%), οι πνευματοκήλες (7/41, 17%) και το πνευμονικό απόστημα (1/41, 2.5%). Εισαγωγή στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας απαιτήθηκε σε 24 (58.5%) περιπτώσεις, ενώ δύο ασθενείς κατέληξαν (4.9%). Ως οριστική θεραπεία χορηγήθηκε βανκομυκίνη με ή χωρίς την προσθήκη άλλου αντιμικροβιακού (55.9%), κλινδαμυκίνη και λινεζολίδη (26.5% έκαστη). Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην βανκομυκίνη (MIC_{90} 2mg/l, εύρος 1-2), τεϊκοπλανίνη (MIC_{90} 1.5mg/l, εύρος 0.5-2) και λινεζολίδη (MIC_{90} 1mg/l εύρος 0.25-2), ενώ 26.8% ήταν ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη. Μεταξύ των 25 μοριακά μελετηθέντων στελεχών, 20 ήταν *mecA*-θετικά και *fnbA*-θετικά. Από αυτά, 90% ανήκαν στον ST80-IV/*agr*III/*lukS/lukF*-θετικό κλώνο. Τα MSSA στελέχη ήταν πολυκλωνικά, 3/5 ήταν *lukS/lukF*-θετικά και 3/5 *fnbA*-θετικά.

Συμπεράσματα: Οι CA-MRSA λοιμώξεις μειώθηκαν στα παιδιά κατά την δεκαετία 2007-2016. Η συχνότητα της συνδυασμένης αντοχής στα αντιβιοτικά φουσιδικό οξύ, τετρακυκλίνη και καναμυκίνη που χρησιμοποιείται ως φαινοτυπικός δείκτης του Ευρωπαϊκού-ST-80-IV κλώνου μειώθηκε και αυτή. Οι λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (Skin and soft tissue infections, SSTIs) επικρατούν συντριπτικά στις σταφυλοκοκοκκικές λοιμώξεις. Ωστόσο, από το 2013 και μετά αναδύθηκε ένας νέος κλώνος MSSA (ST121), που φέρει γονίδια αντοχής στα τοπικά αντιμικροβιακά φουσιδικό οξύ και μουπιροκίνη και παράγει επιδερμολυσίνες. Ο κλώνος αυτός ευθύνεται για την μεγάλη αύξηση κρουσμάτων μολυσματικού κηρίου. Η αντοχή στα πιο πάνω ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά διευκολύνει την μετάδοση του κλώνου αυτού στην κοινότητα. Επιπλέον, υπάρχει και αύξηση των περιπτώσεων SSSS συνεπεία του κλώνου αυτού. Οι παιδίατροι πρέπει να λάβουν το μήνυμα του περιορισμού της αλόγιστης χρήσης δερματικών αντιμικροβιακών σκευασμάτων στα παιδιά.

Ο MRSA και ειδικά ο ST80-IV κλώνος επικράτησε ως αίτιο της CA-SA πνευμονίας στα παιδιά. Η χορηγούμενη αντιμικροβιακή ή/και χειρουργική θεραπεία ήταν αποτελεσματική

σε όλες πλην δύο περιπτώσεων, παρόλη τη σχετικά υψηλή MIC στη βανκομυκίνη και το υψηλό ποσοστό αντοχής στην κλινδαμυκίνη.

EPIDEMIOLOGIC AND MOLECULAR STUDY OF PEDIATRIC INFECTIONS CAUSED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Objectives: *Staphylococcus aureus* (SA) is a well-established multidrug resistant pathogen, whereas community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) infections in children are of major concern. The purpose of this study was to assess the epidemiology, clinical characteristics, antimicrobial resistance patterns and molecular markers of certain *S. aureus* infections occurred in Greek children with no healthcare risk factors attending a large pediatric hospital in Athens during a ten-year period. CA-MRSA infections (2007-2016), skin and soft tissue infections (SSTIs) caused by mupirocin-resistant-methicillin-susceptible *S. aureus* strains (2013-2016) and CA-SA pneumonia cases (2007-2014) have been reviewed and studied.

Methods: Cases and resistance patterns of all *S. aureus* isolates recovered from outpatients and inpatients were reviewed using the laboratory (LIS) and WHONET software. Medical files were reviewed where judged necessary and epidemiological categorization of infections as CA or HA was assigned. Cultures were performed according to the procedures of the microbiological laboratory. Identification of *S. aureus* was done by conventional methods (colony morphology, catalase test, latex agglutination test). Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion method according the CLSI guidelines. For cefoxitin ambiguous results the latex PBP2a Slidex MRSA Detection Kit (bioMerieux SA, France) was used. A disk approximation test (D test) was used to detect inducible clindamycin resistance. Vancomycin, teicoplanin, linezolid MICs for invasive strains were determined by a gradient MIC method. Genes encoding high level (HLR) mupirocin resistance *(mupA),* fusidic acid resistance *(fusB),* *erm*A, *erm*C, PVL (*lukS/lukF*-PV), exfoliative toxins (*eta, etb),* fibronectin binding protein A *(fnbA)* were investigated in preserved selected strains by PCRs. Genotyping was performed by SCC*mec* and *agr* typing, whereas clonality was determined by PFGE and MLST.

Results: During 2007-2016, 5423 CA-SA infections were recorded. Of these, 119 were invasive, osteoarticular infections were predominant (66, 55.5%), followed by bacteremia (25, 21%) and pneumonia (22, 18.5%). MRSA were 41.2% of invasive infections, strongly associated with pneumonia cases (86.4%, $p<0.01$). Overall, MRSA declined yearly from 37.3% (2008) to 15.7% (2016). SSTIs accounted for 85.2% of the above MRSA infections. Concurrent resistance to fusidic acid, kanamycin and tetracycline was high (>50%), for erythromycin was 20% (9.45 – 34.9) and for clindamycin 17.8% (8.7 – 33.3).

A total of 437 cases of mupirocin-resistant *S. aureus* were recorded for 2013-2016. All but 3 isolates were methicillin-susceptible. Impetigo was the predominant clinical entity (371, 84.9%) followed by staphylococcal skin scalded syndrome (21, 4.8%) wheras no abscesses were identified. The number of infections detected annually increased during the study years, especially during the summer months. The percentage of high-level-resistance to mupirocin and constitutive resistance to clindamycin were 99% and 20.1%, respectively. Among 102 representative strains available for molecular investigation, 100 (98%) were *mupA*- and 97 (95%) *fusB*-positive, 26/27 (96.3%) clindamycin-resistant strains were *erm*C-positive, 83 (81.4%) *lukS/lukF*-positive, 95 (93%) carried both *eta/etb* genes, 99 (97%) were *fnbA*-positive. Genotyping of MSSA strains revealed that 96/99 (96.7%) belonged to one main pulsotype 1 classified as ST121.

During 2007-2014, 41 cases of CA-SA pneumonia were recorded (boys, 61%); median age 4.3 months from both pediatric hospitals "P. & A. Kyriakou" and "Aghia Sophia". MRSA accounted for 31 cases (75.6%). Complications included empyema (25/41, 61%), pneumatoceles (7/41, 17%) and lung abscess (1/41, 2.5%). Intensive Care Unit admission was required in 58.5%. Two deaths occurred (4.9%). Definitive therapy was based on vancomycin with or without other antibiotics (55.9%), followed by clindamycin and linezolid (26.5% each). All isolates were susceptible to vancomycin (MIC_{90} 2mg/l, range 1-2), teicoplanin (MIC_{90} 1.5mg/l, range 0.5-2) and linezolid (MIC_{90} 1mg/l range 0.25-2), whereas 26.8% were resistant to clindamycin. Among 25 studied strains, 20 were *mec*A-positive, carrying also the *fnbA* gene. Of these, 90% belonged to ST80-IV/*agr*III/*lukS/lukF* - positive clone. MSSA strains showed polyclonality, 3/5 were *lukS/lukF* positive and 3/5 *fnbA*-positive.

Conclusions: CA-MRSA infections have significantly declined among children over the last decade. Resistance to fusidic acid, kanamycin and tetracycline being a phenotypical marker of European ST80 is high among these strains but declines over time too. The

spectrum of CA-MRSA infections in children in our area is largely associated with the spread of ST80 clone and their clinical characteristics are similar to those described in other parts of the world where different MRSA clones predominate.Moreover, a newly emerged MSSA clone (ST121) carrying genes for resistance to topical antimicrobials and epidermolysins, causing mainly impetigo was documented. Resistance and rich toxinogenic profile confers to this clone adaptability for spread in the community. SSSS cases were also on the rise due to the aforementioned clone. Pediatricians must be discouraged overprescribing topical antimicrobials in their practice.

MRSA and particularly ST80-IV clone predominated among pediatric CA-SA pneumonia cases. Treatment provided was effective in all but two patients, despite relatively high MIC values of vancomycin and a high resistance rate to clindamycin.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 7

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 9

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 17

1. Εισαγωγή 18

2. Λοιμώξεις από *Staphylococcus aureus* 19

3. Λοιμογόνοι παράγοντες του *S. aureus* 26

4. Τι είναι ο MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*); 36

5. Μοριακές τεχνικές για την τυποποίηση του *Staphylococcus aureus* 39

6. Αντιμικροβιακά και μηχανισμοί αντοχής του *Staphylococcus aureus* 44

7. *Staphylococcus aureus* και εμβόλιο 54

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 58

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 59

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 59

Υλικό: 60

Μέθοδοι: 61

Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων 61

Ταυτοποίηση *Staphylococcus aureus* 61

Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά / προσδιορισμός MIC 61

Μοριακή μελέτη κλινικών στελεχών 62

Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA σε διάλυμα 63

Έλεγχος ποιότητας παραγόμενου DNA με PCR και γονίδια για PCR 64

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 80

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 84

1.1 Επιδημιολογία σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων της κοινότητας στα παιδιά κατά τη δεκαετία 2007-2016 85

1.2 Επιδημιολογία και μοριακή διερεύνηση ανθεκτικών στη μουπιροκίνη στελεχών *Staphylococcus aureus* σε παιδιά της κοινότητας (2013-2016)..... 87

2.1 Διεισδυτικές λοιμώξεις από *S. aureus* σε παιδιά (2007-2016) 95

2.2 Σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας στα παιδιά 96

ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 107

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 115

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Το όνομα του γένους *Staphylococcus* οφείλεται στον Ogston, που πρώτος το 1881 παρατήρησε μικροοργανισμούς σε πύον ασθενούς που έμοιαζαν με τσαμπιά σταφυλιού. Σύμφωνα με την 9η έκδοση του του Murray's Manual of Clinical Microbiology το γένος *Staphylococcus* συνδέεται στενά με το προσφάτως περιγραφέν γένος *Macrococcus*, και έχει στενή σχέση με τα είδη *Bacillus, Brochothrix, Gemella, Listeria* και *Planococcus*. Όλα τα παραπάνω ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae*, τάξης *Bacillales*. Το γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνει 41 είδη, από τα οποία 17 έχουν απομονωθεί από λοιμώξεις στον άνθρωπο. Είναι Gram θετικοί κόκκοι διαταγμένοι σε ομάδες, ζεύγη, τετράδες ή μικρές αλύσους που θυμίζουν τσαμπιά σταφυλιού, ακίνητοι, καταλάση θετικοί [1]. Είναι δυνητικά αναερόβιοι με εξαίρεση τους *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* και *S. saccharolyticus*. Οι περισσότεροι σταφυλόκοκκοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου. Αρκετοί εμφανίζουν επιλεκτικότητα αποικισμού σε συγκεκριμένες περιοχές του ανθρώπινου οργανισμού (πχ. ο *S. capitis* στο δέρμα και τους σμηγματογόνους αδένες του τριχωτού της κεφαλής, του μετώπου και του λαιμού και ο *S. auricularis* στον έξω ακουστικό πόρο), ενώ κάποιοι βρίσκονται μόνο σε ζώα (*S. hyicus, S. intermedius*), Οι σταφυλόκοκκοι που έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι: *S. aureus, S. epididymidis, S. epidermidis, S. saprophyticus, S. haemolyticus, S. warneri, S. hominis, S. simulans, S. lugdunensis, S. schleiferi, S. capitis, S. auricularis, S. pasteuri, S. caprae, S. cohnii, S. xylosus, S. saccharolyticus* [1].

Ο *S. aureus* αποικίζει το 20-30% των παιδιών, ιδιαίτερα τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες και τις υγρές περιοχές του σώματος, συνήθως χωρίς να προκαλεί λοίμωξη. Ωστόσο θεωρείται μείζον παθογόνο που προκαλεί ευρύ φάσμα λοιμώξεων, από απλές ή επιπλεγμένες λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (skin and soft tissue infections, SSTIs) μέχρι σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως οστεομυελίτιδα, σήψη, ενδοκαρδίτιδα και πνευμονία με σημαντική θνητότητα [2]. Αποτελεί όμως αίτιο βακτηριαιμίας και διεισδυτικής νόσου και σε νοσοκομειακούς ασθενείς, με σημαντική θνητότητα [2]. Σε μελέτη που διεξήχθη με τη συμμετοχή 300 Μικροβιολογικών εργαστηρίων των ΗΠΑ (1998 - 2005) βρέθηκε ότι είναι το μείζον σε συχνότητα παθογόνο σε νοσηλευόμενους και το δεύτερο σε εξωνοσοκομειακούς ασθενείς (18.7% και 14.7%, αντίστοιχα) [3]. Μετά το 2000 οι λοιμώξεις της κοινότητας (σε άτομα χωρίς ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας σε νοσοκομείο ή άλλο κέντρο παροχής φροντίδας υγείας) από *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλλίνη (MRSA) έχουν λάβει επιδημικές διαστάσεις σε αρκετές χώρες [4].

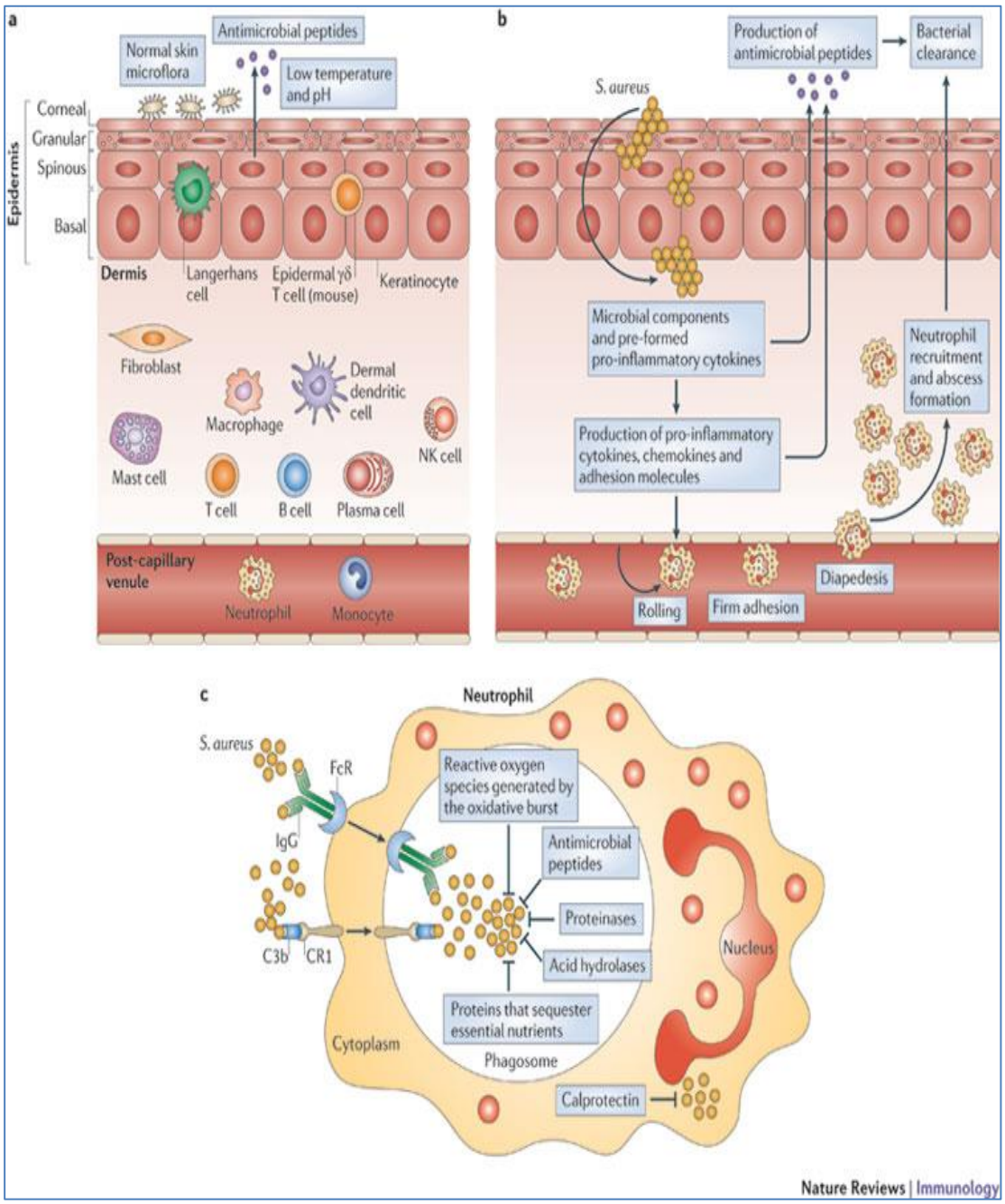
Στην πλειονότητα των ανθρώπων οι λοιμώξεις είναι ευκαιριακές κάτω από ευνοϊκές συνθήκες ενεργοποίησης του μικροβίου και των λοιμογόνων παραγόντων του. Κάποια άτομα όμως είναι πιο επιρρεπή για σταφυλοκοκκική λοίμωξη. Τέτοιες προδιαθεσικές καταστάσεις είναι οι παρακάτω [5]:

- ✓ Ελαττωματική χημειοταξία των λευκοκυττάρων, συγγενής (Wiskott-Aldrich σύνδρομο, σύνδρομο Down's, σύνδρομο Job's, ανωμαλία Chediak-Higashi) ή επίκτητη (σακχαρώδης διαβήτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα).
- ✓ Ελαττωματική οψωνινοποίηση των αντισωμάτων, όπως σε συγγενή ή επίκτητη υπογαμμασφαιριναιμία ή έλλειψη κλασμάτων του συμπληρώματος C3 και C5.
- ✓ Ελαττωματική φόνευση του βακτηρίου στο φαγόσωμα λόγω ανεπάρκειας πυροδότητησης της μυελοπεροξειδάσης των μακροφάγων, όπως συμβαίνει στην χρόνια κοκκιωματώδη νόσο, λεμφοβλαστική λευχαιμία, οξεία ή χρόνια μυελοβλαστική λευχαιμία.
- ✓ Λύση συνέχειας του δέρματος όπως τραυματισμός, έκζεμα, χειρουργική επέμβαση.
- ✓ Παρουσία ξένων σωμάτων (ενδαγγειακοί καθετήρες, ράμματα, προσθετικά υλικά).
- ✓ Ιογενείς λοιμώξεις, όπως η γρίππη Α και Β, που προδιαθέτουν σε μεταλοιμώδη σταφυλοκοκκική πνευμονία.
- ✓ Χρόνια υποκείμενα νοσήματα, όπως κακοήθεια, αλκοολισμός, καρδιακά νοσήματα.
- ✓ Θεραπευτική ή προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών.

2. Λοιμώξεις από Staphylococcus aureus

Η πλειονότητα των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων αφορούν το δέρμα και τα μαλακά μόρια σε ποσοστό 80-90% (Skin and soft tissue infections, SSTIs). Χρησιμοποιούμενος όρος στη βιβλιογραφία είναι επίσης και οι οξείες λοιμώξεις του δέρματος και των εξαρτημάτων του (Acute bacterial skin and skin structure infections, ABSSSI). Εδώ περιλαμβάνονται η κυτταρίτιδα/ερυσίπελας, η λοίμωξη τραύματος και εκτεταμένα αποστήματα με ελάχιστη επιφάνεια τα 75cm^2, ενώ εξαιρούνται τα έλκη διαβητικού ποδιού και οι λοιμώξεις εγκαυμάτων [6]. Ο πρόσφατος αυτός ορισμός (2013) συνάδει με την ευρεία επικράτηση του MRSA ως αίτιο αποστημάτων και θεωρείται ταυτόσημος με τις cSSTIs (complicated SSTIs) [7]. Πριν τη συνοπτική περιγραφή του φάσματος των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων περιγράφονται οι βασικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί της αρχικής αλληλεπίδρασης του βακτηρίου και του δέρματος και η προσπάθεια του μεγαλοοργανισμού να περιχαρακώσει τη λοίμωξη [8] (εικόνα 1).

Εικόνα 1: Αλληλεπίδραση *Staphylococcus aureus* και ξενιστή



Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections
L. Miller & J. S. Cho
Nature Reviews Immunology 11, 505-518 (August 2011)

a. *Οι φυσικοί μηχανισμοί άμυνας του δέρματος είναι ο φραγμός της επιδερμίδας, η φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια και η χαμηλή θερμοκρασία*

με το χαμηλό pH. ***b.*** *Σε λοίμωξη του δέρματος μετά από λύση της συνέχειας του ιστού, κερατινοκύτταρα και επιχώρια κύτταρα της ανοσίας (κύτταρα του Langerhans, γδ Τ λεμφοκύτταρα της επιδερμίδας, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, μαστοκύτταρα, Β και Τ λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και φυσικά κυτταροκτόνα (ΝΚ) λεμφοκύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης. Αυτά τα μόρια έλκουν πολυμορφοπύρηνα από το αίμα, που περιχαρακώνουν τοπικά τη λοίμωξη με τη δημιουργία αποστήματος. Η κορωνίδα της κλινικής εικόνας από σταφυλοκοκκική λοίμωξη είναι η δημιουργία αποστήματος από πολυμορφοπύρηνα (πύον). Αντιμικροβιακά πεπτίδια παράγονται όπως η β-defensin και οι κατελιχιδίνες.* ***c.*** *Οψωνινοποιημένα βακτήρια με το Fc κλάσμα και υποδοχείς του συμπληρώματος φαγοκυτταρώνονται από πολυμορφοπύρηνα. Με το σχηματισμό φαγοσωματίων, πληθώρα χημικών αντιδράσεων λαμβάνει χώρα που οδηγεί στη φόνευση του βακτηρίου. Κύριοι μηχανισμοί είναι αναπνευστική έκρηξη (παραγωγή ελευθέρων ριζών* O_2^-, H_2O_2 *και HOCl) από την οξειδάση NADPH και την μυελουπεροξειδάση (MPO), η παραγωγή φαγοσωματικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (λυσοζύμη, α-defensin, κατελιχιδίνες), πρωτεϊνάσες (cathepsin G, neutrophil elastase, gelatinase, neutrophil collagenase και proteinase 3) και όξινες υδρολάσες. Τέλος, ενδεικτικά αναφέρονται πρωτεΐνες όπως η λακτοφερρίνη, τρανσκοβαλαμίνη ΙΙ, λιποκαλίνη που αναστέλλει την ικανότητα του μικροβίου να χρησιμοποιεί σίδηρο, η καλπροτεκτίνη από τα πολυμορφοπύρηνα που δεσμεύει* Zn^{++} *και* Mn^{++} *αναστέλλοντας τη βακτηριακή ανάπτυξη και το συστατικό συμπληρώματος C3b* [8].

Θυλακίτιδα: Είναι καλοήθης λοίμωξη της επιφανειακής στιβάδας του δέρματος εντοπιζόμενη στο θύλακα της τρίχας, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών, ερυθρών, επώδυνων οζιδίων και την απουσία συστηματικών εκδηλώσεων [5].

Μολυσματικό κηρίο: Πρόκειται για λοίμωξη της επιφανειακής στιβάδας του δέρματος συχνότερη στα παιδιά, κύρια στο πρόσωπο αλλά και σε άλλα εκτεθειμένα σημεία του σώματος. Διακρίνεται σε φυσαλιδώδες (bullous) και μη φυσαλιδώδες (non-bullous) κηρίο. Το φυσαλιδώδες μολυσματικό κηρίο είναι μια εντοπισμένη μορφή του συνδρόμου δερματικής αποφολίδωσης (staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) και εμφανίζεται συχνότερα στα νεογνά αλλά μπορεί να συμβεί και σε παιδιά ή ενήλικες. Οι φυσαλίδες μεγαλώνουν με σαφή περιθώρια χωρίς περιβάλλον ερύθημα. Με τη ρήξη τους εξέρχεται κίτρινο περιεχόμενο. Μπορεί να συμβεί στην περιοχή της πάνας, στη μασχάλη, στις πτυχές του αυχένα. Το μη φυσαλιδώδες έχει εικόνα διάβρωσης ως μελιτόχρους

εφελκίδας με ερυθρά περιφέρεια, που μπορεί να είναι κνησμώδης. Η επέκτασή του γίνεται με αυτοενοφθαλμισμό. Ο *S. aureus* ευθύνεται για το 80-90% των περιπτώσεων μολυσματικού κηρίου (ΜΚ) με το υπόλοιπο να προκαλείται από τον S*treptococcus pyogenes* [5].

Δοθιήνας και ψευδάνθρακας: Πρόκειται για εν τω βάθει φλεγμονή του θυλάκου της τρίχας, με τη διαπύηση να φτάνει στη δερμίδα και στον υποκείμενο υποδόριο ιστό, συνήθως επώδυνα χωρίς γενικά συμπτώματα. Στον ψευδάνθρακα είναι ακόμη βαθύτερα, είναι συρρέοντα χαρακτηριστικά στον αυχένα, με γενικά συμπτώματα. Απαιτείται διάνοιξη και παρεντερική αντιμικροβιακή θεραπεία [5].

Πυώδης ιδρωταδενίτιδα: Πρόκειται για χρόνια υποτροπιάζουσα δερματική φλεγμονή των αποκρινών ιδρωτοποιών αδένων της μασχάλης, των βουβώνων και του περινέου. Γίνεται απόφραξη των αδένων με αλλοιώσεις ως επί δοθιήνωσης. Συνυπάρχει άλγος, οίδημα και ερυθρότητα συνήθως χωρίς γενικά συμπτώματα [5].

Μαστίτιδα: Φλεγμονή του μαζικού αδένα, που σχετίζεται με τη λοχεία και το θηλασμό. Επιφανειακά αποστήματα μπορεί να χρήζουν παρακέντησης, ενώ βαθύτερες βλάβες χρήζουν διάνοιξης και παροχέτευσης μαζί με αντιμικροβιακή θεραπεία [5].

Λοίμωξη τραύματος: Συνήθως είναι μετεγχειρητικές λοιμώξεις. Το τραύμα φλεγμαίνει και συνήθως υπάρχει έξοδος οροπυώδους υγρού. Το βάθος της λοίμωξης είναι σημαντικό για την επιλογή της θεραπευτικής παρέμβασης, που μπορεί να είναι καθαρισμός και αντιμικροβιακή αγωγή μέχρι ευρεία διάνοιξη και καθαρισμός του τραύματος με χορήγηση παρεντερικής αντιμικροβιακής αγωγής. Συνήθως η λοίμωξη αυτή προκαλείται από στέλεχος που αποικίζει τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες του ασθενούς και σπανιότερα από νοσοκομειακό στέλεχος MRSA [5].

Κυτταρίτιδα και επιπλεγμένες λοιμώξεις μαλακών ιστών: Ταχέως επεκτεινόμενη φλεγμονή του υποδόριου ιστού μέχρι την υποκείμενη περιτονία και το παρακείμενο λίπος. Μπορεί να οφείλεται και σε άλλα Gram (+) ή Gram (-) παθογόνα, γι' αυτό ο ρόλος της καλλιέργειας και ιδιαίτερα της καλλιέργειας αίματος είναι σημαντικός. Το ερυσίπελας κυρίως οφείλεται στον *S. pyogenes* αλλά συχνά ευθύνεται και ο *S. aureus.* Η φλεγμονή εμφανίζει σαφώς αφοριζόμενο επηρμένο όριο και είναι επώδυνη με συμμετοχή των επιχώριων λεμφαδένων. Η νεκρωτική περιτονιΐτιδα είναι πολύ σοβαρή λοίμωξη και οφείλεται σε αιματογενή ή τοπική επέκταση του βακτηρίου. Απαιτείται ευρύς

χειρουργικός καθαρισμός με εκτομή της περιτονίας και παρεντερική αντιμικροβιακή αγωγή καλύπτουσα και άλλα αίτια όπως την *Pseudomonas aeruginosa* [5].

Βακτηριαιμία: η ετήσια επίπτωση της βακτηριαιμίας από *S. aureus* υπολογίζεται παγκοσμίως σε 20-30 επεισόδια ανά 100.000. Όταν συμβαίνει προ της εισαγωγής στο νοσοκομείο χαρακτηρίζεται ως μικροβιαιμία της κοινότητας (Community-Associated, CA), ενώ όταν συμβαίνει μετά από 48 ώρες από την εισαγωγή ως μικροβιαιμία σχετιζόμενη με υπηρεσίες υγείας (Healthcare-Associated, HA). Η CA - μικροβιαιμία διακρίνεται σε "healthcare-community-onset, HCO" όταν σχετίζεται με ενδαγγειακούς καθετήρες (σφαγιτιδικό, Hickman, συσκευές περιτοναϊκής διάλυσης [CAPD]) ή είναι αληθής CA με έναρξη στην κοινότητα (Community-Onset, CO) και είναι αποτέλεσμα πρωτοπαθούς εντόπισης του παθογόνου, πχ σε έδαφος τραυματισμού, έλκους, αποστήματος, πνευμονίας ή άμεσης εισόδου του παθογόνου στο αίμα από ενδαγγειακές συσκευές, χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών κ.α. Στο 10% των περιπτώσεων μικροβιαιμίας συνυπάρχει ενδοκαρδίτιδα από την πρόσφυση του μικροοργανισμού στις βαλβίδες. Μεταστατικά έμβολα επίσης μπορούν να εγκατασταθούν στο νεφρό ή και σε άλλα όργανα. Στις HA βακτηριαιμίες συνδεόμενες με ενδαγγειακό καθετήρα, εκτός της επιθετικής αντιμικροβιακής αγωγής ίσως χρειαστεί και αφαίρεση του καθετήρα. Τα νοσηλευόμενα νεογνά είναι ένας ειδικός υποπληθυσμός στον οποίον η μικροβιαιμία από *S. aureus* είναι συχνή [5]. Πρόσφατα δεδομένα από πολυκεντρική, αναδρομική μελέτη σε 348 Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών (MENN) στις ΗΠΑ για τα έτη 1997-2012 δείχνουν ότι η επίπτωση της νόσου είναι 0.4% δηλαδή 44 επεισόδια μικροβιαμίας ανά 10.000 εισαγωγές και αφορούσε σε νεογνά βάρους γέννησης <1500g [9]. Η επίπτωση του MSSA και MRSA ήταν 72.1% και 27.9% αντίστοιχα, χωρίς διαφορά στη θνητότητα.

Ενδοκαρδίτιδα: Εντοπίζεται και σε φυσικές και σε προσθετικές βαλβίδες. Η λοιμώδης σταφυλοκοκκική ενδοκαρδίτιδα συνήθως εμφανίζεται σαν οξύ σηπτικό σύνδρομο με πυρετό, μη ειδικά συμπτώματα και εμφάνιση φυσήματος που δεν προϋπήρχε. Επίσης μπορεί να εμφανιστούν πετεχειώδεις βλάβες του δέρματος ή τα οζίδια του Janeway. Εκβλαστήσεις και σηπτικά έμβολα μπορεί μέσω της κυκλοφορίας να βρεθούν σε απομακρυσμένα όργανα, όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους νεφρούς, σε περιφερικές ή στεφανιαίες αρτηρίες. Σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών χαρακτηριστική είναι η ενδοκαρδίτιδα των δεξιών βαλβίδων. Η πιο χρήσιμη

διαγνωστική εξέταση για την επιβεβαίωση λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας είναι το διοισοφάγειο ηχοκαρδιογράφημα [5].

Πνευμονία: Μπορεί να προκληθεί από μικροεισροφήσεις από το ανώτερο αναπνευστικό ή από αιματογενή διασπορά. Η πνευμονία από εισρόφηση στην κοινότητα συνήθως συμβαίνει σε ηλικιωμένους, αλλά και νέα άτομα, ακόμη και σε παιδιά μετά από γρίπη. Η νοσοκομειακή πνευμονία σχετίζεται με τη διασωλήνωση και την χρήση αναπνευστήρα (Ventilator-Associated-Pneumonia,VAP). Η πνευμονία λόγω αιματογενούς διασποράς είναι επιπλοκή ενδοκαρδίτιδας δεξιάς βαλβίδας. Οι επιπλοκές και των δύο μορφών της σταφυλοκοκκικής πνευμονίας είναι το πνευμονικό απόστημα, η μικροβιαιμία και το πνευμονικό εμπύημα [10-12].

Οστεομυελίτιδα / Σηπτική αρθρίτιδα: Η οστεομυελίτιδα από *S. aureus* οφείλεται συνήθως σε αιματογενή διασπορά του μικροβίου. Αφορά πιο συχνά τα μακρά οστά στα παιδιά και τους σπονδύλους στους ενήλικες. Οστεομυελίτιδα μπορεί να συμβεί και μετά από αρθροπλαστική στο ισχίο ή το γόνατο. Οι λοιμώξεις των τεχνητών προθέσεων είναι δύσκολες στην αντιμετώπιση, απαιτούν την αφαίρεση της πρόθεσης και ευρύ χειρουργικό καθαρισμό με μακροχρόνια αντιμικροβιακή θεραπεία. Η καλλιέργεια ιστού από την οστεολυτική βλάβη ή του αποστήματος είναι απαραίτητη. Η οστεομυελίτιδα των παιδιών σε χώρες με υψηλό βιοτικό επίπεδο έχει συχνότητα 8 περιπτώσεις στα 100.000 παιδιά, ενώ είναι πιο συχνή στις χώρες με χαμηλό βιοτικό επίπεδο [13]. Τα αγόρια προσβάλλονται δυο φορές συχνότερα από τα κορίτσια. Η πιο δόκιμη αντιμετώπιση θεωρείται ο τρυπανισμός και παροχέτευση του πύου και όχι εκτεταμένες επεμβάσεις. Ωστόσο αν η διάγνωση γίνει πρώϊμα η συντηρητική θεραπεία είναι αποτελεσματική στο 90% των περιπτώσεων [13], ενώ με τη χειρουργική θεραπεία υπάρχει κίνδυνος επιπλοκών, με πιο συχνή την ανάπτυξη χρόνιας οστεομυελίτιδας.

Η σηπτική αρθρίτιδα από *S. aureus* συμβαίνει συχνότερα σε παιδιά προεφηβικής ηλικίας ή ως επιπλοκή μικροβιαιμίας σε ενήλικες. Η άρθρωση είναι διογκωμένη, φλεγμαίνουσα με περιορισμό της κινητικότητας. Παρακέντηση του θύλακα, χρώση κατά Gram και καλλιέργεια του πύου είναι απαραίτητες. Στα παιδιά μπορεί να υπάρχει οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα σε ποσοστό 17-33%, λόγω επινέμησης των μικροβίων από την οστική βλάβη στον αρθρικό θύλακα [14].

Τροφική δηλητηρίαση: Η δηλητηρίαση από *S. aureus* συμβαίνει μετά τη βρώση τροφής μολυσμένης με στέλεχος που παράγει μια θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη. Τα

συμπτώματα είναι έμετοι, κοιλιακά κολικοειδή άλγη και ναυτία που εκδηλώνονται 2-6 ώρες μετά τη λήψη της τροφής και υφίενται μετά από 8-10 ώρες. Πυρετός και νευρολογικά συμπτώματα χαρακτηριστικά απουσιάζουν. Ύποπτες τροφές είναι πατατοσαλάτα, παγωτό, κρεμώδεις σάλτσες, επεξεργασμένα κρέατα, τροφές σε κονσέρβα, αρτοπαρασκευάσματα [5].

Σταφυλοκοκκικό σύνδρομο δερματικής αποφολίδωσης (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS): Η κλινική εικόνα του συνδρόμου οφείλεται σε στελέχη που παράγουν τις επιδερμολυτικές (exfoliative) τοξίνες ΕΤΑ ή/και ΕΤΒ που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα *eta* και *etb* γονίδια. Συμβαίνει συχνότερα σε νεογνά και παιδιά μικρότερα των 5 ετών. Εμπλέκονται ο επιπεφυκότας, οι ρώθωνες, ο ομφαλός, το περίνεο και οι υπόλοιπες δερματικές επιφάνειες. Υπάρχει το περιορισμένο SSSS που είναι μία μορφή φυσαλιδώδους μολυσματικού κηρίου και το γενικευμένο στο οποίο οι τοξίνες κυκλοφορούν συστηματικά και προκαλούν γενικευμένο ερύθημα και φυσαλίδες σε μεγάλες επιφάνειες του σώματος με καταστροφή και ρήξη της επιφανειακής στοιβάδας του δέρματος. Στην καλλιέργεια των βλαβών αυτών δεν αναπτύσσεται το βακτήριο γι' αυτό πρέπει να ληφθεί δείγμα από τη μύτη, το ρινοφάρυγγα ή πτυχές του δέρματος, το περίνεο, τον ομφαλό για έλεγχο φορείας. Οι τοξίνες δρουν στο κερατινοποιημένο επιθήλιο (stratum granulosum) της επιδερμίδας, και όχι στο βλεννογόνο. Έχουν δράση πρωτεάσης της σερίνης, πλούσια σε γλουταμικό με στόχο τη δεσμογλεΐνη-1 (Dsg-1). Αυτή είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη στα δεσμοσώματα, που εξασφαλίζει τη σφιχτή σύνδεση των κερατινοκυττάρων μεταξύ τους. Τέσσερις τύποι βρίσκονται σε διάφορα ύψη της επιδερμίδας, αλλά μόνο η Dsg-1 υδρολύεται από τις επιδερμολυσίνες του *S. aureus* [15]. Δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί γιατί περισσότερο το σύνδρομο αυτό συμβαίνει σε παιδιά όπως επίσης και το αν για την εκδήλωση του συνδρόμου με το "ξεφλούδισμα" του δέρματος υπεύθυνη είναι μόνο η υδρόλυση της Dsg-1 ή και δευτερογενείς αλλοιώσεις των κερατινοκυττάρων [5].

Σταφυλοκοκκικό σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (Staphylococcal toxic shock syndrome, STSS): Εκδηλώνεται με πυρετό, υπόταση, ερυθροδερμία, εμέτους, διάρροια, οξεία νεφρική ανεπάρκεια, κεφαλαλγία, ρίγος και επιπεφυκίτιδα. Διαγνώστηκε πρώτα σε γυναίκες που κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσης έκαναν χρήση ταμπόν. Οι ίνες του ταμπόν με τον εγκλωβισμό του O_2 και του CO_2 και την παροχή θρεπτικών συστατικών από το αίμα και τους ιστούς δημιουργούν ιδανικές συνθήκες επώασης του *S. aureus,* ο

οποίος παράγει την τοξίνη TSST-1, που περνά στην κυκλοφορία προκαλώντας το κλινικό σύνδρομο με αρνητικές αιμοκαλλιέργειες. Υπάρχει και STSS μη σχετιζόμενο με την έμμηνο ρύση, που οφείλεται στις εντεροτοξίνες Β και C (staphylococcal enterotoxins SEB, SEC. Σποραδικά συμβαίνει σε έδαφος αποστημάτων, οστεομυελίτιδας, μεταγριππώδους πνευμονίας, εγκαυμάτων, μετεγχειρητικών τραυμάτων. Οι TSST-1, SEB, SEC είναι υπεραντιγόνα (Sags) που κινητοποιούν υπερβολικά την ανοσιακή απάντηση, με αποτέλεσμα εικόνα σηπτικής καταπληξίας, με διαφυγή ενδαγγειακού υγρού στον διάμεσο χώρο, με αποτέλεσμα την υπόταση και την ιστική υποξία. Ως συχνές επιπλοκές του STSS αναφέρονται το οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, ενώ η τοξίνη έχει άμεση τοξική δράση στο μυοκάρδιο, ήπαρ, νεφρούς και σκελετικούς μύες. Ενδιαφέρον έχει ότι ο οργανισμός μπορεί να μην απαντήσει με παραγωγή μόνιμων αντισωμάτων έναντι της TSST-1. Η διαφοροδιάγνωση περιλαμβάνει το SSSS, οστρακιά, βαριά γαστρεντερίτιδα, σαλπιγγίτιδα, σηπτική αποβολή κυήματος, σαλπιγγίτιδα, οξεία λοίμωξη ουροποιητικού. Η αντιμετώπιση στηρίζεται στην αντιμικροβιακή αγωγή, με παράγοντες που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση περιορίζοντας την παραγωγή τοξινών, όπως η κλινδαμυκίνη, ριφαμπικίνη, υποστήριξη και αναπλήρωση υγρών έως και χορήγηση γ-σφαιρίνης. Η θνητότητα του συνδρόμου είναι 3% [5].

Βακτηριουρία / Ουρολοίμωξη: Η αληθής ουρολοίμωξη από *S. aureus* είναι κατόπιν αιματογενούς διασποράς στο νεφρό. Αφορά σε ηλικιωμένους, ασθενείς με επεμβατικές πράξεις στο ουροποιητικό ή χρήση καθετήρα, ενοίκους οίκων ευγηρίας, απόφραξη ουροποιητικού συστήματος ή κακοήθεια [5].

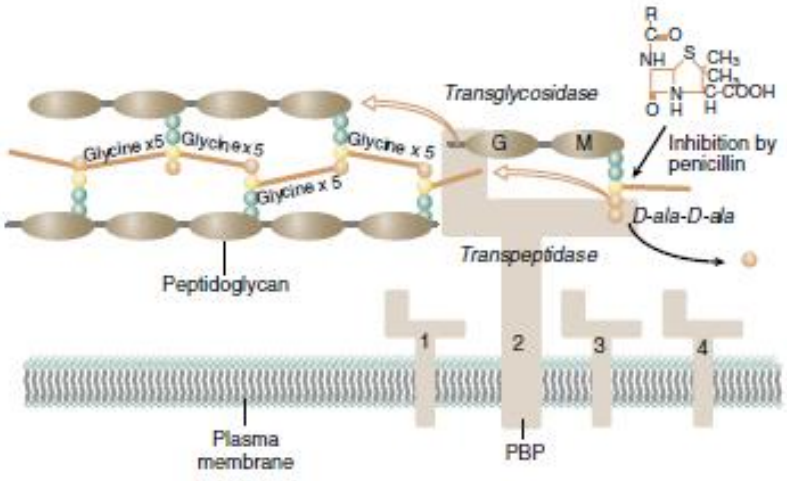
3. Λοιμογόνοι παράγοντες του S. aureus

3.1. Παράγοντες επιφανείας

Έλυτρο (κάψα): Πρόκειται περί πολυσακχαριδικής στοιβάδας που περιβάλλει το 90% των στελεχών. Διακρίνονται 11 αντιγονικοί τύποι, με τους τύπους 5 και 8 να αναγνωρίζονται συχνότερα σε λοιμώξεις. Το έλυτρο αναστέλλει τη χημειοταξία και την φαγοκυττάρωση του βακτηρίου από τα πολυμορφοπύρηνα, καλύπτοντας επιφανειακές πρωτεΐνες και μόρια C3b, αλλά και προάγει την προσκόλληση του βακτηρίου σε προσθετικά βιοϊατρικά υλικά (καθετήρες, συνθετικά μοσχεύματα, βαλβίδες) [1].

Πεπτιδογλυκάνη (ή μουκοπεπτίδιο) και τειχοϊκά οξέα: Πρόκειται για το σημαντικότερο δομικό στοιχείο των σταφυλοκόκκων. Αποτελείται από τους πολυσακχαρίδες N-ακετυλομουραμικό οξύ (NAMA) και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (NAG) που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Σε κάθε NAMA συνδέεται η πενταπεπτιδική γέφυρα L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala. Με τη δράση των PBPs (τρανσπεπτιδάσες, Penicillin Binding proteins) συνδέονται μέσω τρανσγλυκοζυλίωσης το NAMA με τη NAG και μέσω τρανσπεπτιδίωσης γεφυρώνεται η 4η D-ala με την 2η D-glu του νεοσχηματισμένου τοιχώματος, ενώ στην 3η D-lys συνδέεται και μια γέφυρα πενταγλυκίνης. Μέσω αυτών των χιαστών συνδέσεων (cross links) εξασφαλίζεται στην πεπτιδογλυκάνη εξαιρετική πυκνότητα και σταθερότητα. Η PBP2 έχει δράση τρανσγλυκοσιδάσης και τρανσπεπτιδάσης, ενώ οι PBPs 1, 3, 4 μόνο τρανσπεπτιδάσης (εικόνα 2) [5,16].

Εικόνα 2. Δομή και σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στον *S. aureus* [5].



Τα τειχοϊκά οξέα σχετίζονται με το μηχανισμό της προσκόλλησης του βακτηρίου στους βλεννογόνους. Η πεπτιδογλυκάνη και τα τειχοϊκά οξέα έχουν τις παρακάτω ιδιότητες: ενεργοποίηση συμπληρώματος, αύξηση χημειοταξίας των πολυμορφοπυρήνων, επαγωγή παραγωγής ιντερελευκίνης-1 (IL-1) από τα μονοπύρηνα, και παραγωγή οψωνινοποιητικών αντισωμάτων [1]. Επίσης η πεπτιδογλυκάνη και οι λιποπρωτεΐνες του τοιχώματος μέσω των TLR2 ενεργοποιούν το NF-kB μονοπάτι και την έντονη παραγωγή κυτοκινών [2].

Πρωτεΐνη Α: Πρόκειται για πρωτεΐνη του τοιχώματος, μοριακού βάρους 42kDa με πληθώρα ιδιοτήτων: Συνδέει το Fc κλάσμα των IgG πλην της IgG3, έχει ανοσορρυθμιστικές δράσεις, όπως και η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ, έχει ανοσογονική ιδιότητα με μετρήσιμα αντισώματα στον ορό ατόμων με σοβαρή σταφυλοκοκκική λοίμωξη [1]. Στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός τμήματος μεταβλητού μεγέθους (100-400 bp) του γονιδίου της πρωτεΐνης Α, στηρίζεται η μέθοδος τυποποίησης σταφυλοκόκκων *spa* typing (τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης Α).

Μεγάλο ενδιαφέρον από του παράγοντες επιφανείας του *S. aureus* παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες **MSCRAMM's** (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) [17] που είναι οι διαμεσολαβητές για τη σύνδεση με την εξωκυττάρια διάμεση ουσία (ECM, extracellular matrix), τα συστατικά δηλαδή του εξωκυττάριου χώρου που προσφέρουν τη δομική στήριξη για τα κύτταρα. Οι συνδέουσες το ινωδογόνο και τη φιμπρονεκτίνη πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί μερικώς στη λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα και η συνδέουσα το κολλαγόνο προσκολλησίνη (collagen binding protein) στη σηπτική αρθρίτιδα, όπως και η ικανότητα του μικροβίου να επιβιώνει ενδοκυττάρια [2]. Αρχετυπικές MSCRAMM's είναι οι ClfA και ClfB του *S. aureus* και η SdrG περιέχουσα σερίνη-ασπαρτικό του *S. epidermidis*. Υπάρχει και η οικογένεια πρωτεϊνών **NEAT** (near iron transporter) για τη δέσμευση της αίμης από την κυκλοφορούσα αιμοσφαιρίνη, βοηθώντας έτσι το βακτήριο να χρησιμοποιήσει σίδηρο. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι σημαντικότερες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας [17].

3.2 Ένζυμα

Με την παθογονικότητα του βακτηρίου σχετίζονται τα παρακάτω ένζυμα [1]:

- ✓ Καταλάση, η οποία αδρανοποιεί τοξικές ελεύθερες ρίζες και το H_2O_2 που παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση των φαγοκυττάρων της φυσικής ανοσίας κατά τη φαγοκυττάρωση του μικροοργανισμού.
- ✓ Ελεύθερη και συνδεδεμένη πηκτάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική. Η δράση αυτή διαφέρει από το φυσιολογικό μηχανισμό πήξης του αίματος που απαιτεί Ca++ και αναστέλλεται από την ηπαρίνη.

- ✓ Clumping factor (ClfA και ClfB), συστατικό υπεύθυνο για την σύνδεση του βακτηρίου στο ινωδογόνο και την ινική. Πρόκειται για συνδεδεμένης πηκτάσης.
- ✓ Ινωδολυσίνη, φωσφολιπάση C, DNA-άση, λιπάσες, υαλουρονιδάση, CHIP (chemotaxis Inhibitory Protein) που αδρανοποιεί το C5a είναι μερικά ακόμη ένζυμα, που ευνοούν τη διασπορά και εγκατάσταση του βακτηρίου στον εξωκυττάριο χώρο.

✓ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΣΥΝΔΕΤΗΣ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
MSCRAMMs		
Clumping factor A (ClfA)	Καρβοξυτελικό άκρο ινωδογόνου	Προσκόλληση σε σταθερό ινωδογόνο, ανοσοδιαφυγή διά της σύνδεσης με το διαλυτό ινωδογόνο
	Complement factor I	Ανοσοδιαφυγή, αποδόμηση C3b
Clumping factor B (ClfB)	Fibrinogen α-chain repeat 5, κερατίνη 10 και λορικρίνη	Προσκόλληση σε κερατινοποιημένο επιθήλιο, αποικισμός μύτης
Serine–aspartate repeat protein C (SdrC)	β-neurexin, DLL	άγνωστη
	Κερατινοποιημένο επιθήλιο	Αποικισμός ρινός
SdrD	Κερατινοποιημένο επιθήλιο	Αποικισμός ρινός
SdrE	Παράγοντας συμπληρώματος H	Ανοσοδιαφυγή (immune ivasion), αποδόμηση C3b
Bone sialoprotein-binding protein (isoform of	α-αλυσίδα ινωδογόνου	Προσκόλληση στην ECM
Fibronectin-binding proteins A (FnBPA) και B (FnBPB)	FnBPA: σύνδεση με C άκρο ινωδογόνου γ-αλυσίδα και ελαστίνη, DLL	Προσκόλληση στην ECM
	φιμπρονεκτίνη (FnBPA και FnBPB):	Προσκόλληση στην ECM, Ανοσοδιαφυγή
Collagen adhesion (Cna)	Τριπλή έλικα κολλαγόνου	Προσκόλληση σε ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο
	Πρωτεϊνη C1q	Παρεμπόδιση κλασσικής οδού συμπληρώματος

NEAT motif family		
Iron-regulated surface protein A (IsdA)	Αίμη, ινωδογόνο, φιμπρονεκτίνη, κυτοκερατίνη 10, λορικρίνη	Πρόσληψη αίμης κ σιδήρου, προσκόλληση σε κερατινοποιημένο επιθήλιο, αντοχή στη λακτοφερρίνη
IsdB	Αιμοσφαιρίνη, αίμη, β3 ιντεγκρίνες	Πρόσληψη αίμης κ σιδήρου Διαφυγή από μη φαγοκυτικά κύτταρα

Πίνακας 1: MSCRAMM's (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) στον *Staphylococcus aureus* [17]

3.3 Τοξίνες

Ο *S. aureus* παράγει πλειάδα τοξινών, όπως αιμολυσίνες α, β, γ, δ, επιδερμολυσίνες Α και Β (SSST, scalded skin syndrome toxins), περισσότερες από 20 εντεροτοξίνες (staphylococcal enterotoxins, SE) (SEs: SEA, SEB, SEC_n, SED, SEE, SEI και SE-like proteins: SEI-G, SEI-H, SEI-J, SEI-U), Toxic Shock Syndrome Toxin-1, (TSST-1) και λευκοκτονίνες (Panton-Valentine, lukE-lukD, lukM) [1,5].

Αιμολυσίνη α (Hla - α τοξίνη)

Παράγεται από το 95% των στελεχών, ως υδατοδιαλυτό μονομερές βάρους 33kD, σχηματίζει πόρους στα κύτταρα στόχους και έχει προφλεγμονώδη δράση. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *hla* και η παραγωγή της ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γονιδίων *agr* (accessory gene locus), για αυτό η έκφραση της κυμαίνεται μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Με την πρόκληση πόρων καταστρέφει τα επιθηλιακά κύτταρα, ερυθροκύτταρα, ινοβλάστες, μονοπύρηνα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, αλλά όχι πολυμορφοπύρηνα [18]. Οι Bubeck και Wardenburg έδειξαν σε πειραματικά μοντέλα ποντικών ότι η Hla είναι σημαντικός παθογενετικός παράγοντας για τις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων και την πνευμονία [19]. Ο υποδοχέας της α-τοξίνης είναι ο ADAM10 (A-disintegrin και μεταλλοπρωτεϊνάση 10).

Λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL)

Σε παθογόνα στελέχη MRSA ειδικά από λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (SSTIs) της κοινότητας είναι πλέον γνώση του ιατρικού κόσμου η σύνδεση αυτών των στελεχών με την παραγωγή της PVL (Panton-Valentine Leuloctonin) λευκοκτονίνης. Ήδη από το 1932 είχε παρατηρηθεί η συμμετοχή της σε λοιμώξεις δέρματος από ευαίσθητα στη μεθικιλλίνη στελέχη σταφυλοκόκκου (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA), άρα προϋπήρχε της εμφάνισης του MRSA [4]. Είναι διμερής τοξίνη που ανοίγει πόρους στα κύτταρα στόχους, με τα επιμέρους τμήματα της LukS-PV και LukF-PV να ηλεκτροφορούνται στο εργαστήριο ως αργό (S) και γρήγορο (F) τμήμα. Κύτταρα στόχοι της τοξίνης είναι τα ανθρώπεια πολυμορφοπύρηνα, τα κυψελιδικά μακροφάγα ποντικών και ανθρώπου, τα πολυμορφοπύρηνα του κονίκλου [20]. Πειραματικά μοντέλα σε ζώα έχουν αποδώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα για τη δράση της PVL και δεν μπορούν με ακρίβεια να εξαχθούν ασφαλή δεδομένα για τον άνθρωπο. Ωστόσο η πνευμονία από PVL(+) *S. aureus* (MRSA ή MSSA) συχνά συνοδεύεται από λευκοπενία, αιμόπτυση, εμπύημα, σήψη και χαρακτηρίζεται από υψηλή θνητότητα [21]. Επάγει έντονη κινητοποίηση της φυσικής ανοσίας με την αλληλεπίδραση PVL και των TLR2 και CD14 των

κυψελιδικών μακροφάγων. Πολύ συχνά ανευρίσκεται και σε επιδημικά στελέχη CA-MRSA που προκαλούν SSTIs. Η PVL δεν είναι αιμολυτική τοξίνη. Η ποσοτική μέτρηση της PVL υπερτερεί της ποιοτικής ανίχνευσης [22]. Στελέχη MRSA από ασυμπτωματικούς ρινικούς αποικισμούς είναι συνήθως PVL αρνητικά. Ανευρίσκεται και στους MSSA, αλλά η συχνότητα ανίχνευσης της εκτοξεύθηκε από τα μέσα της δεκαετίας του '90 με την εμφάνιση και διάδοση των MRSA στελεχών [4]. Η PVL θεωρείται πλέον βασικός παράγοντας της λοιμογόνου δύναμης του MRSA της κοινότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η PVL εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε συνδυασμό με την κασέτα SCC*mec*IV και V και σπάνια με τις I, II, III [23]. Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση [22] ανασκοπεί τις 9 εργασίες που έχουν εξετάσει ως σήμερα τις μυοσκελετικές λοιμώξεις από PVL(+) *S. aureus* στα παιδιά (επτά από τις ΗΠΑ, μία από τη Γαλλία και μία από την Ελλάδα) [24]. Γενικά, καταδεικνύεται ότι τα παιδιά αυτά εμφανίζουν υψηλότερο πυρετό, υψηλότερους δείκτες φλεγμονής, μεγαλύτερη συχνότητα επιπλοκών, μεγαλύτερη πιθανότητα εισαγωγής σε ΜΕΘ, και συχνότερα ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης σε σύγκριση με όσα έχουν λοίμωξη από PVL(-) στελέχη. Τα γονίδια *lukF-lukS* προέρχονται από φάγο και έτσι μπορούν να μεταφερθούν με οριζόντια μεταφορά μεταξύ στελεχών. Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση [25] φαίνεται ότι η PVL εμπλέκεται σημαντικά στην παθογένεια των SSTIs και λιγότερο με τον αποικισμό και τη διεισδυτική νόσο όπως πνευμονία, μικροβιαιμία και οστεοαρθρικές λοιμώξεις.

Άλλες λευκοκτονίνες (Hemolysin-γ, Hemolysin-γ2, LukED, LukAB, LukGH)

Το 99% των στελεχών φέρουν στο γονιδίωμα τους το *hlg* γονίδιο, είναι μη μεταθετό. Τα στελέχη που συνθέτουν λευκοκτονίνες έχουν απομονωθεί με αυξημένη συχνότητα από SSTIs και νεκρωτική πνευμονία [5].

Η λευκοκτονίνη ED (LukED) δρα επί του υποδοχέα χημειοκινών CXCR1 και CXCR2 και ευοδώνει την καταστροφή μονοκυττάρων και πολυμορφοπυρήνων in vitro. Αυξάνει μαζί με τις υπόλοιπες τοξίνες την παθογονικότητα του μικροοργανισμού, όπως και τη θνητότητα σε πειραματικά μοντέλα συστηματικών λοιμώξεων σε ποντίκια [26].

Από το γονιδίωμα του *S. aureus* το 22% ποικίλλει μεταξύ στελεχών και αυτές οι διαφορές περιλαμβάνουν δομικά γονίδια ή ρυθμιστικές περιοχές που επιδρούν στην βιωσιμότητα - ικανότητα επικράτησης (fitness), παθογονικότητα και λοιμογονικότητα των στελεχών [5].

3.4. Άλλοι παράγοντες που συσχετίζονται με αύξηση της λοιμογόνου δύναμης του Staphylococcus aureus

Το γενετικό του υλικό περιέχει πολλά μεταθετά στοιχεία DNA, όπως αλληλουχίες εισδοχής (Insertion sequences, IS), τρανσποζόνια, βακτηριοφάγους, νησίδια παθογονικότητας [5].

- Arginine Catabolic Mobile Element (ACME) 30,9 kb που απαντά στο *orfx* σημείο του γονιδιώματος, εκεί που βρίσκεται και η SCC*mec*. Σε μια συλλογή αναφοράς 214 στελεχών το ACME στοιχείο βρέθηκε μόνο στον SCC*mec*IVα USA 300 κλώνο και όχι στους ST80 ή στους USA400. Φαίνεται ότι προσδίδει ικανότητα επικράτησης (fitness) ειδικά στην επιτυχημένη ρινική φορεία και την παραμονή στο δέρμα. Περιέχει το γονίδιο *arcA* για την παραγωγή απαμινάσης της αργινίνης, που βρίσκεται και στον *S. pyogenes*. Το ένζυμο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μονοπυρήνων στο αίμα και αυξάνει την επιβίωση σε χαμηλό pH, όπως είναι το δέρμα και οι αποστηματικές κοιλότητες [4].

- Phenol Soluble Modulins (PSMs) [18,27]. Πρόκειται για μια οικογένεια μικρών αμφιπαθητικών πεπτιδίων, σχήματος α-έλικας με κυτταρολυτικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες, που ελέγχονται από το κεντρικό γονιδίωμα του μικροβίου. Ο *S. aureus* παράγει 7 PSMs, τις PSMα1-α4, PSMβ1, PSMβ2 και την δ-αιμολυσίνη. Οι PSM-α είναι μεγέθους 20-26 αμινοξέων και οι PSM-β μεγέθους 43-44 αμινοξέων. Έχουν πληθώρα δράσεων, προωθούν τη λύση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων μετά τη φαγοκύττωση, εμπλέκονται στις SSTIs και στη μικροβιαιμία αλλά και στο σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm). Η δράση τους ως επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) ευνοεί την επιβίωση του μικροβίου στα επιθήλια και την επιβίωση σε περιοχές με αυξημένη αναλογία ελαίου/ύδατος, όπως οι θύλακες τριχών και το δέρμα, ενώ ο έλεγχος της παραγωγής του με "quorum-sensing" από το οπερόνιο *agr* συνηγορεί για το σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του βακτηρίου. Παράγονται φυσιολογικά σε μεγάλες ποσότητες, ενώ έχει βρεθεί ότι τα CA-MRSA στελέχη έχουν μεγαλύτερη παραγωγή PSMs σε σχέση με τα HA-MRSA.

- Τα γονίδια *agr* (accessory gene regulator locus ή *agr* regulon), *sarA* και *sarRS*, που αναγνωρίστηκαν πρόσφατα στον κλώνο USA300 [ST8-scc4-PVL(+)], έχουν ρυθμιστική επίδραση στην παραγωγή τοξινών και λοιπών πρωτεϊνών λοιμογονικότητας. Το *agr* σύστημα αποτελείται από δύο μεταγραφικούς παράγοντες τους RNAII και RNAIII με τους εκκινητές τους P1 και P2. Ο RNAII κωδικοποιεί 4 γονίδια *agr*DBCA. Τα *agrD* και

agrB με μηχανισμό “quorum sensing” οδηγούν στην παραγωγή αυτοεκκινητή (AIP) που ρυθμίζει θετικά όλο το *agr* σύστημα. Τα *agrC* και *agrA* είναι διμερές κινάσης ιστιδίνης με ρυθμιστή της ενεργοποίησης. Το RNAIII ευθύνεται για την παραγωγή της δ-αιμολυσίνης και την αύξηση παραγωγής εξωπρωτεϊνών (λοιπές αιμολυσίνες, PVL, και εντεροτοξίνες), ενώ ενεργεί με αρνητική ρύθμιση στην παραγωγή πρωτεϊνών της προσκόλλησης (πρωτεΐνη Α και πρωτεΐνη συνδέουσα τη φιμπρονεκτίνη) [28]. Ο *agr* επίτοπος μεγέθους 3kb έχει υπερμεταβλητές και σταθερές περιοχές (υπάρχουν 4 υπότυποι). Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένοι *agr* τύποι συνδέονται με κάποιες κλινικές οντότητες. Επί παραδείγματι, τα περισσότερα στελέχη που παράγουν TSST-1 και PVL ανήκουν στον τύπο *agr*III, μέτρια ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στον τύπο *agr*II, ενώ στελέχη που παράγουν την ET-A επιδερμολυσίνη είναι τύπου *agr*IV [5]. Η ποσοτική έκφραση των γονιδίων αυτών (global regulators) προσδίδει αυξημένη λοιμογόνο δράση ή ικανότητα επικράτησης στον USA300. Το μοντέλο που στηρίζεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του παθογόνου από το *agr* σύστημα προτείνει ότι τα ελεύθερα σε διασπορά βακτήρια παράγουν κύρια προσκολλησίνες για την ευόδωση του αποικισμού, ενώ πυκνοί μικροβιακοί πληθυσμοί σε διάφορα επιθήλια παράγουν υδρολυτικά ένζυμα και τοξίνες για τη θρέψη και τη διαφυγή από τους ανοσιακούς μηχανισμούς του ξενιστή. Σε πειραματικά μοντέλα, απενεργοποίηση του *agr* συστήματος μειώνει την παθογονικότητα στην πρόκληση αποστήματος, όπου η παραγωγή τοξινών (PVL) θεωρείται απαραίτητη [28]. Σε μοντέλο ενδοκαρδίτιδας, που το σημαντικό είναι η προσκόλληση του μικροβίου στις βαλβίδες της καρδιάς η απενεργοποίηση του *agr* δεν είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παθογονικότητας [29]. Επίσης *agr* αρνητικά στελέχη έχουν αυξημένη ικανότητα δημιουργίας βιομεμβράνης, στην οποία το μικρόβιο καταπίπτει σε μια λανθάνουσα φάση μεταβολισμού, σε χρόνιες λοιμώξεις όπως χρόνια οστεομυελίτιδα και λοιμώξεις προσθετικών αρθρικών υλικών [5].

- Διαγονιδιακά RNAs (sRNAs)

Σημαντικό πεδίο έρευνας έχει αναπτυχθεί χάρη στα συστήματα αλληλούχισης του γονιδιώματος και βιοπληροφορικής με την ανακάλυψη των διαγονιδιακών RNAs (sRNAs), τα οποία φαίνονται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων είτε αρμονικής συμβίωσης είτε παθογονικότητας ως απάντηση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Το καλύτερα μελετημένο είναι το RNAIII στον *S. aureus*, που μέσω του *agr* συστήματος ρυθμίζει την πρώιμη έκφραση πρωτεϊνών επιφανείας και αργότερα τη σύνθεση εξωτοξινών. Είναι συμπληρωματικό με το mRNA στόχο ενώ το ίδιο φαίνεται ότι ρυθμίζει

και την παραγωγή δ-αιμολυσίνης. Σχεδόν όλες οι τοξίνες του μικροβίου βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του *agr* συστήματος, που δρα με μηχανισμό "quorum sensing" (ενεργοποίηση γονιδίων όταν ο μικροβιακός πληθυσμός ξεπεράσει ένα κρίσιμο όριο). Υπάρχει έλεγχος και στην παραγωγή εξωενζύμων (πρωτεάσες, λιπάσες, νουκλεάσες) και αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών που συνδέονται με κύτταρα του ξενιστή (surface binding proteins). Έτσι, είναι μειωμένος ο ρόλος του στην έναρξη της λοίμωξης τότε που ο μικροοργανισμός πρέπει να συνδεθεί και να αναπτυχθεί στις επιφάνειες των ιστών του ξενιστή με τη μεγάλη παραγωγή binding proteins (εκθετική φάση ανάπτυξης, exponential growth phase), ενώ όταν συμβεί και ο ξενιστής αντιδρά ανοσολογικά στο αυξημένο μικροβιακό φορτίο γίνεται κινητοποίηση των τοξινών μέσω του *agr* συστήματος (*agr* regulon) για την επίταση της φλεγμονής και την επιβίωση του μικροβίου (φάση στασιμότητας, stationary growth phase) [30]. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί 200-300 sRNAs στον *S. aureus*. Γενικά, η έκφραση τους ποικίλλει και είναι μέγιστη στην εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροβίου τότε που συνθέτει και τους λοιμογόνους του παράγοντες [2].

4. Τι είναι ο MRSA (methicillin-resistant Staphylococcus aureus);

Η μικροβιακή αντοχή είναι μεγάλο πρόβλημα στη θεραπεία των λοιμώξεων. Η υπερβολική χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών προκαλεί την επιλογή στελεχών ανθεκτικών σε μία ή περισσότερες τάξεις ή και σε όλα τα γνωστά μέχρι σήμερα αντιμικροβιακά (Multi Drug Resistant, Extra Drug Resistant και Pan Resistant στελέχη) [4]. Από την έναρξη χρήσης της πενικιλλίνης το 1940 μέχρι σήμερα, η ανάπτυξη διαφόρων μηχανισμών αντοχής του μικροοργανισμού έχει περιορίσει σημαντικά τον αριθμό των δραστικών αντιμικροβιακών ουσιών. Το 1942, εμφανίστηκε αντοχή στην πενικιλλίνη λόγω παραγωγής πενικιλλινάσης και το 1960, το 80% των στελεχών *S. aureus* ήταν ήδη ανθεκτικά στην πενικιλλίνη [31]. Η χρήση της μεθικιλλίνης, μιας ημισυνθετικής πενικιλλίνης ανθεκτικής στην πενικιλλινάση, από το 1959 οδήγησε σύντομα στην εμφάνιση νέου μηχανισμού αντοχής σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (methicillin resistant *S. aureus,* MRSA), προκαλώντας πρόβλημα κατά κύριο λόγο σε χώρους παροχής υγείας. Το πρώτο MRSA στέλεχος απομονώθηκε το 1961 στη Μ. Βρετανία (αρχαϊκός κλώνος, SCC*mec*I), στη συνέχεια το 1982 σε Ιαπωνία και Νέα Υόρκη (SCC*mec*II) και το 1983 στη Νέα Ζηλανδία (SCC*mec*III) [31]. Ο μηχανισμός της αντοχής αφορά στην τροποποίηση των πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (penicillin binding proteins, PBPs), που είναι τρανσπεπτιδάσες της εξωτερικής μεμβράνης του μικροργανισμού. Με την παραγωγή μιας νέας PBP2a, η οποία παρουσιάζει μικρή συγγένεια σύνδεσης με τα β-λακταμικά

αντιβιοτικά συνεχίζεται η σύνθεση πεπτιδογλυκάνης παρά την παρουσία του αντιβιοτικού. Υπεύθυνο για την αντοχή αυτή είναι η κινητή κασέτα Staphylococcal Chromosomal Cassette με το *mecA* γονίδιο (SCC*mec*) που ενσωματώνεται στο χρωμοσωματικό DNA στη θέση *orfx*. Πιθανότατα προέρχεται από στελέχη που δεν παράγουν πηκτάση (coagulase negative *staphylococci*, CNS) [31]. Εκτός του *mecA* έχουν βρεθεί και τα *mecB-E*, από τα οποία ενδιαφέρον παρουσιάζει το *mecC* (*mec*A_{LGA251}), που ανιχνεύτηκε σε ζώα εκτροφής στη Βόρεια Ευρώπη [32].

4.1 Επιδημιολογία και κλινικές εκδηλώσεις από CA-MRSA

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 90, οι MRSA λοιμώξεις ήταν περιορισμένες στους νοσοκομειακούς ασθενείς με προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως είναι οι ακραίες ηλικίες (υπερήλικες και νεογνά), οι χειρουργημένοι ή ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς (Hospital-Associated, HA-MRSA) [4]. Στις αρχές της δεκαετίας του 90 άρχισε να αυξάνεται σταδιακά η συχνότητα απομόνωσης στελεχών MRSA σε παιδιά των ΗΠΑ και της Δυτικής Αυστραλίας και στα τέλη της ίδιας δεκαετίας σημειώθηκε δραματική έξαρση των λοιμώξεων από MRSA σε πολλές χώρες (SCC*mec*IV κλώνος). Η πρώτη αναφορά θανατηφόρου πνευμονίας και σήψης σε παιδιά έγινε για την περίοδο 1997-1999 στις ΗΠΑ [33]. Το στέλεχος αυτό χαρακτηρίστηκε ως MW2 (USA400 στην PFGE). Σύντομα άρχισαν να εξαπλώνονται δραματικά στην κοινότητα συγγενικά στελέχη που ανήκαν στον USA300 κλώνο, που σταδιακά αντικατέστησε τον USA400 [4].

Τα τελευταία 20 χρόνια η εξάπλωση του MRSA είναι παγκόσμια, με εξαίρεση τις βόρειες χώρες (Ολλανδία και Σκανδιναβικές) λόγω της εξαιρετικής πολιτικής εκρίζωσης (search and destroy policy) στους νοσοκομειακούς ασθενείς και στην ορθή και συνετή χρήση αντιμικροβιακών ουσιών [4,34]. Πολλές από τις MRSA - λοιμώξεις αφορούσαν σε υγιείς ενηλίκους και παιδιά στην κοινότητα χωρίς προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομείο ή σχέση με χώρους παροχής υγείας. Οι περισσότερες ήσαν SSTIs, συχνά με σχηματισμό αποστήματος, και κάποιες βαρύτερες όπως νεκρωτική πνευμονία, πυομυοσίτιδα, κυτταρίτιδα, αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, σήψη και σύνδρομο τοξικής καταπληξίας [4]. Τα υπεύθυνα στελέχη ονομάστηκαν MRSA της κοινότητας (Community-Associated, CA-MRSA) δηλώνοντας έτσι τη διαφορετικότητα τους (σε επιδημιολογικό, κλινικό, μοριακό επίπεδο όπως και στο φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά) σε σχέση με

τα ήδη γνωστά νοσοκομειακά στελέχη (HA-MRSA) [4]. Το CDC έχει ορίσει με τα χαρακτηριστικά των έξι «C» τους παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση του μικροβίου: "contact, cleanliness, compromised skin integrity, contaminated objects, crowded living conditions και capsules" (χρήση αντιβιοτικών) [35]. Πληθυσμιακές ομάδες με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης είναι οι τρόφιμοι φυλακών, ομοφυλόφιλοι άνδρες, αθλητές σε αθλήματα επαφής (πχ rugby και πολεμικές τέχνες), εθνικές μειονότητες (όπως Roma στην Ελλάδα), άλλοι πληθυσμοί με χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, κτηνίατροι και άνθρωποι που εργάζονται με ζώα, ασθενείς με κυστική ίνωση ή HIV λοίμωξη και τα παιδιά [4].

Σε ομοφωνία (CDC 2000) ένα στέλεχος MRSA ορίζεται ότι προέρχεται από την κοινότητα (CA-MRSA), όταν απομονώνεται σε άτομο εκτός νοσηλευτικού ιδρύματος ή τις πρώτες 48 ώρες μετά από εισαγωγή σε αυτό. Δεν πρέπει επίσης να υπάρχει ιστορικό MRSA λοίμωξης ή αποικισμού ή νοσηλεία σε νοσοκομείο, οίκο φροντίδας ηλικιωμένων ή μονάδα τεχνητού νεφρού κατά το τελευταίο έτος. Επίσης πρέπει να μη φέρει μόνιμους καθετήρες ή συσκευές που διασπούν το φραγμό του δέρματος [36].

Η Ελλάδα κατατάσσεται μεταξύ των χωρών με τις μεγαλύτερες συχνότητες απομόνωσης MRSA στην Ευρώπη [35]. Το 2007 και το 2012, τα αντίστοιχα ποσοστά των διεισδυτικών λοιμώξεων από MRSA ήταν 48% και 40%. [37]. Συχνότερος είναι ο ευρωπαϊκός κλώνος ST80-*mecIV* PVL(+) MRSA, που επικρατεί και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (Αυστρία, Γαλλία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Ιταλία, Ελβετία, Ολλανδία, Γερμανία, Φιλανδία) με τον χαρακτηριστικό φαινότυπο αντοχής σε φουσιδικό οξύ, τετρακυκλίνη και καναμυκίνη [2,35,38]. Πρόσφατα έχει περιγραφεί και ο ST377-SCC*mecV* σε Λάρισα και Πάτρα [39,40]. Κατά τα έτη 2001-2003 τα PVL θετικά στελέχη ήταν το 55% των MRSA στα ελληνικά νοσοκομεία [39]. Το ποσοστό αυτό συγκρίνεται με το αντίστοιχο στις ΗΠΑ [4].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι παρά τη μεγάλη αύξηση των λοιμώξεων από MRSA στην κοινότητα, τα ποσοστά ρινικής φορείας παρέμειναν χαμηλά (<1%), με εξαίρεση ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες (τρόφιμοι φυλακών, Roma, χρήστες ουσιών) [4].

4.2 Διαφοροποίηση μεταξύ CA-MRSA και HA-MRSA

Τελευταία, έχουν προταθεί επιπλέον ορισμοί που αφορούν σε λοίμωξη κατά τη διάρκεια νοσηλείας σε χώρο παροχής υπηρεσιών υγείας (HA-MRSA, healthcare associated), όπως HO-MRSA (hospital onset) τουλάχιστον μετά τις 48 πρώτες ώρες από την εισαγωγή και HACO-MRSA (healthcare associated community onset), όταν ο ασθενής εμφανίζει λοίμωξη ενώ παρακολουθείται σε εξωτερική βάση σε νοσοκομείο (πχ μονάδα

τεχνητού νεφρού). Ο ευρύτερος όρος CO-MRSA (community–onset) περιλαμβάνει και τις CA-MRSA και τις HACO-MRSA λοιμώξεις [41].

Τρείς γονοτυπικοί δείκτες διαχωρίζουν τους CA-MRSA με τους HA-MRSA: η γενετική τους προέλευση, η αρχιτεκτονική της γονιδιακής κασέτας που φέρει το μηχανισμό αντοχής στη μεθικιλλίνη και η παρουσία της PVL τοξίνης. Το *mecA* γονίδιο ευθύνεται για την αντοχή στη μεθικιλλίνη με τη σύνθεση της PBP2a. Βρίσκεται στη χρωμοσωμική κασέτα SCC*mec* του *S. aureus*. Οι HA-MRSA φέρουν τις μεγάλου τύπου κασέτες SCC*mec* I, II, III (34-67kb). Οι CA-MRSA φέρουν μικρότερου μεγέθους κασέτες, την SCC*mec*IV συνήθως (24kb) ή την SSC*mec*V. Το μεγαλύτερο μέγεθος των II και III κασετών μπορεί να φέρει περαιτέρω γονίδια αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά, όπως γενταμικίνη, κινολόνες, μακρολίδες. Γι' αυτό, ένα στέλεχος MRSA με αντοχή στη γενταμικίνη ή τη σιπροφλοξασίνη χαρακτηρίζεται φαινοτυπικά στο εργαστήριο ως HA-MRSA στέλεχος. Ο τύπος IV συνδέεται με την ύπαρξη του βακτηριοφάγου phiSLT που φέρει τα γονίδια της PVL [2].

5. Μοριακές τεχνικές για την τυποποίηση του Staphylococcus aureus

Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE, pulsed field gel electrophoresis) [42]**:** Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όταν τα ηλεκτροφορούμενα τμήματα του DNA δεν μπορούν λόγω πολύ μεγάλου μεγέθους να διαχωριστούν σε απλή ηλεκτροφόρηση. Ολόκληρα χρωμοσώματα αλλά και μεγάλα μικροβιακά κομμάτια DNA, που προκύπτουν μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι τέτοιες περιπτώσεις. Η PFGE δυσκολότερη μέθοδος από μία απλή ηλεκτροφόρηση, παράγει 5-20 διακριτές ζώνες (bands) μεγέθους 10-800 χιλιάδων kbp. Είναι εξαιρετική μέθοδος για την επιδημιολογική διερεύνηση παθογογόνων βακτηρίων, που βρίσκει εφαρμογή και σε σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Οι ζώνες είναι σχετικά απλές και εύκολα συγκρίσιμες μεταξύ των στελεχών με πέψη του χρωμοσωματικού DNA με περιοριστικό ένζυμο *Sma*I και ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη [31]. Όταν χρωμόσωμα σταφυλοκόκκου, μεγέθους 2.800 Kb περίπου και περιεκτικότητας 34% σε G+C, πέπτεται με το περιοριστικό ένζυμο *Sma*I (το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία CCCGGG), η ανάλυση με PFGE έχει ως προϊόν 15-20 πολύ καλά διαχωρισμένα θραύσματα μεγέθους από 10 έως 800 Kb. Σύμφωνα με τα κριτήρια του Tenover, στελέχη με το ίδιο αποτύπωμα στην PFGE ανήκουν στον ίδιο

κλώνο, ενώ διαφορά σε 1-3 ζώνες υποδηλώνει στενή συγγένεια. Πάνω από έξι διαφορές στο μοριακό αποτύπωμα της PFGE σημαίνει ότι τα στελέχη δεν είναι γενετικά συγγενή [43]. Η PFGE είναι από τις κύριες μοριακές μεθόδους για την τυποποίηση βακτηριακών κλώνων σε επιδημικές εξάρσεις. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε επιδημιολογικές μελέτες λόγω της υψηλής διακριτικής της ικανότητας, του σχετικά χαμηλού κόστους και της επαναληψιμότητας μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Ένα άλλο πλεονέκτημα της PFGE είναι ότι ελέγχει ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος (>90%). Επομένως, εισαγωγή ή εξάλειψη μεταθετών γενετικών στοιχείων και ανασυνδυασμοί του γενετικού υλικού μπορούν να εντοπιστούν, καθώς έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στο αποτύπωμα της PFGE. Περιορισμοί της μεθόδου είναι ο απαιτούμενος ακριβός εξοπλισμός και η χρονοβόρα διαδικασία, καθώς η προετοιμασία του DNA, ο εγκλεισμός του σε δίσκους αγαρόζης, η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο και η ηλεκτροφόρηση διαρκούν έξι ημέρες. Επιπλέον, η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, καθώς δεν μπορεί να γίνει σύγκριση αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών και συσχέτιση των κλώνων. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι ως ένα βαθμό υποκειμενική.

Τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχησης (multi locus sequencing typing, MLST) [42]: Είναι μία τεχνική με μεγάλη επιδημιολογική εφαρμογή που στηρίζεται στην αρχή τυποποίησης βάσης των διαφορών σε αριθμό επιλεγμένων γενετικών τόπων (loci). Αλληλουχίες 7-10 διατηρημένων μεταβολικών γονιδίων (housekeeping genes) μεγέθους 450 ζευγών βάσεων ενισχύονται με PCR και ακολουθεί αλληλούχηση. Κάθε εξεταζόμενο στέλεχος εμφανίζει το δικό του αλληλικό προφίλ, το οποίο στη συνέχεια συγκρίνεται με πρότυπες αλληλικές φόρμες (patterns) για την ταυτοποίηση και τυποποίηση του παθογόνου. Αποτελεί την πλέον αναγνωρισμένη σήμερα μέθοδο διερεύνησης της κλωνικής εξέλιξης του MRSA (strain relatedness). Κάθε στέλεχος τυποποιείται με βάση τα αλλήλια των 7 διατηρημένων γονίδιων του *S. aureus* (*arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi, yqiL*). Κλωνικές ομάδες (clonal complexes CCs) εμφανίζονται, με στελέχη να ανήκουν στην ίδια ομάδα, όταν 5 από τα 7 housekeeping genes έχουν κοινή αλληλουχία [31].

Τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης Α (*spa* typing) [2]: Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλούχηση ενός τμήματος μεταβλητού μεγέθους (100-400bp) του γονιδίου της πρωτεΐνης Α. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή Χ και διαφέρει σε ποικίλο αριθμό (3-17) επαναλαμβανομένων

αλληλουχιών μήκους 24bp. Η διακριτική της ικανότητα βρίσκεται ανάμεσα στην MLST και την PFGE. Δηλαδή μπορεί σε έναν ST τύπο να ανήκουν περισσότεροι spa τύποι, και διαφορετικοί ST τύποι να ανήκουν στο ίδιο clonal complex (CC) στην PFGE [31].

Παρακάτω φαίνονται συνοπτικά οι βασικές ιδιότητες των μεθόδων μοριακής τυποποίησης του *S. aureus* [37].

Μέθοδος	**Αρχή / Στόχος**	**Δυνατά σημεία**	**Αδυναμίες**
MLST	Αλληλούχηση των housekeeping γονιδίων	- Φυλογενετική δομή του πυρηνικού γενώματος - Διεργαστηριακότητα μεθόδου	-Περιορισμένη διακριτική ικανότητα -Μικρός όγκος δεδομένων -Κόστος
PGFE	Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού (*Sma*I)	- Υψηλή διακριτική ικανότητα	-Τεχνικά απαιτητική -Βραδεία /χρονοβόρα -Περιορισμένη διεργαστηριακότητα
Spa-typing	Αλληλούχηση μεταβλητού τμήματος του γονιδίου της πρωτεΐνης Α	- Ταχύτητα - Απόδοση μεγάλου όγκου δεδομένων - Σταθερή ονοματολογία - Διεργαστηριακότητα - Χρήση αλγορίθμου BURP	-Μέτρια διακριτική ικανότητα -Λανθασμένη ταυτοποίηση τύπων STs λόγω ανασυνδιασμών
Rep-PCR typing	Πολυμορφισμοί χρωμοσωμικών διεπαναλαμβανόμενων διαστημάτων	- Ταχύτητα - Απόδοση μεγάλου όγκου δεδομένων	-Περιορισμένη διακριτική ικανότητα -Χωρίς σταθερή ονοματολογία -Χωρίς επικυρωμένα κριτήρια ερμηνείας

Πολυτοπική VNTR (Variable number of tandem DNA repeat) ανάλυση (MLVA)	Πολυμορφισμοί σε χρωμοσωμικά VNTR στοιχεία	-Ταχύτητα -Απόδοση μεγάλου όγκου δεδομένων	-Περιορισμένη διακριτική ικανότητα -Χωρίς σταθερή ονοματολογία -Χωρίς επικυρωμένα κριτήρια ερμηνείας

Ταυτοποίηση του SCC*mec* τύπου στελεχών MRSA: Γίνεται με multiplex-PCR. Υπάρχουν 11 SCC*mec* τύποι (I με XI και V_T) στελεχών MRSA. Από αυτούς οι I, II, III (34-67kb) απαντώνται στα HA- MRSA στελέχη και είναι μεγαλύτερου μεγέθους. Ο τύπος IV (<30kb) κυριαρχεί στον CA-MRSA και γενικά δεν φέρει γονίδια αντοχής σε αμινογλυκοσίδες και κινολόνες. Είναι αυτός που επικρατεί στα παιδιά της χώρα μας [44]. Ο τύπος V έχει βρεθεί κύρια σε Αυστραλία και Ταϊβάν [4] και σποραδικά στην Ελλάδα. [40] Οι τύποι IV και V είναι πολύ κινητοί, έτσι μεταφέρονται στην κοινότητα από φορείς σε άλλα άτομα ή με μεταφορά των στοιχείων από MRSA σε MSSA ή από πηκτάση αρνητικούς σταφυλοκόκκους σε MSSA [4]. Παγκοσμίως τα στελέχη MRSA διαφέρουν ως προς τους τύπους SCC*mec*, PFGE, *spa* και στους κλώνους που ταυτοποιούνται με MLST. Στην Ευρώπη επικρατεί ο ST80 κλώνος, που χαρακτηρίζεται από αντοχή σε φουσιδικό οξύ, καναμυκίνη και τετρακυκλίνη. Στις ΗΠΑ συνηθέστερος MLST τύπος είναι ο USA300/ST8 (και οι ST1 και ST59), ενώ ο ST30 είναι ο κλώνος Αυστραλίας και Νότιας Αμερικής [4,35].

Τέλος, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση του *S. aureus,* όπως οι MLVA (multi-locus variable number tandem repeat analysis), RAPD (Random amplification of polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), οι μικροσυστοιχίες (microarrays) και Genome sequencing. Οι τρεις πρώτες είναι πιο οικονομικές από τις κλασικές, ολοκληρώνονται σε μικρότερο χρόνο και δίνουν πληροφορίες για την κλωνική συγγένεια σε επιδημικές εξάρσεις [2]. Οι δύο τελευταίες είναι γενωμικές εφαρμογές. Με συνδυασμό περισσότερων μεθόδων αυξάνεται η ικανότητα γονοτυπικής διάκρισης των στελεχών.

Ανίχνευση γονιδίων λοιμογόνων παραγόντων, γονίδιων αντοχής και *agr* locus.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η μέθοδος έφερε επανάσταση στη Μοριακή Γενετική δίνοντας καινούργιες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων. Πρωτοπεριγράφηκε από την Karry Mullis το 1983 και συνίσταται στη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με μια ενζυμική αντίδραση πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο ολιγονουκλεοτίδια in vitro. Τα δύο αυτά ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers) για μια σειρά συνθετικών αντιδράσεων που καταλύονται από την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές έχουν διαφορετικές αλληλουχίες, οι οποίες είναι συμπληρωματικές των αλληλουχιών οι οποίες βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες δίκλωνου μορίου DNA. Η αντίδραση συνήθως περιλαμβάνει 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους [45]. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αρχικά το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως 94ºC-96ºC) υπό την παρουσία περίσσειας από κάθε ένα από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers) και τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων, (dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

2. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε μια θερμοκρασία που επιτρέπει την πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς ακολουθίες (primer annealing).

3. Οι αναδιαταγμένοι εκκινητές προεκτείνονται με την δράση της DNA πολυμεράσης συμπληρωματικά με την μία αλυσίδα του DNA στόχου με κατεύθυνση 5'→3' (elongation), συνήθως στους 72ºC

Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και της σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου λειτουργούν ως μητρικά τμήματα για τα επόμενα, κάθε κύκλος διπλασιάζει το ποσό του επιθυμητού προϊόντος του DNA. Το τελικό προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα διπλής έλικας DNA του οποίου το τελευταίο άκρο ορίζεται από το ΄5- τελικό άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του είναι η απόσταση ανάμεσα στους εκκινητές. Αφού σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται το ποσό του επιθυμητού προϊόντος του DNA, μετά από κύκλους η ποσότητα του τελικού προϊόντος είναι 2ν. Όταν η απόδοση του συστήματος είναι 100%, η ποσότητα του επιθυμητού DNA μετά από 25-30 κύκλους θα αυξηθεί κατά 33.6 εκατομμύρια έως 1 δισεκατομμύριο φορές περίπου, αντίστοιχα. Στην πραγματικότητα

όμως, λόγω της προοδευτικής μείωσης της δραστικότητας του ενζύμου και άλλων παραγόντων, η απόδοση του συστήματος είναι μικρότερη.

Κάθε στάδιο του κύκλου της αντίδρασης ξεκινά όταν επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες το ποσοστό αποτυχίας σύνδεσης των εκκινητών αυξάνεται σημαντικά, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες αυξάνεται μεν η ειδικότητα της σύνδεσης των εκκινητών, ενώ η όλη απόδοση μειώνεται. Ο συνολικός αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων DNA στο αρχικό μίγμα. Συνήθως 25-35 κύκλοι είναι αρκετοί για την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας του επιθυμητού προϊόντος.

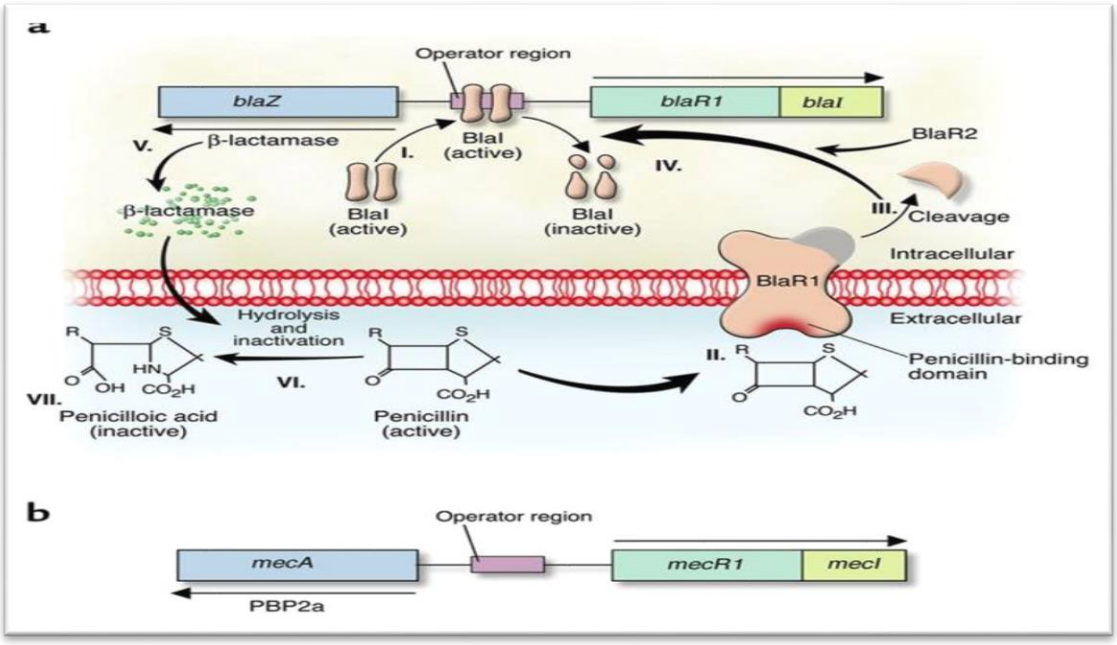
6. Αντιβιοτικά και μηχανισμοί αντοχής του Staphylococcus aureus

β-λακταμικά και η αντοχή στη μεθικιλλίνη

Τα β-λακταμικά περιλαμβάνουν τις πενικιλλίνες και τους συνδυασμούς αυτών με αναστολείς, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες, και πενέμες. Μέσω του β-λακταμικού δακτυλίου (χημικό ανάλογο του D-ala–D-ala) συνδέονται με τις PBPs στο στάδιο της τρανσπεπτιδίωσης, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και το μικρόβιο να αυτολύεται [5]. Ο *S. aureus* έχει 3 μεγάλου μοριακού βάρους PBPs (PBP1, PBP2, PBP3) και μία μικρού μοριακού βάρους (PBP4) [16]. Ο μικροοργανισμός έχει δύο τρόπους να αμυνθεί στο β-λακταμικό αντιβιοτικό: να *αδρανοποιήσει* την πενικιλλίνη με την παραγωγή ενζύμου (πενικιλλινάσης) ή να *τροποποιήσει* το στόχο του αντιβιοτικού (PBPs). Τα β-λακταμικά αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το *blaz* γονίδιο υπεύθυνο για την παραγωγή β-λακταμάσης βρίσκεται συνήθως σε πλασμίδιο και η έκφραση του επάγεται από την παρουσία πενικιλλίνης, ενώ απαραίτητα για αυτήν είναι τα ρυθμιστικά γονίδια *blaRI* και *blaI*. Η πενικιλλινάση μετατρέπει την πενικιλλίνη σε ανενεργό πενικιλλοϊκό οξύ. Παραγωγή πενικιλλινάσης συνεπάγεται αντοχή και σε αμπικιλλίνη, αμοξυκιλλίνη και ευαισθησία στους συνδυασμούς τους με αναστολείς (εικόνα 3) [46].

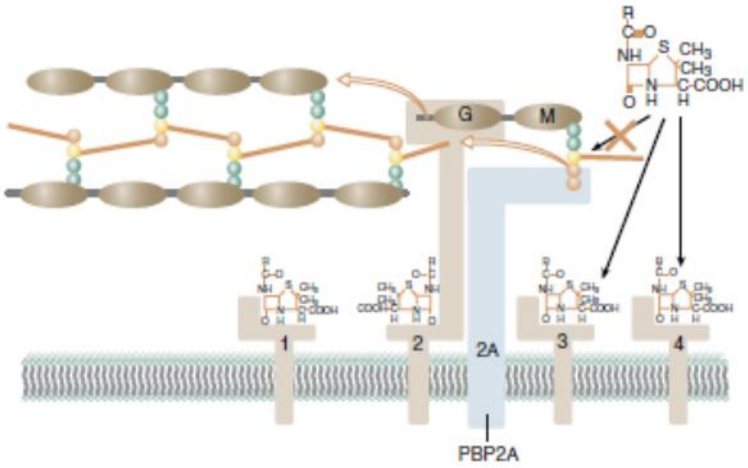
Εικόνα 3: α) Μηχανισμός αντοχής στην πενικιλλίνη β) σταφυλοκοκκική κασέτα SCC*mec*

Nature Review Microbiology 7, 629-641, Sep 2009 [46]



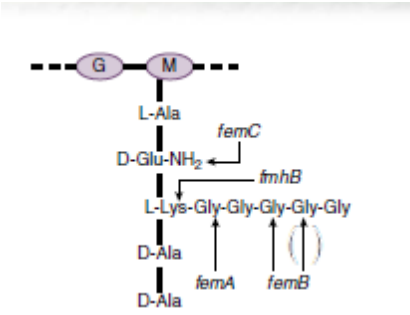
Όπως αναφέρθηκε στην περιγραφή του MRSA, η σύνθεση μιας νέας PBP, της PBP2a ή PBP2' έχει ως συνέπεια την αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αυτή έχει μόνο δράση τρανσπεπτιδάσης και όχι τρανσγλυκοσιδάσης (εικόνα 4).

Εικόνα 4: Μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά – PBP2a [5]



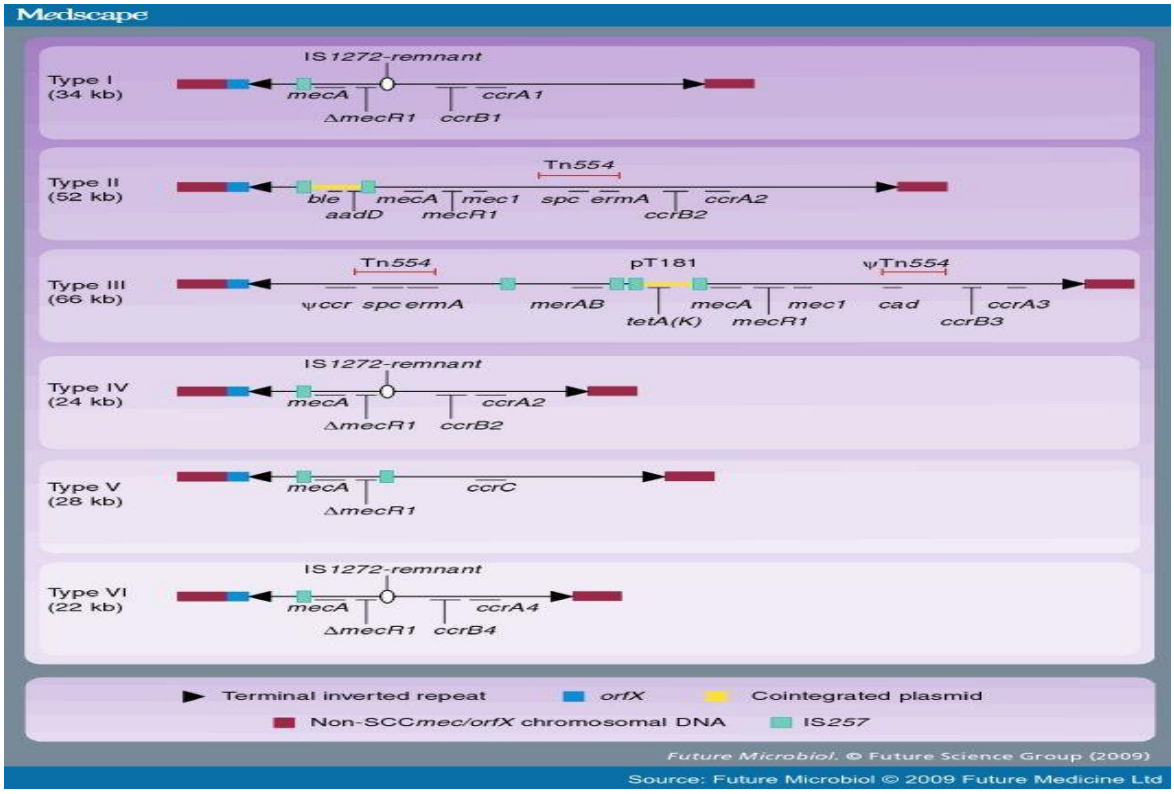
Για να είναι όμως λειτουργική η PBP2a πρέπει στη λυσίνη της L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala να συνδέεται μια πλευρική αλυσίδα πενταγλυκίνης και το γλουταμικό να είναι αμινωμένο. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από πολλά (>14) επικουρικά γονίδια (accessory genes), με πιο σημαντικά τα *femABC* και *fmhB*. Αλλαγή σε αυτά τα γονίδια μειώνει το επίπεδο αντοχής στη μεθικιλλίνη, παρά την παρουσία της PBP2a [5]. Οι νέες κεφαλοσπορίνες 5ης γενιάς με anti-MRSA δράση (κεφταρολίνη και κεφτοβιπρόλη) έχουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την PBP2a [5].

Το *mecA* γονίδιο ρυθμίζεται από τον καταστολέα MecI και τον διαμεμβρανικό ανιχνευτή β-λακτάμης και μεταγωγέα σήματος MecRI (εικόνα 3β). Σε απουσία β-λακταμικού ο MecI καταστέλλει τη μεταγραφή των *mecA* και *MecRI-mecI*. Σε παρουσία β-λακταμικού ο MecRI αυτοκαταλύεται και μένει υπόλοιπο ενεργοποιημένο που καταλύει τη διάσπαση του MecI με αποτέλεσμα την απώλεια αρνητικού ελέγχου και ενεργοποίηση του *mecA* προς παραγωγή PBP2a [31].



Ως σήμερα έχουν βρεθεί 11 τύποι SCC*mec* (I-XI) από 20,9 ως 66,9 kb [5]. Η SCC*mec*, περιέχει και τις ρεκομπινάσες *ccr* για την ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα, διαφορετικές για κάθε τύπο SCC*mec*. Η κασέτα μπορεί να φέρει επιπλέον γονίδια αντοχής στα ενσωματωμένα πλασμίδια pUB110 [αντοχή σε καναμυκίνη, τομπραμυκίνη, μπλεομυκίνη-ant(4')], pI258 (αντοχή σε πενικιλλίνη και βαρέα μέταλλα), pT181 (αντοχή σε τετρακυκλίνη) και το τρανσποζόνιο Tn554 (φέρει το *ermA* για την επαγώγιμη αντοχή σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες, στρεπτογραμμίνες) [31]. Ο κλώνος που έχει επικρατήσει στις ΗΠΑ και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα στην κοινότητα, ο USA300/ST8 έχει αποκτήσει και το στοιχείο ACME (arginine catabolic mobile element) στο SCC*mec*IV, που του προσδίδει ικανότητα παραμονής στο δέρμα και σε όξινο περιβάλλον για περισσότερο χρόνο (fitness benefit). Αποκτήθηκε από στελέχη *S. epidermidis* όπου υπάρχει σε μεγάλη συχνότητα. Βέβαια ο *S. aureus* φέρει γονίδια αντοχής και εκτός της SCC*mec*, σε άλλες θέσεις του χρωμοσώματος ή σε πλασμίδια (εικόνα 5) [47].

Εικόνα 5: Αντιπροσωπευτικές σταφυλοκοκκικές κασέτες *SCCmec* [47]



Γλυκοπεπτίδια

Τα γλυκοπεπτίδια βανκομυκίνη (VAN) και τεϊκοπλανίνη (TEC) μπήκαν σε χρήση από το 1958 το πρώτο και το 1978 το δεύτερο. Δρουν στην τελευταία φάση βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, στον πολυμερισμό της πεπτιδογλυκάνης (cross linking) συνδεόμενα με το τελικό D-ala-D-ala του πενταπεπτιδίου του NAMA. Η σύνθεση αυτή λαμβάνει χώρα στην περιοχή του διαφράγματος διαχωρισμού, που δημιουργείται μεταξύ μητρικού και θυγατρικού κυττάρου κατά την κυτταρική διαίρεση. Στελέχη με αυξημένα ποσά D-ala-D-ala στην εξωτερική τους επιφάνεια δεσμεύουν τα γλυκοπεπτίδια και δεν τα αφήνουν να φτάσουν εσωτερικά στην περιοχή πολυμερισμού στο διάφραγμα διαχωρισμού. Συνοδές μεταβολές είναι: πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος, μειωμένη αυτόλυση, παραγωγή πρωτεΐνης A, αυξημένη παραγωγή πολυσακχαριδικής κάψουλας, προσθήκη αλανίνης στο τειχοϊκό οξύ και μείωση δραστικότητας του *agr* οπερονίου [48]. Έτσι παρατηρείται αυξημένη MIC στα αντιβιοτικά αυτά. Ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του ‘80 εμφανίστηκαν στελέχη *S. epidermidis* με μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτίδια. Το πρώτο στέλεχος *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία (MIC=8mg/l) στην VAN (VISA, Vancomycin Intermediate *S. aureus*) απομονώθηκε το 1997 στην Ιαπωνία (Mu50). Ακολούθησαν αναφορές από άλλες χώρες σε ασθενείς μετά από παρατεταμένη χορήγηση

VAN, ξένα σώματα, νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια έλκη ή μεγάλες επεμβάσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα από τα VISA στελέχη δεν είναι φορείς των *van* γονιδίων των εντεροκόκκων. Το CLSI ορίζει σαν VISA, στελέχη με MIC=4-8 mg/l και προτείνει κάθε στέλεχος με MIC≥8mg/l να αποστέλλεται σε εργαστήριο αναφοράς [49].

Κλινικά στελέχη *S. aureus* VAN^R με MIC=32-1024mg/l (**VRSA**, Vancomycin Resistant *S. aureus*), τα οποία φέρουν το *vanA* γονίδιο έχουν περιγραφεί συνολικά 12 από το 2002 μέχρι το 20102, τα εννέα στο Νοτιοανατολικό Michigan [50]. Τα περισσότερα ήταν MRSA USA100/SCC*mec*II (CC5) νοσοκομειακά στελέχη [48]. Το *vanA* γονίδιο μεταφέρεται οριζόντια με το τρανσποζόνιο Tn1546 από στελέχη *Enterococcus faecalis* μέσω του συζευκτικού πλασμιδίου Inc18. Ο CC5 κλώνος είναι ιστορικά από τους πρώτους που απέκτησαν την SCC*mec* κασέτα αντοχής στην οξακιλλίνη (1960) και τώρα το *vanA* γονίδιο, καθιστώντας τον ένα κλώνο που γενετικά ή βιολογικά ευκολότερα αποκτά οριζοντίως γονίδια αντοχής σε διάφορα αντιβιοτικά [50]. Η σχετικά συχνή συνύπαρξη VRE με *S. aureus* στον ίδιο άρρωστο και η αποδεδειγμένη πειραματικά οριζόντια μεταφορά της αντοχής από τον πρώτο στον δεύτερο κάνουν μάλλον απίθανη την εξαφάνιση των VRSA στελεχών. Η χρήση του δίσκου VAN 30μg ανιχνεύει φαινοτυπικά την ύπαρξη του *vanA* γονιδίου με πλήρη εξάλειψη της ζώνης αναστολής (ζώνη=6mm) και είναι η μόνη ένδειξη χρήσης του δίσκου κατά το CLSI [49].

Συχνότερα είναι τα στελέχη με ετεροαντοχή (hVISA ή hGISA στελέχη), δηλαδή υποπληθυσμοί (1 μικρόβιο σε 10^{-6}) που αναπτύσσονται σε άγαρ με VAN 2mg/l, και τα οποία εμφανίζουν μέτρια ευαισθησία στα γλυκοπεπτίδια [48]. Παλαιότερα ο ορισμός αφορούσε στελέχη με MIC_{VAN} ≥4mg/l, αλλά με την αλλαγή του ορίου ευαισθησίας στα 2mg/l, οποιοσδήποτε υποπληθυσμός *S. aureus* ανιχνεύεται με MIC_{VAN} 4-8mg/l, εντός πληθυσμού ευαίσθητου στα γλυκοπεπτίδια θεωρείται ετεροανθεκτικός [48]. Παράγωγα στελέχη *S. aureus* με 4-8 φορές μεγαλύτερη MIC_{VAN} έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριο με διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε περιβάλλον αυξημένων συγκεντρώσεων VAN, τα οποία έχουν παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα. Αλλά και κλινικά στελέχη VISA έχουν βρεθεί με παχύτερο τοίχωμα και αυξημένο ποσό D-ala-D-ala, λόγω αυξημένης σύνθεσης πρόδρομης πεπτιδογλυκάνης ή μειωμένου μεταβολισμού του κυτταρικού τοιχώματος [51]. Λόγω της περίσσειας D-ala-D-ala τα γλυκοπεπτίδια παγιδεύονται στο σημείο αυτό και αδυνατούν να πλησιάσουν την κυτταρική μεμβράνη. Εκτός από παχύτερα τα στελέχη αυτά έχουν μειωμένη παραγωγή PBP4 και μεταβολές στα τειχοϊκά οξέα του τοιχώματος. Συνήθως εμφανίζουν MIC_{TEC}>8mg/l [51]. Δεν υπάρχει ένας γενετικός μηχανισμός για την εκδήλωση

του φαινοτύπου, αλλά μάλλον αλλαγές του μεταβολισμού του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγούν σε έναν ασταθή φαινότυπο, ο οποίος χρειάζεται την παρουσία VAN για να διατηρηθεί. Σημαντικό για την επιβίωση και την εκδήλωση λοιμογόνου ικανότητας είναι το οπερόνιο *agr* (accessory gene regulator) με 4 τύπους. Ο ΙΙ τύπος επικρατεί στα VISA στελέχη και σε λοιμώξεις από MRSA με θεραπευτική αποτυχία στην VAN. Σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί απώλεια λειτουργικότητας του *agr* συστήματος, με συνέπεια τη μείωση παραγωγής εξωτοξινών, αύξηση παραγωγής προσκολλητικών μορίων σε επιφάνειες και ιστούς (καθετήρες / προσθετικές αρθρώσεις), αυξημένη αυτόλυση, μειωμένη παραγωγή δ-αιμολυσίνης και σχηματισμό παχύτερου κυτταρικού τοιχώματος [52].

Τα **hVISA/VISA** στελέχη δεν ανιχνεύονται με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων, η VAN λόγω μεγάλου μεγέθους του μορίου της δεν διαχέεται καλά στο άγαρ. Οι συμβατικές μέθοδοι ευαισθησίας αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν τα ετεροανθεκτικά στελέχη λόγω της μικρής συγκέντρωσης τους στο μικροβιακό εναιώρημα και της σχετικά περιορισμένης ανάπτυξης στο Mueller Hinton (ΜΗ) άγαρ. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι ανίχνευσης [53,54].

- Η πληθυσμιακή ανάλυση (population analysis under the curve, PAP-AUC), ως μέθοδος αναφοράς (μέτρηση επιβιώντων μικροβίων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις VAN με καθορισμένο πρωτόκολλο εργασίας σε κέντρο αναφοράς, κοπιώδης και ακριβή μέθοδος).
- Η μακρομέθοδος Etest® στην οποία γίνεται εμβολιασμός 100μl εναιωρήματος McFarland 2 σε Brain Heart Infusion άγαρ (BHIA) και ανάγνωση του αποτελέσματος μετά από 24 και 48ώρες επώασης στους 35^{o}C. Ετεροανθεκτικότητα διαπιστώνεται όταν οι $MIC_{VAN, TEC}$ είναι >8μg/ml ή όταν μόνο η MIC_{TEC} >12 μg/ml.
- Το διπλό Etest® (Glycopeptide-Resistance Detection strip-GRD) με εναιώρημα 0,5 McFarland σε ΜΗ άγαρ με 5% αίμα προβάτου και ανάγνωση σε 24 και 48 ώρες. Ετεροανθεκτικότητα διαπιστώνεται όταν έχουμε MIC≥8μg/ml στην VAN ή/και TEC [55].
- Εμβολιασμός 10μl εναιωρήματος McFarland 2 σε ΜΗ άγαρ που περιέχει TEC 5μg/ml (ΜΗ-Teico). Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η ανάπτυξη ≥1 cfu μετά από ανάγνωση σε 48 ώρες.
- Χρήση ΒΗΙ άγαρ με προσθήκη VAN 4μg/ml και προσθήκη παγκρεατικού εκχυλίσματος καζεΐνης 16g/l (0,5 και 2 McFarland), που φαίνεται ότι βοηθά την ανάπτυξη αυτών των δύσκολων στελεχών, που έτσι κι' αλλιώς αναπτύσσουν μικρότερες αποικίες από τον κύριο κλώνο.

Η συχνότητα των ετεροανθεκτικών στελεχών σε λοιμώξεις από MRSA ποικίλλουν από 1,3 ως 27%. Φαίνεται ότι ευθύνονται για αποτυχία θεραπείας με VAN (μεγαλύτερη διάρκεια πυρετού και βακτηριαιμίας) [16]. Θεωρείται ότι επιλέγονται σε περιβάλλοντα με αυξημένη χρήση VAN και πολλές μελέτες έχουν δείξει τελευταία μία διαχρονική άνοδο της MIC του *S. aureus* στην VAN (>1,5 mg/l ="MIC creep") [51] γεγονός που θεωρείται και ο προθάλαμος για την ανάπτυξη του hVISA/VISA φαινοτύπου. Σημειώνεται ότι ο άνθρωπος είναι η βασική δεξαμενή των hVISA/VISA στελεχών [51].

Μακρολίδες, λινκοσαμίδες, στρεπτογραμμίνες [5]

Είναι βακτηριοστατικά αντιβιοτικά που συνδέονται στην 50S θέση του ριβοσώματος. Οι βασικοί μηχανισμοί αντοχής που παρατηρούνται είναι οι παρακάτω:

- Η αντλία εκροής των μακρολίδων με 14μελή και 15μελή δακτύλιο. Ελέγχεται από το γονίδιο *msrA* (macrolide streptogramin resistance), επιφέρει επαγώγιμη αντοχή στη στρεπτογραμμίνη Β, αλλά όχι στις λινκοσαμίδες (φαινότυπος Μ). Εμφανίζεται συχνά στον *S. epidermidis.*

- Η τροποποίηση στόχου (macrolides-lincosamides-streptograminB, MLSB αντοχή) με μεθυλίωση στη θέση αδενίνης A2058 του σημείου V του 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος συνεπεία της παρουσίας των γονιδίων *erm* (erythromycin ribosome methylase, *ermA* και *ermC*). Η αντοχή αφορά στις μακρολίδες με 14 μελή (ερυθρομυκίνη κλαριθρομυκίνη, ροξιθρομυκίνη), 15μελή (αζιθρομυκίνη) και 16 μελή λακτονικό δακτύλιο (γιοσαμυκίνη, σπιραμυκίνη, μιδεκαμυκίνη), κετολίδες (τελιθρομυκίνη), στρεπτογραμμίνη Β και τις λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη, λινκομυκίνη) και μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή **(MLSBc)** ή επαγώγιμη **(MLSBi)**. Στον επαγώγιμο τύπο υποθεραπευτικά επίπεδα ερυθρομυκίνης ή άλλης μακρολίδης ενεργοποιούν τη μεθυλάση που παράγει το μικρόβιο. Έτσι έξυπνα το μικρόβιο δεν καταναλώνει περιττή ενέργεια σε απουσία της μακρολίδης, έχοντας το *erm* γονίδιο ανενεργό. Η κλινδαμυκίνη δεν προκαλεί την ενεργοποίηση του ενζύμου. Για την αποκάλυψη του φαινομένου της επαγώγιμης (inducible) αντοχής χρησιμοποιείται το D test κατά το οποίο τοποθετείται ένα δισκίο ερυθρομυκίνης 2μg με ένα δισκίο κλινδαμυκίνης 15μg σε απόσταση 15-26mm κέντρο με κέντρο. Όταν υπάρχει επαγώγιμη αντοχή ευθυάζεται η ζώνη αναστολής της κλινδαμυκίνης μεταξύ των δύο δίσκων. Κλινικά η κλινδαμυκίνη ειδικά σε υψηλό μικροβιακό φορτίο μπορεί να είναι αναποτελεσματική, γιατί με τη χρήση της επιλέγονται κλώνοι που εκφράζουν ιδιοσυστασιακή αντοχή στο αντιβιοτικό.

Λινεζολίδη [56]

Το βακτηριοστατικό αντιβιοτικό λινεζολίδη που ανήκει στην ομάδα των οξαζολιδινών δρα στην 23S της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος. Έχει αναφερθεί αντοχή λόγω τροποποίησης του ριβοσώματος (οι σταφυλόκοκκοι φέρουν 6-7 αντίγραφα 23S rRNA) απόρροια σημειακών μεταλλάξεων (MIC 4-8mg/l). Πρόσφατα περιγράφηκε το πλασμιδιακό *cfr* γονίδιο, που ανιχνεύτηκε αρχικά σε στελέχη από βοοειδή, ενδεχομένως λόγω της χρήσης χλωραμφαινικόλης στην κτηνιατρική, το οποίο κωδικοποιεί μια μεθυλάση με αποτέλεσμα τροποποίηση του στόχου και διασταυρούμενη αντοχή σε κλινδαμυκίνη, στρεπτογραμμίνη Α και χλωραμφαινικόλη (MIC 8mg/l σε *S. aureus,* και >256mg/l σε *S. epidermidis*). Ο φαινότυπος αυτός ονομάζεται $PhLOPS_A$ λόγω αντοχής στις παρακάτω τάξεις αντιβιοτικών Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins και Streptogramin A [5]. Η προηγούμενη χρήση λινεζολίδης μπορεί να ευθύνεται για τα σποραδικά ανθεκτικά στελέχη *S. epidermidis* σε νοσοκομειακούς αρρώστους, ενώ η πλασμιδιακή μεταφορά συνηγορεί υπέρ της αυξημένης επαγρύπνησης για τη διασπορά τέτοιων στελεχών [57].

Φθοριοκινολόνες

Οι πρώτες φθοριοκινολόνες σιπροφλοξασίνη, νορφλοξασίνη, οφλοξασίνη εμφανίστηκαν τη δεκαετία του ‘80. Στα Gram-θετικά μικρόβια περιγράφονται μεγαλύτερες MICs σε σχέση με τα Gram-αρνητικά. Δύο είναι οι μηχανισμοί αντοχής, η υπερέκφραση της αντλίας εκροής NorA και δομικές μεταβολές στους στόχους δράσης των κινολονών τοποϊσομεράση IV *(grlA* and *grlB)* και γυράση *(gyrA* and *gyrB)* [5,56]. Η πρώτη μετάλλαξη στο *grlA* σε αναλογία $1/10^7$ στελέχη αυξάνει κατά λίγο την MIC στη σιπροφλοξασίνη (0,5-2 mg/l) εντός των ορίων της μέτριας ευαισθησίας. Αποτελεί όμως το έδαφος για τη δεύτερη μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA* που μαζί με την πρώτη (stepwise) προκαλούν υψηλού βαθμού αντοχή >4mg/l. Έτσι για να αποφευχθεί η πρώτη μετάλλαξη θα πρέπει να εξασφαλιστεί ικανοποιητική συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης στους ιστούς σε επίπεδα πάνω από την MIC. Αυτή ονομάζεται mutation prevention concentration (MPC) και είναι 2-4 φορές μεγαλύτερη από την MIC [5]. Οι νεώτερες κινολόνες μοξιφλοξασίνη, γατιφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη εμφανίζονται πιο ανθεκτικές στην απόκτηση της πρώτης μετάλλαξης, μπορούν όμως να είναι ανθεκτικές με MIC=2-8mg/l, γεγονός που δείχνει ότι απέκτησαν τον πρώτο μηχανισμό αντοχής με το γονίδιο *grlA*. Σημειώνεται ότι η αντοχή των σταφυλοκόκκων στις κινολόνες είναι ενδογενής και χρωμοσωμιακή. Πλασμιδιακή

αντοχή μέσω των *qnr* γονιδίων που απαντούν στα Gram-αρνητικά βακτήρια δεν υφίσταται.

Αμινογλυκοσίδες

Δρουν στη 16S θέση της 30S υπομονάδας του ριβοσώματος και προκαλούν ελαττωματική μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής είναι η παραγωγή των αμινογλυκοσιδοτροποποιητικών ενζύμων που μπορούν να είναι ακετυλοτρανσφεράσες (AAC), φωσφορυλοτρανσφεράσες (APH) και αδενυλοτρανσφεράσες (ANT) και καταλύουν την ακετυλίωση αμινομάδων και την φωσφορυλίωση ή αδενυλίωση υδροξυλομάδων, αντίστοιχα [5]. Τα υπεύθυνα γονίδια φέρονται σε πλασμίδια και μπορεί να εμφανιστεί αντοχή σε περισσότερες από μία έως και όλες τις αμινογλυκοσίδες. Περισσότερα από 30 τέτοια ένζυμα έχουν περιγραφεί. Το διλειτουργικό ένζυμο Aac(6′)-Aph(2″) που προσδίδει αντοχή στη γενταμικίνη [5], βρίσκεται στο τρανσποζόνιο Tn4001 στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδιο. Στους σταφυλοκόκκους απαντούν επίσης οι φωσφορυλάσες Aph(2'') και Aph(3'), η ακετυλάση Aac(6') και η αδενυλάση Ant(4') (βλέπε πίνακα)

Αμινογλυκοσιδοτροποποιητικά ένζυμα και υπόστρωμα που αδρανοποιούν [5]:

Ένζυμο	**Συνήθη αντιβιοτικά που αδρανοποιούνται** (καναμυκίνη:K, τομπραμυκίνη:T, γενταμικίνη:G, αμικασίνη:A)
APH(2″)	K, T, G
APH(3′)–I	K
APH(3′)–III	K, ±A
AAC(6′)	K, T, A
ANT(4′)	K, T, A
AAC(6′)APH(2″)	G, Arbecacin

Δαπτομυκίνη **[5,56]**

Η δαπτομυκίνη προτείνεται τελευταία σαν εναλλακτική της βανκομυκίνης σε ενδοκαρδίτιδα και μικροβιαιμία από MRSA. Δρα μόνο στα Gram-θετικά μικρόβια, γιατί λόγω του μεγάλου μεγέθους του μορίου (λιποπεπτίδιο), δεν μπορεί να περάσει την εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών. Χρειάζεται ιόντα ασβεστίου για να

σταθεροποιηθεί με τη μορφή οκταμερών μυκηλίων στην υγρή φάση. Διαχέεται στην πεπτιδογλυκάνη κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και με την αποβολή των ιόντων ασβεστίου μένει το ενεργό λιπιδιακό κομμάτι το οποίο αποσταθεροποιεί το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης. Έχει έντονη βακτηριοκτόνο δράση. Φαίνεται ότι αύξηση της MIC του αντιβιοτικού έχει παρατηρηθεί σε στελέχη με αυξημένη MIC στην VAN, γι' αυτό χρειάζεται προσοχή στη χρήση της για λοιμώξεις από GISA. Η μειωμένη ευαισθησία μπορεί να οφείλεται σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς, όπως αλλαγή του τροποποιητικού της μεμβράνης ενζύμου συνθετάση της λυσυλφωσφατιδυλγλυκερόλης λόγω του γονιδίου *mprF*, υπερέκφραση του *vraSR* οπερονίου και πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος, όπως είναι και η περίπτωση των GISA στελεχών [5].

Μουπιροκίνη **[58]**

Είναι βακτηριοστατική αλλά στις συγκεντρώσεις που φτάνει στο ρινικό βλεννογόνο (20000mg/l) στην περιεκτικότητα του 2% είναι βακτηριοκτόνος. Είναι χρήσιμη για τοπική εφαρμογή σε λοιμώξεις δέρματος από *S. aureus* με αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά και στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις επίσης. Ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκρίζωση της ρινικής φορίας του MRSA σε άτομα ή οικογένειες με επεισόδια λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων από MRSA. Δεσμεύει την βακτηριακή ισολευκυλ-tRNA συνθετάση έχοντας σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενσωμάτωσης της ισολευκίνης στις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος του σταφυλοκόκκου και τη διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αντοχή συμβαίνει με δύο μηχανισμούς: α) με μετάλλαξη στο χρωμοσωμιακό γονίδιο *mupA* που κωδικοποιεί τροποποιημένης συγγένειας ισολευκυλ-tRNA συνθετάση και χαμηλού επιπέδου αντοχή (MIC=8-256mg/l) ή β) με απόκτηση πλασμιδιακού *mupA* γονιδίου που προσδίδει υψηλού βαθμού αντοχή (MIC>256mg/l). Όταν υπάρχει χαμηλού επιπέδου αντοχή επιτυγχάνει η εκρίζωση αλλά γρήγορα συμβαίνει επαναποικισμός [58].

Σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη

Η κοτριμοξαζόλη έχει αναδειχτεί τα τελευταία χρόνια σαν σημαντικό αντιβιοτικό για τις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων από MRSA. Οι σουλφοναμίδες έχουν βακτηριοστατική δράση αναστέλλοντας την ενσωμάτωση της πτεριδίνης στο παρα-άμινο-βενζοϊκό οξύ (PABA) για το σχηματισμό διϋδροπτεροϊκού οξέος μέσω του ενζύμου συνθετάση του διϋδροπτεροϊκού οξέος (DHPS) [5]. Οι σταφυλόκοκκοι απαντούν στις σουλφοναμίδες με σημειακές μεταλλάξεις του *dhps* γονιδίου. Η τριμεθοπρίμη αναστέλλει την DHFR (αναγωγάση του διϋδροφυλλικού οξέος) μειώνοντας έτσι την παραγωγή

τετραϋδροφυλλικού, πρόδρομης ουσίας για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων. Οι σταφυλόκοκκοι αναπτύσσουν μέτρια αντοχή με σημειακές μεταλλάξεις του *dhfrB* γονιδίου [59] ή πλήρη με νέο ένζυμο (S1DHFR) μέσω του πλασμιδιακού γονιδίου *dhfrA* [5].

7. Staphylococcus aureus και εμβόλιο

Ενώ σε βακτηριακές λοιμώξεις από μικρόβια όπως οι *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* υπήρξε επιτυχία στην παρασκευή εμβολίων για προφύλαξη από σοβαρή νόσο, στον SA οι προσπάθειες μέχρι σήμερα απέβησαν άκαρπες. Αποτελεσματικό αντισταφυλοκοκκικό εμβόλιο δεν υπάρχει, και αυτό όχι επειδή δεν έχουν γίνει κλινικές μελέτες με διάφορους συνδυασμούς αντιγόνων και ανοσοενισχυτικών ουσιών, αλλά διότι οι κλινικές μελέτες σε ανθρώπους δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα σε σχέση με τις δοκιμές σε πειραματόζωα [60]. Οι μελέτες έχουν δώσει ως τώρα θετικά αποτελέσματα σε μοντέλα με ποντίκια αλλά όχι στον άνθρωπο [61] .

Κάποια γενικά σημεία για την αλληλεπίδραση SA και ανθρώπου που σχετίζονται με την προσπάθεια εύρεσης εμβολίου, αναφέρονται παρακάτω [5,60-62]:

- Ο SA συμβιώνει με τον άνθρωπο και το 30-60% των ανθρώπων μπορεί να είναι αποικισμένοι για διάφορες περιόδους στην μύτη με SA. Αυτό δείχνει ότι ο μικροοργανισμός μπορεί και λαθροβιώνει αποφεύγοντας τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή.
- Ο SA εκφράζει πλειάδα λοιμογόνων παραγόντων (ένζυμα, μόρια προσκόλλησης με επικαλυπτόμενη δράση, μόρια διαφυγής από το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή, τοξίνες)
- Τα στελέχη SA εμφανίζουν γεωγραφική κατανομή, εκφράζοντας ποικίλο μείγμα αντιγόνων το καθένα, ανάλογα με τους κλώνους που διασπείρονται (ST-8_USA 300, ST-80, ST-30 κ.α)
- Έχει βρεθεί ότι ορισμένα αντιγόνα μπορούν ή και πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να επάξουν προστατευτική ανοσία, αλλά χωρίς να έχει καταστεί εφικτό να καθοριστούν απόλυτα.
- Δεν ξέρουμε αν ένα εμβόλιο που προστατεύει από SSTIs προστατεύει και από άλλα είδη λοιμώξεων (βακτηριαιμία, πνευμονία και οστεομυελίτιδα)
- Η λοίμωξη δεν καταλείπει ανοσία, αλλά οι επόμενες λοιμώξεις έχουν ηπιότερη κλινική εικόνα

- Οι περισσότεροι ενήλικες έχουν μετρήσιμα αντισώματα στον ορό τους (πολυσακχαριδικό έλυτρο, ClfA) αλλά δεν έχουν οψωνοφαγοκυτταρική/εξουδετερωτική ικανότητα με τα χρόνια

Η προστατευτική ανοσιακή απάντηση είναι διαφορετική στον άνθρωπο σε σχέση με μη πρωτεύοντα ζώα. Ενώ υπάρχει καλή γνώση της απόκρισης στους ποντικούς, έχουμε ακόμη περιορισμένες γνώσεις για το εύρος της ανοσιακής απάντησης στους ανθρώπους όσον αφορά την άμυνα κατά του SA. Τα οψωνοποιητικά αντισώματα στον ορό του ποντικού είναι η βάση προστασίας του και μετρούνται με in vitro δοκιμασίες στηριζόμενες στα πολυμορφοπύρηνα. Μελέτες που χρησιμοποίησαν αυτές τις δοκιμασίας οψωνοφαγοκυτταρικής ικανότητας in vitro σαν βιοδείκτη στον άνθρωπο απέτυχαν όλες. Ένα μοντέλο εργασίας που προτείνεται σήμερα όσον αφορά τα ποικίλα στάδια της ανοσιακής απόκρισης στον SA περιλαμβάνει εκ μέρους του βακτηρίου και του ξενιστή τα ακόλουθα: PSM phenol-soluble modulins, SAE εντεροτοξίνες SA, Hla α τοξίνη, TSST-1 τοξίνη συνδρόμου τοξικού σοκ, Luk λευκοκτονίνη, PVL Panton Valentine λευκοκτονίνη, και εκ μέρους του ξενιστή τα: μακροφάγα,IL ιντερλευκίνη, TGF-b transforming growth factor-b, mAb μονοκλωνικό αντίσωμα, Th17 βοηθητικά Τ κύτταρα, C συμπλήρωμα, RORc retinoid-Related orphan receptor c, STAT 3 signal transducer and activaton of transcription 3,IFN-c in [60]. Από το μοντέλο αυτό που συνδυάζει διάφορες έρευνες μπορούν να εξαχθούν περισσότεροι χρήσιμοι βιοδείκτες για την παρακολούθηση της απάντησης σε ένα εμβόλιο.

Μετά την αποτυχία των προσεγγίσεων με ένα αντιγόνο, η έρευνα εστιάζεται σήμερα σε πολλαπλά αντιγόνα ταυτόχρονα. Το SA4Ag (Nabi/Pfizer) είναι το πιο προχωρημένο και περιλαμβάνει 4 αντιγόνα: το ανασυνδιασμένο μόριο προσκόλλησης ClfA, τον ανασυνδιασμένο μεταφορέα μαγγανίου MntC και πολυσακχαρίτες του ελύτρου οροτύπου 5 και 8, συζευγμένους με αδρανή τοξίνη διφθερίτιδος [63]. Τα αντιγόνα αυτά είναι καλά συντηρημένα και εκφράζονται στην αρχή της λοίμωξης. Στόχος είναι η προστασία από λοίμωξη έναντι διαφόρων τύπων SA ανεξαρτήτως φαινοτύπου αντοχής. Αποτελέσματα φάσης Ι έδειξαν θετικά αποτελέσματα σε ανθρώπους 50-85 ετών με μετρήσιμα αντισώματα στον ορό τους και με θετικές δοκιμασίες οψωνοποιητικής δραστικότητας. Τα αυξημένα αντισώματα παρέμειναν τουλάχιστον για 12 μήνες. Το εμβόλιο εγκρίθηκε από τον FDA ως Fast Track τον Φεβρουάριο 2014. Διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης IIb *vs* placebo από τον Ιούλιο 2015 σε 2600 ασθενείς >18 ετών με πρόσθια επέμβαση έγχυσης υλικού στην σπονδυλική στήλη (ΣΣ) έληξε τον Μάρτιο 2017 σε

ασθενείς (STRIVE: *STaphylococcus aureus* SuRgical Inpatient Vaccine Efficacy). Το υπό εξέταση αποτέλεσμα (endpoint) ήταν μετεγχειρητική χειρουργική λοίμωξη (SSI) ή βακτηριαιμία στις 180 ημέρες μετά την επέμβαση (https ://www.fda.gov/downloads/.../UCM583779.pdf). Το Νοέμβριο 2017 σε συνάντηση των Vaccines and Related Biological products Advisory Committee Meeting του FDA η εταιρία υποστηρίζει την επέκταση του σχεδίου ανάπτυξης του σκευάσματος σε ασθενείς με εκλεκτική επέμβαση στη ΣΣ, αφού τα ευρήματα από την αρχική μελέτη έδειξαν ασφάλεια, ανοσογονικότητα και αποτελεσματικότητα στην αρχική ομάδα ασθενών της πρόσθιας, πολυεπίπεδης έγχυσης υλικού στην ΣΣ. Η σκοπιμότητα του εμβολίου συνίσταται στο ότι οι ασθενείς αυτοί είναι γενικά υγιείς και ανοσοεπαρκείς και έχουν μικρό ποσοστό επιπλοκών και θανάτου από τέτοια επέμβαση σε απουσία λοίμωξης, όμως η λοίμωξη από SA σε αυτούς είναι υψηλή (1.4% στις 90 ημέρες). Επειδή δεν υπάρχει μετρήσιμος βιοδείκτης ανοσίας και προφύλαξης από SA λοίμωξη, οι κλινικές ενδείξεις αποτελεσματικότητας χρησιμοποιούνται στη μελέτη. Η εταιρία θεωρεί ότι τα δεδομένα αποτελεσματικότητας είναι επαρκή και αντιπροσωπευτικά για να στηρίξουν επέκτασή τους σε ασθενείς που δέχονται κάθε είδους εκλεκτική επέμβαση με προσθήκη τεχνητού υλικού στη ΣΣ (0.25-0.5% διεισδυτική λοίμωξη από SA). Η πιο ευρεία ένδειξη που επικαλείται έχει τον τίτλο: "Active immunization for the prevention of invasive postoperative disease cause by *St. aureus* in adults 18 years of age and older who are undergoing elective orthopedic surgery". Προσθετικές επεμβάσεις τέτοιου τύπου έχει βρεθεί σε μοντέλα με πειραματόζωα ότι μειώνουν το αναγκαίο ενοφθάλμισμα για πρόκληση λοίμωξης κατά 100000 φορές [63]. Η επιτροπή καταλήγει ζητώντας σχετικά κλινικά δεδομένα που θα υποστηρίζουν την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του εμβολίου στους ασθενείς με την ευρύτερη αυτή ένδειξη.

Άλλα υποψήφια σκευάσματα με τη λογική των πολλαπλών αντιγόνων είναι υπό μελέτη, κάποια περιλαμβάνουν και τοξίνες όπως τις α-τοξίνη, TSST1, εντεροτοξίνη Β. Μεγάλη προσπάθεια επίσης γίνεται στην διερεύνηση της ανοσοπαθολογίας των λοιμώξεων από SA για την ανίχνευση νέων αντιγονικών στόχων και την ανάπτυξη προκλινικών μοντέλων με μετρήσιμη οψωνοποιητική και εξουδετερωτική ικανότητα του ξενιστή.

Παθητική ανοσοποίηση με μονοκλωνικά Abs είναι εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης σοβαρών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Όπως όμως και με τα εμβόλια, οι

σχετικές κλινικές μελέτες ως τώρα έχουν αποτύχει ως προς την αποτελεσματικότητα. Μία νέα γενιά mAbs είναι υπό μελέτη σήμερα, το υποψήφιο AR-301 (SalvecinTM) (Aridis Pharmaceuticals), μονοκλωνικό IgG1 κατά της α-τοξίνης ως θεραπεία έναρξης μαζί με την αντιβιοτική θεραπεία σε νοσοκομειακή και σχετιζόμενη με αναπνευστήρα πνευμονία (HAP και VAP). Το MEDI4893 (Medimmune) είναι μακράς ημίσειας ζωής mAb που βρίσκεται σε φάση II ασφάλειας και αποτελεσματικότητας σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς [62].

Ανακεφαλαιώνοντας, φαίνεται ότι ένα αντισταφυλοκοκκικό εμβόλιο είναι εν δυνάμει εφικτό τα επόμενα χρόνια υπό τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- Η πλήρης εξάλειψη λοιμώξεων από ποικίλες σειρές SA, δε φαίνεται εφικτή, εντούτοις μελετώνται ειδικές κατηγορίες ασθενών, με ορθοπαιδικές επεμβάσεις, νεφροπαθείς στους οποίους η μείωση σοβαρότητας της νόσου θα είναι ευεργετική.
- Τα πειραματικά μοντέλα σε ποντικούς δεν μεταφράζονται στον άνθρωπο. Οι κόνικλοι παρουσιάζουν ομοιότητες στην ανοσιακή απόκριση και στην ευαισθησία στους λοιμογόνους παράγοντες του SA, και πρέπει να γίνουν προσπάθειες για την εισαγωγή αυτών ως πειραματόζωα αφού επιλυθούν τεχνικά και νομικά ζητήματα [61].
- Υπάρχει ανάγκη μελέτης της ανοσιακής απάντησης του ανθρώπου στον SA για την εύρεση βιοδεικτών (in vitro λειτουργικές δοκιμασίες, T- και B- κυτταρική απάντηση, μέτρηση IL-17 κ.α). Ιδανικά το αίτημα θα ήταν να γίνει ο SA αναγνωρίσιμος από τον οργανισμός όπως ο *S. epidermidis*, χωρίς λοιμογόνες τοξίνες που θα καθαίρεται από τη φυσική ανοσία, την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος και τα οψωνοποιητικά πολυμορφοπύρηνα.
- Φαίνεται ότι λόγω έλλειψης επιδημιολογικών δεδομένων από χώρες του 2ου και 3ου κόσμου, οι προσπάθεια για εμβόλια αν ευοδωθεί θα αφορά γνωστούς πληθυσμούς αποδέκτες υπηρεσιών υγείας στις προηγμένες χώρες.

Τέλος απαιτείται γενναία χρηματοδότηση και δέσμευση στο στόχο, καταρχήν από τις φαρμακευτικές εταιρίες, και εν συνεχεία από φορείς και ινστιτούτα βασικής έρευνας στην παθογένεση, στα προκλινικά μοντέλα και τις λειτουργικές δοκιμασίες (κυβερνήσεις, ΕΕ, NIH, υποτροφίες).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

1.1 Να καταγραφούν οι μικροβιολογικά τεκμηριωμένες **σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις της κοινότητας (Community-associated infections)** κατά το διάστημα της μελέτης (2007-2016). Επιπλέον, να μελετηθούν όλες οι **διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις [**Κοινότητας (Community-Associated, CA), Νοσοκομειακές λοιμώξεις (Hospital-Associated, HA) και Νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα (HA-Community Onset)].

1.2 Να μελετηθούν μικροβιολογικά, κλινικά και επιδημιολογικά όλες οι ανωτέρω περιπτώσεις. Δευτερευόντως να μελετηθεί **η διαχρονική τάση της νοσηρότητας** που προκαλείται από τις λοιμώξεις αυτές **και οι συνέπειες των λοιμώξεων αυτών** (επιπλοκές, χορήγηση αντιβιοτικών, χειρουργική αντιμετώπιση, εισαγωγή στη ΜΕΘ, θνητότητα, διάρκεια νοσηλείας). Μελετήθηκε ο φαινότυπος αντοχής και ο προσδιορισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (MIC) στα γλυκοπεπτίδια και τη λινεζολίδη, τουλάχιστον σε διεισδυτικά στελέχη.

1.3 Να διερευνηθούν **μοριακά** επιλεγμένα στελέχη (στελέχη από σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας καθώς και στελέχη ανθεκτικά στη μουπιροκίνη από ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων). Η μοριακή διερεύνηση αφορούσε σε:

Α. Χαρακτηρισμό του κλώνου - Αναζητήθηκε ενδεχόμενη σύνδεση συγκεκριμένων μοριακών τύπων με συγκεκριμένες κλινικές οντότητες.

Β. Ανίχνευση παραγόντων παθογονικότητας (*lukS-lukF* και εντεροτοξίνες ή/και επιδερμολυτικές τοξίνες κ.α, *agr* τύπος, *arcA*-ACME) και προσκόλλησης (fnbA).

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ταξινομήθηκαν οι περιπτώσεις βάσει του ιατρικού ιστορικού σε Λοιμώξεις της κοινότητας (Community-Associated, CA), Νοσοκομειακές λοιμώξεις (Hospital-Associated, HA) και Νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα (HA-Community Onset). Για τις λοιμώξεις της κοινότητας υπολογίστηκε η συχνότητα από *S. aureus* και από MRSA καθώς και το είδος των λοιμώξεων αυτών. Διεισδυτικές λοιμώξεις θεωρήθηκαν αυτές στις οποίες έγινε απομόνωση του παθογόνου από φυσιολογικά στείρα περιοχή (πνευμονία, μικροβιαιμία, ενδοκαρδίτιδα, κυτταρίτιδα κόγχου οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, νεκρωτική περιτονιίτιδα, περιτονίτιδα). Στις τελευταίες μελετήθηκαν και αυτές της κοινότητας και οι νοσοκομειακές.

Υλικό: Παιδιά ηλικίας μιας ημέρας έως 15 ετών με σταφυλοκοκκική λοίμωξη της κοινότητας (CO-MRSA, δηλαδή CA-MRSA και HACO-MRSA λοιμώξεις σύμφωνα με τους ορισμούς της εισαγωγής) ή διεισδυτική σταφυλοκοκκική λοίμωξη ανεξαρτήτως ιστορικού, που εξετάσθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία ή νοσηλεύτηκαν στις παιδιατρικές, χειρουργικές και ορθοπεδικές κλινικές του Νοσοκομείου. Αναδρομικά μελετήθηκαν τα έτη 2007 – 2012 και συλλογή δειγμάτων έγινε προοπτικά για την περίοδο από 1/1/2013 έως 31/12/2016.

Οι πληροφορίες από το ιστορικό των ασθενών αφορούν:

-Διάγνωση

-Εντόπιση και κλινικά σημεία της λοίμωξης

-Δημογραφικά δεδομένα (ηλικία, φύλο, εθνικότητα)

-Υποκείμενη νόσος

-Θεραπεία

-Διάρκεια νοσηλείας, εισαγωγή στη ΜΕΘ, χειρουργική αντιμετώπιση

-Έκβαση

Στις HACO-MRSA λοιμώξεις ερευνάται:

- Η ύπαρξη ξένου επεμβατικού σώματος (διαδερμικός ή ενδαγγειακός καθετήρας)

- Χειρουργική επέμβαση, νοσηλεία σε νοσοκομείο, παραμονή σε ειδικό κέντρο θεραπείας το 12μηνο πριν τη λοίμωξη, ή σε μονάδα τεχνητού νεφρού.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης υλικό αποτέλεσαν και δύο επιμέρους κλινικά φαινόμενα:

1. Η αύξηση απομόνωσης στελεχών *S. aureus* με αντοχή στο τοπικά χορηγούμενο αντιβιοτικό μουπιροκίνη από τον Ιούνιο του 2013. Η πλειονότητα των λοιμώξεων αυτών ήταν επιπολής λοιμώξεις δέρματος περιορισμένες ή πολλαπλές με συχνότερο το μολυσμακτικό κηρίο (ΜΚ) και σποραδικά περιστατικά τοπικής ή γενικευμένης επιδερμόλυσης (Staphylococcal scalded skin syndrome-SSSS). Δεδομένης της ευκολίας χορήγησης του αντιβιοτικού χωρίς ιατρική συνταγή και της κατάχρησης που μπορεί να γίνει στα παιδιά από τους γονείς, έγινε η υπόθεση ότι η αντοχή στο αντιβιοτικό αυτό μπορεί να παρουσιάσει αύξηση στα επόμενα χρόνια. **Καταγράφησαν το είδος το λοιμώξεων από ανθεκτικό στη μουπιροκίνη *S. aureus* και μελετήθηκαν τα μικροβιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά των στελεχών αυτών** στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σταφυλοκόκκων στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Ιατρικού Τμήματος

Πανεπιστημίου Πατρών (Μάϊος - Ιούλιος 2016) υπό την επιστημονική ευθύνη της καθηγήτριας κυρίας Ι. Σπηλιοπούλου.

2. Η Σταφυλοκοκκική (Community-Associated *S. aureus,* CA-SA) πνευμονία της κοινότητας στα παιδιά για το διάστημα 2007-2014 σε συνεργασία και με το Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία». Διεξοδικά μελετήθηκαν αναδρομικά τα μικροβιολογικά, επιδημιολογικά, κλινικά, διαγνωστικά και θεραπευτικά δεδομένα .

Η εξαγωγή των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα WHONET 5.4 του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου και οι κλινικές πληροφορίες ελήφθησαν απευθείας από τις κλινικές ή τους φακέλους των ασθενών.

<u>Μέθοδοι:</u>

Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων

Οι καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων έγιναν σύμφωνα με τις μεθόδους του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου. Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες αίματος έγιναν με το αυτοματοποιημένο σύστημα BACTEC^{TM} 9240 (Becton Dickinson and Company, MD, USA) χρησιμοποιώντας τα ζεύγη φιαλών BD Peds Plus^{TM}/F Culture Vials και Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials. Υγρά ορογόνων κοιλοτήτων, όπως αρθρικό και πλευριτικό εμβολιάστηκαν και σε φιάλη BD BACTEC^{TM} Peds Plus^{TM}/F Culture Vials πλην της συμβατικής καλλιέργειας. Σε θετικοποίηση της φιάλης γινόταν καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά, χρώση κατά Gram και άμεσο αντιβιόγραμμα. Τα λοιπά κλινικά δείγματα εμβολιάστηκαν σε αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ (επώαση στους 35^{0}C σε ατμόσφαιρα CO_2 5% για 18-48 ώρες), σε McConkey, Chapman, Sabouraud άγαρ (επώαση στους 35^{0}C σε αέρα για 18-24 ώρες) και σε CDC anaerobic άγαρ (σε επώαση στους 35^{0}C σε αναερόβιες συνθήκες για 72 ώρες).

Τ**αυτοποίηση *Staphylococcus aureus***

Η ταυτοποίηση σε είδος έγινε από τη μορφολογία των αποικιών, Gram χρώση, δοκιμασία καταλάσης, και δοκιμασία πηκτάσης με latex αντιδραστήριο συγκόλλησης Staphytest plus® (Oxoid Ltd, UK) με ή χωρίς δοκιμασία παραγωγής DNAάσης.

Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά / προσδιορισμός MIC

Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε με τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού με δίσκους (Kirby Bauer), σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI στα παρακάτω αντιμικροβιακά: Πενικιλλίνη, Κεφοξιτίνη, Γενταμικίνη, Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Τριμεθοπρίμη-

σουλφομεθοξαζόλη, Σιπροφλοξασίνη, Νετιλμικίνη, Καναμυκίνη, Φουσιδικό οξύ, Μουπιροκίνη, Ριφαμπικίνη, Τετρακυκλίνη, Βανκομυκίνη και Τεϊκοπλανίνη. Ο προσδιορισμός των MRSA στελεχών σε περιπτώσεις οριακής ευαισθησίας στην κεφοξιτίνη επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση της PBP2a (Slidex® MRSA Detection Kit,bioMerieux SA, France). Το D-test χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη στέλεχος για τη διερεύνηση του μηχανισμού αντοχής στις λινκοσαμίδες (φαινότυποι M, MLSBi, MLSBc).

Η χαμηλού επιπέδου αντοχή (Low level resistance, LLR) και η υψηλού επιπέδου αντοχή στη μουπιροκίνη (High level, HLR) ελέγχθησαν με δίσκους μουπιροκίνης 5 μg και 200 μg αντίστοιχα; οι διάμετροι εξετάστηκαν με προσπίπτοντα φωτισμό για οποιαδήποτε ανάπτυξη εντός της ζώνης αναστολής. Στελέχη χωρίς ζώνη αναστολής στο δίσκο 5μg και με οποιαδήποτε ζώνη αναστολής στο δίσκο 200μg θεωρήθησαν LLR, ενώ στελέχη χωρίς ζώνη αναστολής και στους δύο δίσκους θεωρήθηκαν HLR [49].

Για τα διεισδυτικά στελέχη έγινε προσδιορισμός των MICs στα γλυκοπεπτίδια βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη, τη λινεζολίδη και την δαπτομυκίνη με ταινίες διαβαθμισμενης συγκέντρωσης (E-test®, Biomerieux SA, France) κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η φύλαξη των στελεχών έγινε σε ειδικό υλικό (Skim milk, Oxoid Ltd, UK) στους -80^0C.

Στατιστική επεξεργασία

Ποιοτικές μεταβλητές συγκρίθηκαν με τη δοκιμή x^2 ή το Fischer's exact test και ποσοτικές με το t-test. Τιμή $P<0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 18.0 (Chicago, Illinois).

Μοριακή μελέτη κλινικών στελεχών

Η μοριακή διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σταφυλοκόκκων στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Πατρών. Ο μοριακός έλεγχος περιελάμβανε PCR για γονίδια των τοξινών Panton-Valentine leukocidin (PVL) (*lukS/lukF-PV*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), επιδερμολυσινών ETA and ETB (*eta, etb*) και για τα υπεύθυνα γονίδια της προσκόλλησης στη φιμπρονεκτίνη [fibronectin binding protein A (*fnbA*)] και του arginine catabolic mobile element (ACME) (*arcA*). Επίσης ελέγχθηκαν τα γονίδια υψηλής αντοχής στη μουπιροκίνη (*mupA*), στο φουσιδικό οξύ (*fusB*) και στις μακρολίδες/λινκοσαμίδες (*ermC,*

ermA). Τέλος, με PCR προσδιορίστηκαν τα *agr* groups (ποικιλία της περιοχής) και οι τύποι *SCCmec*. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1% w/v. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι *S. aureus* ATCC 49775 (*PVL*-θετικό, *agr*3), Fri 913 (*tst*-θετικό, *fnbA*-θετικό, *agr1*), A920211 (*eta/etb*-θετικό, *mupA*-θετικό), Fri137 (*agr2*), ATCC *S. epidermidis* 12228 (A*CME*-θετικό) και HT 20000195 (*agr4*). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από σχετικές δημοσιεύσεις [34,64-69]. Η ποικιλότητα μέσα στο *agr* (1-4 groups) χρησιμοποιείται ως συνοδό στοιχείο τυποποίησης στελεχών, σε συνδυασμό με την PFGE και το προφίλ τοξινών, ώστε να επιλεγούν τα στελέχη για MLST.

Απομόνωση DNA και PFGE μετά από πέψη του DNA με *Sma*I έγινε στη συσκευή CHEF DR III apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Τα κριτήρια του Tenover et al. χρησιμοποιήθηκαν για την απόδοση τύπων PFGE ανάλογα με τα θραύσματα του DNA. Με κεφαλαία γράμματα ονομάστηκαν οι MRSA κατόπιν σύγκρισης με τύπους ήδη χαρακτηρισμένους, και με αριθμούς οι MSSA [43].

Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA σε διάλυμα

Με την μέθοδο αυτή απομονώθηκε το χρωμοσωμικό DNA από κλινικά στελέχη *S. aureus* ώστε να χρησιμοποιηθεί κατόπιν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

• Γίνεται καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών σε Chapman άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται σε αέρα στους 35°C για 18-24 ώρες.

• Σε 1 ml απεσταγμένου H_20 προστίθενται αποικίες βακτηρίου, ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα θολερότητας 2 της κλίμακας McFarland

• Φυγοκέντρηση 13000 rpm για 10 λεπτά

• Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (το οποίο περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100 και 1 mM EDTA pH 8.0) και 1 μl πρωτεϊνάση K

• Επώαση στους 56°C για 1 ώρα

• Επώαση στους 95°C για 10 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθεί η πρωτεϊνάση K

• Ακολουθεί PCR ή φύλαξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία -20°C.

Συνολικά, τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι τα εξής:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 10x: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl

2. 50 mM MgCl2

3. Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems Lab Supplies)

4. Ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων- εκκινητών (primers), ειδικών για κάθε γονίδιο, συγκέντρωσης 100 pmol/μl

5. Μίγμα 25 mM των τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων (Deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs, 2'-deoxynucleoside 5'-Triphosphate, dATP, dTTP, dCTP, dGTP / HT Biotechnology, England)

6. Βακτηριακό DNA

Μετά το πέρας των κύκλων της αντίδρασης, δείγμα 15 μl από το DNA προϊόν της PCR αναμιγνύεται με 4 μl loading buffer (50% Glucerol, Life Technologies, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.25% bromophenol blue, Merck) και αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5xTBE στα 250mV Volts για 45 λεπτά. Τα αποτελέσματα φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως (UV).

Έλεγχος ποιότητας παραγόμενου DNA με PCR και γονίδια για PCR

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA έγινε με ενίσχυση της περιοχής V του γονιδίου που κωδικοποιεί το 23S rDNA, μεγέθους 420 bp [70] με PCR. Τόσο το 16S όσο και το 23S rDNA χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό έκφρασης και σταθερότητας. Το γονίδιο του 23S rDNA είναι σταθερός δείκτης και έχει χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση βακτηρίων [71].

Οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι συνθήκες της αντίδρασης, καθώς και η σύνθεση του μίγματος παρουσιάζονται στους Πίνακες 2-33.

Πίνακας 2. *Αλληλουχία νουκλεοτιδίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA* [72].

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
23S rDNAF	5′-GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3′	420
23S rDNAR	5′-ATCCCGGTCCTCTCGTACTA-3′	

Πίνακας 3. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για τον έλεγχο ποιότητας του DNA.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1 (10 pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (10 pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο d H_20	38.7
DNA (100 ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 4: *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για τον έλεγχο ποιότητας του DNA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	95°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 35 κύκλοι
Αναδιάταξη	55°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Πίνακας 5. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV, tst, eta, etb* [73].

Τοξίνη	**Γονίδιο**	**Εκκινητές**	**Αλληλουχία (5'-3')**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
PVL	*lukS-PV/ lukF-PV*	PVL1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433
		PVL2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	
TSST-1	*tst*	TST1	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	180
		TST2	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	
ETA	*eta*	ETA1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	188
		ETA3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	
ETB	*etb*	ETB1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612
		ETA3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	

Πίνακας 6. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων της PVL.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1	0.5
Εκκινητής 2	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4

Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο d H_20	39.2
DNA (100 ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 7. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση PVL.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	30 κύκλοι
Αναδιάταξη	51°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Στέλεχος αναφοράς ο *S. aureus* ATCC 49775.

Πίνακας 8. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των eta/etb γονιδίων.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1 (*eta1-etb1*)	0.5
Εκκινητής 2 (*eta3-etb2*)	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4

Αποστειρωμένο d H_20	39.2
DNA (100 ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 9. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των eta/etb γονιδίων.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	
Αναδιάταξη	51°C → 30 sec	30 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Στέλεχος αναφοράς ο *S. aureus* A920211

Πίνακας 10. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tst (350bp).*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	2.5
Εκκινητής 1 (10 pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (10 pmol/μl)	0.5

Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	37.6
DNA (100 ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 11. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tst.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C→ 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 2 min	1 κύκλος
Αναδιάταξη	55°C →1.5 min	
Επιμήκυνση	72°C → 1.5 min	
Αποδιάταξη	94°C→ 2 min	1 κύκλος
Αναδιάταξη	53°C → 1.5 min	
Επιμήκυνση	72°C → 1.5 min	
Αποδιάταξη	94°C→ 2 min	37 κύκλοι
Αναδιάταξη	51°C → 1.5 min	
Επιμήκυνση	72°C → 1.5 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 7 min	

Στέλεχος αναφοράς ο *S. aureus* FRI913.

Πίνακας 12. *Αλληλουχία νουκλεοτιδίων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων παραγωγής προσκολλησίνης fnbA, arcA,* και γονιδίων αντοχής [64,65,74,75].

Γονίδιο	**Εκκινητές**	**Νουκλεοτιδική αλληλουχία**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
fnbA	fnbF1	TAGGAACTGAAAATGGTCAC	1026
	fnbAR	GAAGCAATCAGAAAAACACTC	
arcA	arcA-F	GCAGCAGAATCTATTACTGAGC	513
	arcA-R	TGCTAACTTTTCTATTGCTTGAG	
mupA	mupA-f	GTTTATCTTCTGATGCTGAG	237
	mupA-r	CCCCAGTTACACCGATATAA	
fusB	fusB-F	CCGTCAAAGTTATTCAATCG	492
	fusB-R	ACAATGAATGCTATCTCGACA	
ermA	*erm*A-F	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	
	*erm*A-R	CTTCGATAGTTTATTAATATTA	
ermC	*erm*C-F	TCAAAACATAATATAGATAAA	572
	*erm*C-R	GCTAATATTGTTTAAATCGTCA	

Πίνακας 13. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου fnbA (1026bp).*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	2
Εκκινητής 1 (10 pmol/μl)	1
Εκκινητής 2 (10 pmol/μl)	1
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	37
DNA (100 ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 14. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου fnbA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 35 κύκλοι
Αναδιάταξη	53°C → 1 min	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Στέλεχος αναφοράς ο *S. aureus* A21913

Πίνακας 15. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου arcA (513bp).*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1	0.5
Εκκινητής 2	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	39
DNA (100 ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 16. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου arcA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 25 κύκλοι
Αναδιάταξη	60°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 7 min	

Στέλεχος αναφοράς *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228.

Πίνακας 17. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου mecA.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής P2 (10 pmol/μl)	4
Εκκινητής P3 (10 pmol/μl)	4.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	31

DNA (100 ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 18. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου mecA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	54°C → 10 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 30 κύκλοι
Αναδιάταξη	53°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 4 min	

Πίνακας 19. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου mupA (237bp).*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1	0.5
Εκκινητής 2	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	39
DNA (100 ng/μl)	2.5

Τελικός όγκος	50

Πίνακας 20. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου mupA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 1 min	30 κύκλοι
Αναδιάταξη	56°C → 1 min	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Στέλεχος αναφοράς *S. aureus* HT200000195

Πίνακας 21. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου fusB (492bp).*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1	0.5
Εκκινητής 2	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5

Αποστειρωμένο d H_20	39
DNA (100 ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 22. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου fusB.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 30 κύκλοι
Αναδιάταξη	50°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Πίνακας 23. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου ermC.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5
Εκκινητής 1 (10 pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (10 pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο d H_20	39

DNA (100 ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 25. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου ermC.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 10 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 30 κύκλοι
Αναδιάταξη	52°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Πίνακας 26. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου ermA.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x Taq Buffer με KCl	5
MgCl2 (25mM)	3
Μείγμα dNTPs (25mM)	0.8
Primer 1 (25 pmol/μL)	0.5
Primer 2 (25 pmol/μL)	0.5
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.4
dH_2O	34.8
DNA βακτηρίου	5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 27. *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου ermA.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 3 min	
Αποδιάταξη	94°C → 1 min	x 35 κύκλοι
Αναδιάταξη	55°C → 1 min	
Επιμήκυνση	2°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 10 min	

Πίνακας 28. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη multiplex PCR για την ανίχνευση των τύπων SCC*mec* [68,69].

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Μέγεθος προϊόντος (bp) - *agr* τύπος**
AgrI	5'-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3'	440 – I
AgrII	5'-TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC-3'	550 – II
AgrIII	5'-GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCA G-3'	300 – III
AgrIV	5'-CGATAATGCCGTAATACCCG-3'	650 – IV
pan	5'-ATGCACATGGTGCACATGC-3'	

Πίνακας 29. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της multiplex PCR για την ανίχνευση των τύπων SCCmec.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50mM)	1
Μίγμα εκκινητών*	20
Μίγμα dNTPs (25mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5 IU/μL)	0.4
Αποστειρωμένο mili-Q H_20	21.1
DNA (100 ng/μL)	1.7
Τελικός όγκος	50

*Το μίγμα εκκινητών (τελικού όγκου 20 μL) περιέχει:

2 μL από τους εκκινητές: DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7, IS 431 (ολικός όγκος 10 μL)

1 μL από τους εκκινητές: CIF F2, CIF R2, MECI P3, MECI P2, RIF5 F10, RIF5 R13,

PUB110 R1, PT181 R1 (ολικός όγκος 8 μL)

0.5 μL από τους εκκινητές: KDP F1, KDP R1, RIF4 F3, RIF4 R9 (ολικός όγκος 8 μL)

Πίνακας 30. *Συνθήκες αντίδρασης της multiplex PCR για την ανίχνευση των τύπων SCCmec.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 4 min

Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 30 κύκλοι
Αναδιάταξη	53°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 4 min	

Πίνακας 31. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη multiplex PCR για την ανίχνευση των τύπων *agr* [76].

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Μέγεθος προϊόντος (bp) - *agr* τύπος**
agrI	5'-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3'	440 – I
agrII	5'-TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC-3'	550 – II
agrIII	5'-GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCA G-3'	300 – III
agrIV	5'-CGATAATGCCGTAATACCCG-3'	650 - IV
pan	5'-ATGCACATGGTGCACATGC-3'	

Πίνακας 32. *Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των τύπων agr.*

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μl)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (χωρίς $MgCl_2$)	5
$MgCl_2$ (50 mM)	2.5
Εκκινητής *agrI* (100 pmol/μl)	0.5
Εκκινητής *agrII* (100 pmol/μl)	0.5

Εκκινητής *agrIII* (100 pmol/μl)	0.5
Εκκινητής *agrIV* (100 pmol/μl)	0.5
Pan (100 pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs (25 mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο d H_20	36.2
DNA (100 ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 33: *Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των τύπων agr.*

Στάδιο αντίδρασης	**Συνθήκες**	
Αρχική αποδιάταξη	94°C → 5 min	
Αποδιάταξη	94°C → 30 sec	x 25 κύκλοι
Αναδιάταξη	55°C → 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C → 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C → 7 min	

Στελέχη αναφοράς: *agrI* ο *S. aureus* Fri913 (440bp), *agrII* ο Fri137 (550bp), *agrIII* το ATCC49775 (300bp), *agrIV* ο HT200000195 (650bp).

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Απομόνωση DNA και εγκλεισμός σε δίσκους αγαρόζης

Με την μέθοδο αυτή απομονώθηκε το χρωμοσωμικό DNA από τα βακτήρια μέσα σε δίσκους αγαρόζης ώστε να χρησιμοποιηθεί στην PFGE για την κατάταξη των βακτηριακών στελεχών σε κλώνους.

Υλικά

1. Tryptic Soy Broth (TSB)
2. Low Melting Temperature Agarose (Sea Plaque, FMC Bioproducts)
3. Διάλυμα PIV (10 mM Tris, 1 M NaCl)
4. Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα EC (6 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Na-deoxycolate, 0.5% Na-laurysarcosine, Sigma, 50 μg/ml RNAase A, 100 μg/ml Lysozyme, 50 μg/ml Lysostaphin, Sigma)
5. Διάλυμα ESP (0.5M EDTA pH 9.0, 1% Na-laurysarcosine, 1mg/ml Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
6. Διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0)

Τεχνική της μεθόδου

- Επωάζουμε 4-5 αποικίες σε 5 ml TSB - Vortex - Επώαση overnight στους 37°C με ανακίνηση.Vortex
- Σε eppendorf βάζουμε 500 μl από το βακτηριακό εναιώρημα
- Φυγοκέντρηση 12000 rpm για 2 min.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο - Προσθέτουμε 500 μl PIV-
- Φυγοκέντρηση 12000 rpm για 2 min - Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Ανασύσταση με 200 μl PIV-Vortex
- Βάζουμε 5 μl από το εναιώρημα σε κυβέττα μίας χρήσης που περιέχει 1 ml PIV και καλύπτουμε την κυβέττα με parafilm.
- Φωτομέτρηση στα 620 nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό κυβέττα που περιέχει 1 ml PIV. Η οπτική απορρόφηση (OD_{620}) πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.15.
- Στο εναιώρημα του βήματος 4 προσθέτουμε PIV σύμφωνα με τον τύπο: Όγκος PIV= (40 x OD_{620} x 210) - 210
- Σε κενό eppendorf βάζουμε 200 μl από το εναιώρημα (μετά από Vortex) και 200 μl low melting agarose - Vortex
- Σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων (20 cm x 20 cm) καλυμμένη με parafilm ρίχνουμε σταγόνες 20μl,με προσοχή να μην έχουν φυσαλίδες. Καλύπτουμε με αντικειμενοφόρο πλάκα, ώστε οι σταγόνες να πάρουν τη μορφή δίσκου.
- Τοποθετούμε την πλάκα στους -20°C για 5 min.
- Κατόπιν αφήνουμε την πλάκα για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αφαιρούμε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους πλάκες και με κρίκο ρίχνουμε τα δισκάκια σε σωληνάριο που περιέχει 1 ml EC lysis solution. Επωάζουμε στους 37°C για 5 ώρες.
- Απορρίπτουμε το EC lysis solution και προσθέτουμε 1 ml ESP που περιέχει πρωτεϊνάση K. Επωάζουμε στους 50°C overnight (τουλάχιστον για 17 ώρες).
- Απορρίπτουμε το ESP. Προσθέτουμε 13 ml TE και πλένουμε τα δισκάκια με ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το TE, προσθέτουμε άλλα 13 ml TE και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία του πλυσίματος 5 φορές. Ο στόχος είναι η απομάκρυνση της πρωτεϊνάσης K.
- Μετά τα πλυσίματα τα δισκάκια αποθηκεύονται σε 1 ml TE στους 4°C

Πέψη με περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

Υλικά

Restriction buffer: buffer 10x : 10 μl/ disc, b- mercaptoethanol: 0.042 μl/ disc + dH_20: 90 μl/ disc

Restriction mix: buffer 10x : 4.5 μl/ disc + b- mercaptoehanole: 0.0189 μl/ disc dH_20: 38.5 μl/ disc+ SmaI: 20 U/ disc

Buffer ηλεκτροφόρησης : 125 ml 10x TBE buffer + dH_20 έως τελικό όγκο 2,5 lt

Τεχνική της μεθόδου

- Μοιράζουμε σε eppendorfs 100 μl restriction buffer
- Βάζουμε 1 δισκάκι αγαρόζης σε κάθε eppendorf.
- Αφήνουμε 1 ώρα σε υδατόλουτρο 25°C
- Αναρρόφηση του υγρού από τα eppendorfs με τα δισκάκια
- Μοιράζουμε στα eppendorfs από 45 μl restriction mix
- Overnight σε υδατόλουτρο 25°C
- Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματίζεται προσθέτοντας 4 μL loading buffer
- Παρασκευάζουμε το gel : 150 ml buffer + 1.5 gr agarose.

- Φορτώνουμε στο gel τα δισκάκια- κλείνουμε τα πηγαδάκια με αγαρόζη.
- Φορτώνουμε το gel στο μηχάνημα υπό ηλεκτρικό πεδίο για 23 ώρες.
- Χρόνος ηλεκτροφόρησης: 23 ώρες , Γωνία: 120^{o}, Δυναμικό πεδίου: 6 V/cm, Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος: 120 Ma

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή PFGE CHEF DR III apparatus (Bio-Rad).

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης χρωματίζεται σε διάλυμα 500 mL dH_2O με 25 μL ethidium bromide (5 mg/mL, Sigma) και ήπια ανάδευση για 20 λεπτά
- Ακολουθεί φωτογράφιση με UV.

Τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST)

Αναφέρθηκε στο γενικό μέρος η βασική αρχή της τεχνικής. Γίνεται αλληλούχηση των αλληλίων των 7 housekeeping γονιδίων των στελεχών *S. aureus*. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε τμήματος των γονιδίων που αναλύθηκαν συγκρίνεται με αλληλουχίες αναφοράς και ανάλογα με τις διαφορές τους προκύπτει ένας αριθμός που αντιστοιχεί στο κάθε αλληλόμορφο. Έτσι στο τέλος προκύπτει ένας επταψήφιος αριθμός (allelic profile) για κάθε στέλεχος. Στελέχη με το ίδιο allelic profile ανήκουν στον ίδιο κλώνο (Sequence Type, ST). Η σύγκριση του προφίλ αλληλίων των στελεχών έγινε με τον αλγόριθμο eBURST. Με το πρόγραμμα αυτό είναι δυνατός ο καθορισμός πιθανής συγγένειας μεταξύ του Sequence Type (ST) των υπό μελέτη στελεχών και αυτών που υπάρχουν στην παγκόσμια βάση δεδομένων. Τα συμπλέγματα κλώνων (Clonal Complexes) καθορίστηκαν με τις αρχικές ρυθμίσεις, όπου όλοι οι STs σε ένα σύμπλεγμα διαφέρουν μόνο σε ένα αλλήλιο.

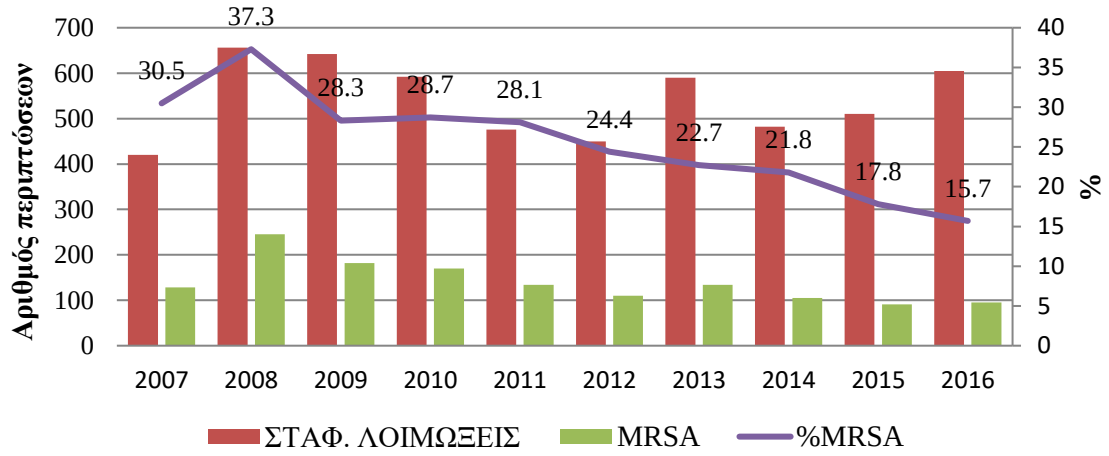
Στην παρούσα μελέτη επιλεγμένα στελέχη από τους κύριους PFGE τύπους και υποτύπους χαρακτηρίστηκαν με MLST (http://saureus.beta.mlst.net) και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τον eBURST αλγόριθμο προσδιορίζοντας STs (Sequence types) και CCs (Clonal Complexes) [69,73].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

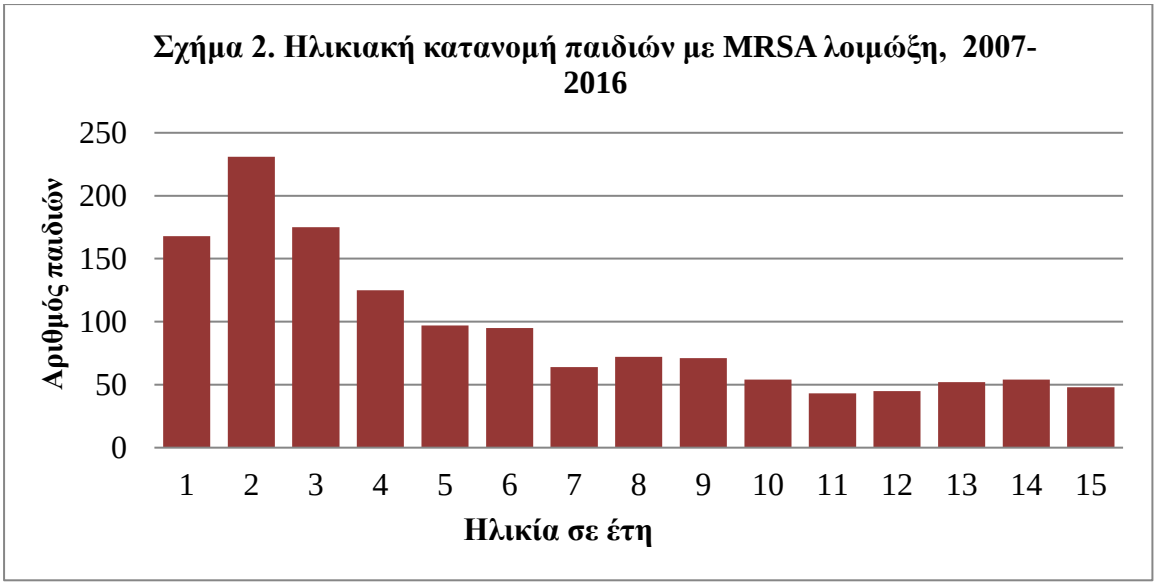
1.1 Επιδημιολογία σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων της κοινότητας στα παιδιά κατά τη δεκαετία 2007-2016

Κατά το χρονικό διάστημα 2007-2016 απομονώθηκαν συνολικά 5423 στελέχη *S. aureus* κλινικά σημαντικά, σε παιδιά της κοινότητας. Από αυτά 1394 (25.7%) ήταν MRSA. Αμφίβολη ζώνη στην κεφοξιτίνη είχαν 54 στελέχη *S. aureus*, θετικά στην ανίχνευση PBP2a ήταν 40 (3.12% των MRSA). Περισσότερες σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις καταγράφηκαν τα έτη 2008 και 2009 (656 και 642 περιπτώσεις), και η υψηλότερη συχνότητα MRSA στελεχών σημειώθηκε το 2008 (37.3%), βαίνουσα συνεχώς μειούμενη μέχρι το 2016 (15.7%). (Σχήμα 1). Η πτώση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, x^2 for trend<0.0001.

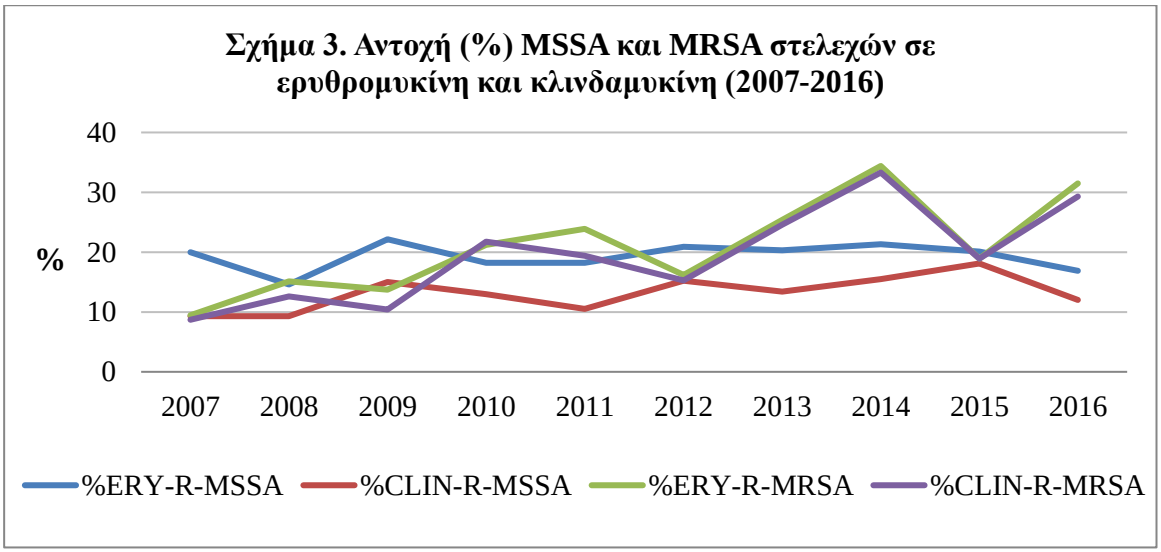
Σχήμα 1. Σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις της κοινότητας και συχνότητα (%) MRSA στελεχών κατ΄έτος (2007-2016)



Οι λοιμώξεις από MRSA καταγράφηκαν σε νεογνά, βρέφη και παιδιά ηλικίας από 10 ημερών–15 ετών (διάμεση 3.5 έτη, IQR: 1-8 έτη), συχνότερα σε αγόρια (740, 53.1%), κυρίως κατά τους μήνες Ιούλιο έως Οκτώβριο (825, 59.2%). Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών απεικονίζεται στο σχήμα 2. Η πλειονότητα αφορούσε σε λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (85.2%), ωτίτιδες (11.4%), ενώ μικρό ήταν το ποσοστό (3.4%) των διεισδυτικών λοιμώξεων (βακτηριαιμία με ή χωρίς εστία λοίμωξης, πνευμονία, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα).

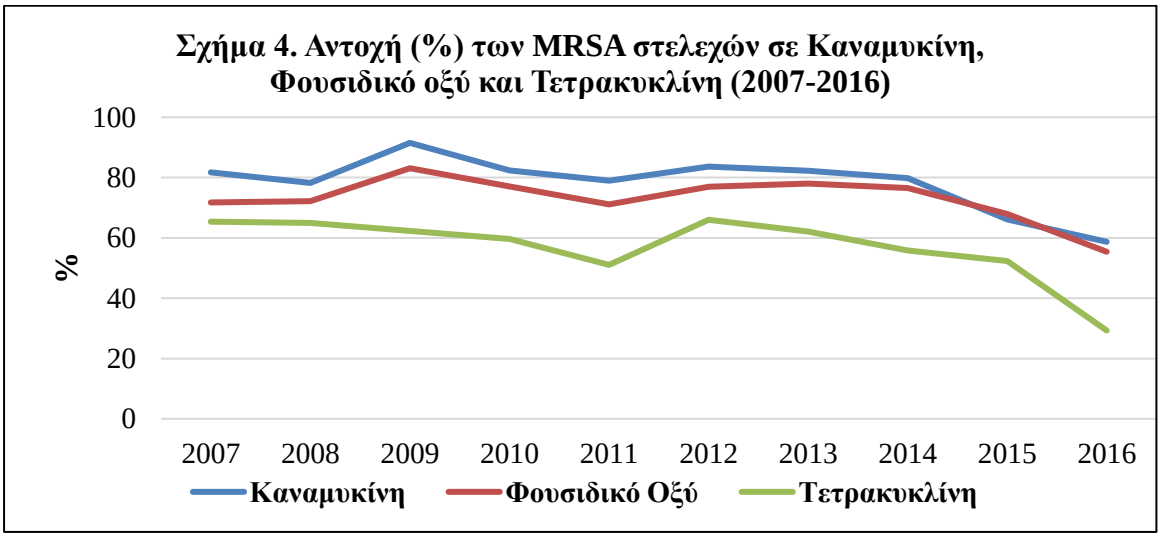


Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά των απομονωθέντων MSSA στελεχών έδειξε αντοχή στην ερυθρομυκίνη 19.5% (16.9 - 22.15) και στην κλινδαμυκίνη 13.8% (9.3 – 18.1) και όσον αφορά τα MRSA στελέχη 20% (9.45 – 34.9) και 17.8% (8.7 – 33.3), αντίστοιχα. Σημειώθηκε διακύμανση της αντοχής ανά έτος και στα δύο αντιμικροβιακά με σαφή αυξητική τάση στα MRSA στελέχη (σχήμα 3).



Όσον αφορά την αντοχή των MRSA στελεχών στα υπόλοιπα αντιμικροβιακά φαίνεται ότι μειώθηκε η αντοχή σε φουσιδικό οξύ, καναμυκίνη και τετρακυκλίνη (φαινότυπος αντοχής που χαρακτηρίζει συχνά τα στελέχη της κοινότητας), (σχήμα 4). Τέλος, εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά αντοχής βρέθηκαν στη γενταμικίνη (<3%), στην

κοτριμοξαζόλη (<1%), στη ριφαμπικίνη (<1%) και στη σιπροφλοξακίνη (<4.5%) καθόλη τη διάρκεια της 10ετίας.



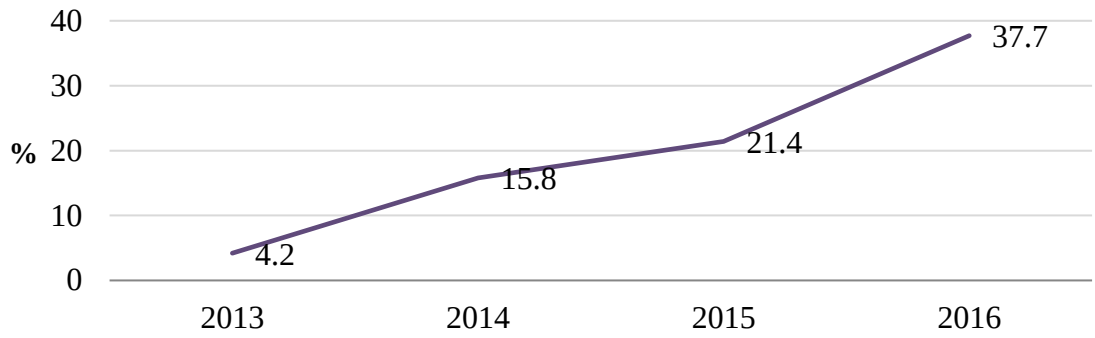
Σχήμα 4. Αντοχή (%) των MRSA στελεχών σε Καναμυκίνη, Φουσιδικό οξύ και Τετρακυκλίνη (2007-2016)

1.2 Επιδημιολογία και μοριακή διερεύνηση ανθεκτικών στη μουπιροκίνη στελεχών *Staphylococcus aureus* σε παιδιά της κοινότητας (2013-2016)

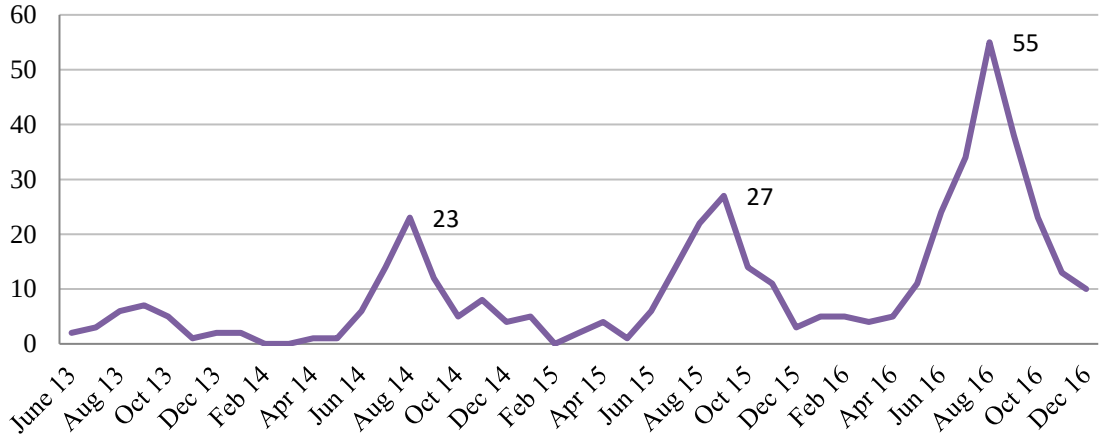
1.2.α Επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά

Από τον Ιούνιο 2013 παρατηρήθηκε αύξηση στη συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών στη μουπιροκίνη (mupirocin) στελεχών και έκτοτε άρχισε η συστηματική καταγραφή και παράλληλα η συστηματική κλινική και επιδημιολογική μελέτη των λοιμώξεων των σχετιζόμενων με ανθεκτικά στη μουπιροκίνη στελέχη. Παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση της συχνότητας των μουπιροκίνη - ανθεκτικών στελεχών από 4.2% (2013) σε 37.7% (2016), με μεγαλύτερη επίπτωση κατά τους θερινούς μήνες και κορύφωση τον Αύγουστο 2016 (σχήμα 5 και 6).

Σχήμα 5. Συχνότητα (%) στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη Μουπιροκίνη



Σχήμα 6. Εποχιακή κατανομή των λοιμώξεων από στελέχη *S. aureus* μουπιροκίνη-ανθεκτικά (Ιούνιος 2013-Δεκέμβριος 2016)



Κατά την περίοδο Ιούνιος 2013 - Δεκέμβριος 2016 καταγράφησαν 437 επεισόδια λοίμωξης σε 435 παιδιά (αγόρια 58.2%, ηλικίας από 9 ημέρες έως 15 έτη, διάμεση 5.5 έτη, IQR: 2.5-10). Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ της ηλικίας των ασθενών με γενικευμένη επιδερμόλυση (staphylococcal scalded skin syndrome, σύνδομο ζεματισμένου δέρματος-SSSS) (μέση 33 μήνες, διάμεση 30, IQR: 16-48) και εκείνης των ασθενών με μολυσματικό κηρίο (ΜΚ) (μέση 73 μήνες, διάμεση 72, IQR: 36-105) $p<0.001$. Το εθνολογικό προφίλ των ασθενών ήταν ίδιο με αυτό που χαρακτηρίζει τον πληθυσμό της Αθήνας.

Η πλειονότητα των λοιμώξεων αυτών αφορούσε σε επιπολής λοιμώξεις δέρματος περιορισμένες ή πολλαπλές με επικρατέστερα το μη φυσαλιδώδες και φυσαλιδώδες ΜΚ, σποραδικά περιστατικά SSSS, δύο μόνο περιπτώσεις δοθιήνωσης, και κανένα απόστημα. Το συχνότερο σημείο προσβολής ήταν το πρόσωπο (167, 38.2%), τα πολλαπλά σημεία

(145, 33.2%), και ο κορμός ή τα άκρα (125, 28.6%). Εισαγωγή στο νοσοκομείο απαιτήθηκε σε 80 (18.4%) νεογνά και μικρά παιδιά (διάμεση 3 χρ, IQR: 2.6μην-8χρ) με SSSS (n=21) και εκτεταμένο ΜΚ (n=59). Δεκατρία από τα παιδιά αυτά ήταν νεογνά ηλικίας 6-30 ημερών. Εισαγωγή στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας έγινε σε ένα μόνο ασθενή με σοβαρό SSSS. Η συχνότερη υποκείμενη νόσος ήταν η ατοπική δερματίτιδα/έκζεμα, ενώ όλα τα παιδιά ήταν φαινοτυπικά ανοσοεπαρκή. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 34.

Πίνακας 34. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με λοίμωξη από ανθεκτικό στη μουπιροκίνη *S. aureus*

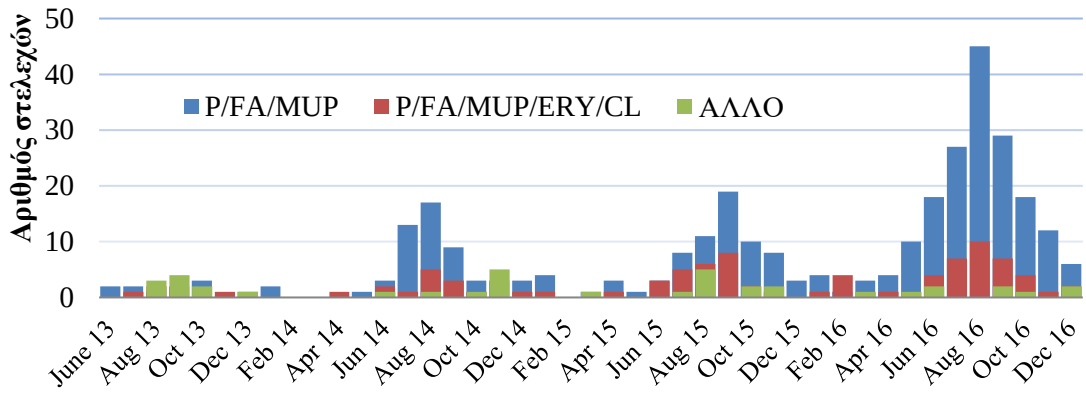
Μεταβλητή	**Αριθμός ασθενών, n=435 (%)**
Άρρεν φύλο	253 (58.2%)
Μέση ηλικία, έτη (IQR)	5.5 (2.5-10)
Εθνικότητα	
Ελληνική	377 (86.7)
Αλβανική	44 (10.1)
Άλλη	14 (3.2)
Ιστορικό ατοπίας (ΑΔ)	28 (6.4)
Συν-λοίμωξη με *Streptococcus pyogenes*	7 (1.6)
Ιστορικό υποτροπής	90 (20.6)
Προηγηθείσα χρήση τοπικού αντιμικροβιακού (μουπιροκίνη ή φουσιδικό)	141 (32.3)
Κρούσμα στην οικογένεια ή στο κοντινό περιβάλλον	153 (35)
	Αριθμός περιπτώσεων, n=437 (%)
Μολυσματικό κηρίο	371 (84.9)
SSSS	21 (4.8)
Ωτόρροια	15 (3.4)
Οφθαλμία	9 (2)
Επιμολυσμένη ατοπική δερματίτιδα	11 (2.5)
Άλλο (κολπίτιδα, παρωνυχία, ομφαλίτιδα)	7 (1.6)
Δοθιήνωση	2

Βακτηριαιμία	1
Εισαγωγή στο νοσοκομείο	80 (18.4)

1.2.β Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στη μουπιροκίνη στελεχών σταφυλοκόκκου

Υψηλού επιπέδου αντοχή στη μουπιροκίνη βρέθηκε στο 99% (433/437) των μουπιροκίνη ανθεκτικών στελεχών. Από αυτά τρία μόνο στελέχη ήταν MRSA, επιβεβαιωμένα με ανίχνευση του γονιδίου *mecA*. Η πλειονότητα των στελεχών βρέθηκαν επιπλέον ανθεκτικά στην πενικιλλίνη (98.4%, 430/437) και στο φουσιδικό οξύ (95.2%, 417/437), το 22% (96/437) βρέθηκαν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη (MLSBc 91.7%, 88/96), σπάνια στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (3/437), καναμυκίνη (9/437) και σουλφαμεθοξαζόλη - τριμεθοπρίμη (1/437), ενώ δεν παρατηρήθηκε αντοχή σε γενταμικίνη, σιπροφλοξακίνη και ριφαμπικίνη. Οι πιο συχνοί φαινότυποι αντοχής ήταν οι: P/MUP/FA (306, 70%) και P/MUP/FA/ERY/CL (91, 20.8%) (σχήμα 7).

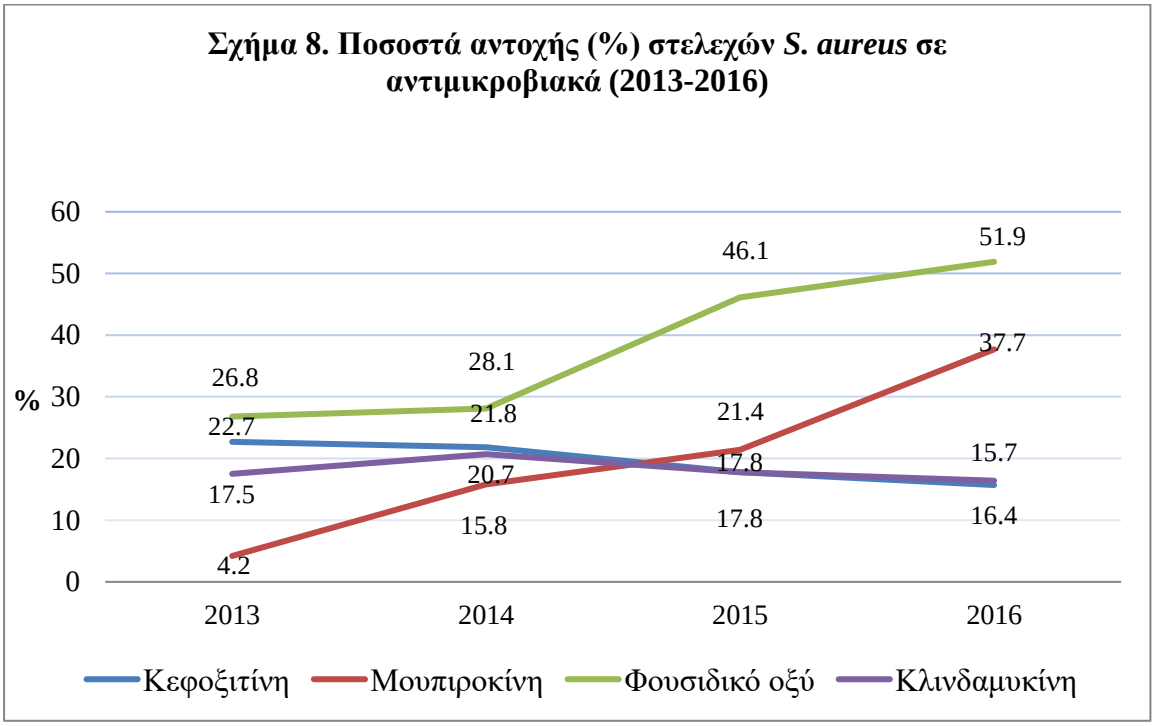
Σχήμα 7. Κατανομή φαινοτύπων αντοχής στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη μουπιροσίνη



P: Πενικιλλίνη, FA: Φουσιδικό οξύ, MUP: Μουπιροκίνη, ERY: Ερυθρομυκίνη, CL: Κλινδαμυκίνη

Συγκριτικά, η ετήσια μεταβολή των ποσοστών αντοχής των κλινικών στελεχών *S. aureus* σε κεφοξιτίνη, μουπιροκίνη, φουσιδικό οξύ και κλινδαμυκίνη απεικονίζεται στο σχήμα 8.

Σχήμα 8. Ποσοστά αντοχής (%) στελεχών *S. aureus* σε αντιμικροβιακά (2013-2016)



1.2.γ Μοριακή μελέτη [PCRs και Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) και Multilocus Sequence Typing (MLST)] ανθεκτικών στη μουπιροκίνη στελεχών σταφυλοκόκκου

Η Μοριακή μελέτη έγινε τον Μάϊο-Ιούλιο 2015 σε 102 αντιπροσωπευτικά για το είδος της λοίμωξης στελέχη (99 MSSA and 3 MRSA), που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επτά στελέχη ήταν από ρινικό αποικισμό κλινικά σημαντικό, δηλαδή η απομόνωση του θεωρήθηκε και αίτιο της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης, τέσσερα από οφθαλμικά, τέσσερα από ωτικά δείγματα, 12 από SSSS, δύο από ασθενείς με επιμολυνθείσα ατοπική δερματίτιδα, ένα από αίμα, και 73 από ασθενείς με διάφορες μορφές μολυσματικού κηρίου. Αντοχή στην κλινδαμυκίνη είχαν 27 στελέχη, τα 25 τύπου MLSBc.

Τα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης φαίνονται στον πίνακα 35.

Βρέθηκε συντριπτική παρουσία γονιδίων αντοχής και τοξινών. Εκατό στελέχη (96.1%) ήταν *mupA*-θετικά and 97 (95.1%) *fusB*-θετικά. Από τα 27 ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη (92.6% τύπου MLSBc) στελέχη τα 26 ήταν *ermC*-θετικά και μόνο ένα *ermA*-θετικό.

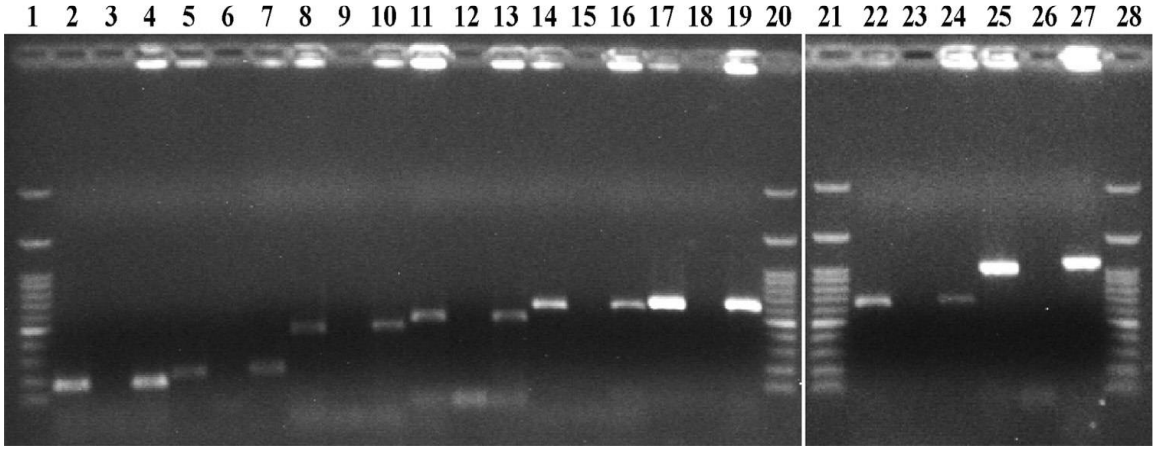
Σχετικά με τις τοξίνες, 83 (81.37%) ήταν *lukS/lukF*-θετικά, 95 (93.1%) *eta/etb*-θετικά, τρία (2.9%) θετικά για μία επιδερμολυσίνη, ενώ τέσσερα (3.9%) ήταν *eta/etb*-αρνητικά. Μόνο ένα από τα *lukS/lukF*-αρνητικά στελέχη που εξετάστηκαν ήταν *tst*-θετικό και ήταν MRSA. Κανένα δεν ήταν *arcA*-θετικό, ενώ 99 (97%) στελέχη ήταν *fnbA*-θετικά.

Όσον αφορά στον γονότυπο PFGE, 96 MSSA στελέχη ανήκαν σε έναν κοινό τύπο PFGE τύπο, τον 1 και στις υποκατηγορίες 1a-1e. Όλα πλην ενός στελέχους ήταν τύπου *agrIV*. Τρία στελέχη ανήκαν στους τύπους 2, 3, 4 και ήταν *eta/etb*-αρνητικά, το ένα εξ αυτών *agrI* και τα δύο *agrIII* τύπου.

Το στέλεχος MSSA από τη βακτηριαιμία ήταν *lukS/lukF*-αρνητικό, *eta/etb, fusB* και *mupA*-θετικό, *agrII* τύπου και PFGE τύπου 1.

Ένα MRSA στέλεχος ανήκε στον Ευρωπαϊκό ST80-IV/*agr*I κλώνο (τύπος C), ένα ταξινομήθηκε στον τύπο F- *SCCmecI-agrI* και ένα στον τύπο E-*SCCmecI-agrII.*

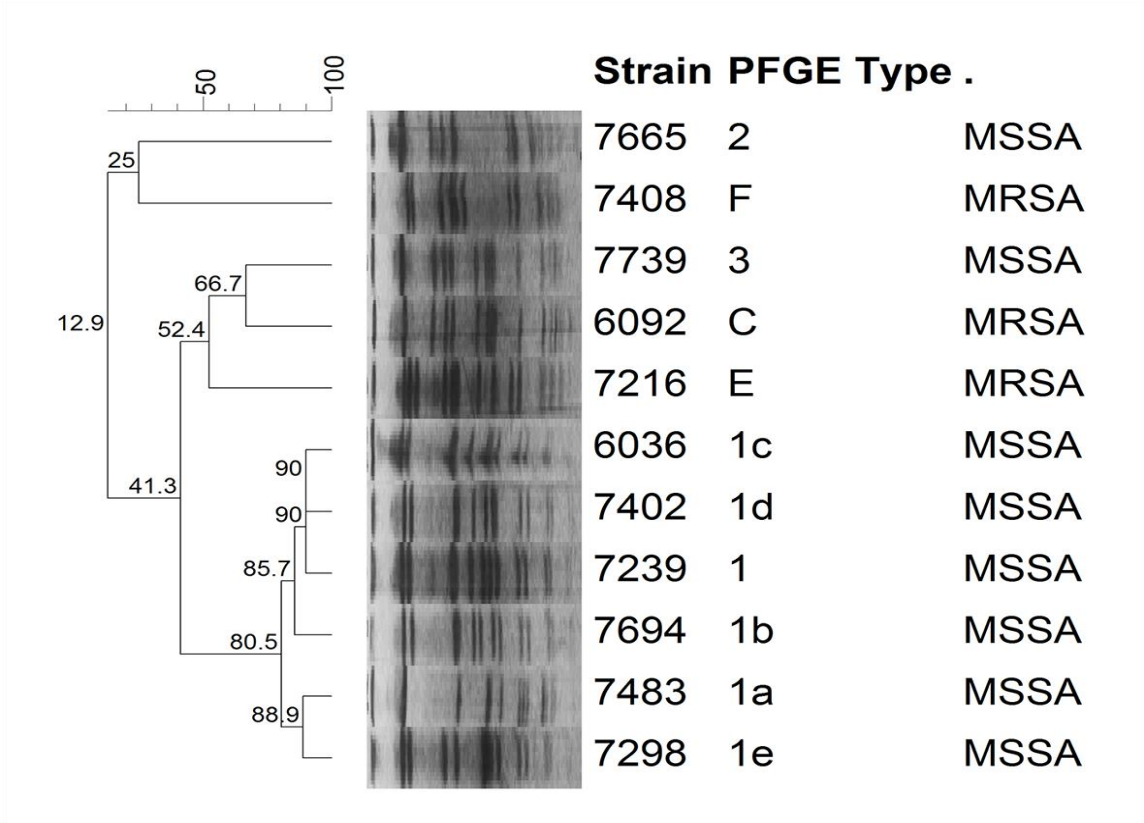
Φωτογραφία πολυγονιδιακής PCR (multi-gene PCR) στελέχους από τον κύριο κλώνο 1a παρουσιάζεται στην εικόνα 14 και το δενδρόγραμμα της PFGE με τους τύπους που ανευρέθησαν στο σχήμα 9.



Εικόνα 14. Πολυγονιδιακή PCR στελέχους 1α. Θέσεις 1, 20, 21, 28, δείκτης μοριακού βάρους (100 bp); θέση 2, θετικός μάρτυρας; θέση 3, αρνητικός μάρτυρας; θέση 4, στέλεχος GRE6007 (*eta* θετικό) (188 bp); θέση 5, θετικός μάρτυρας; θέση 6, αρνητικός μάρτυρας; θέση 7, στέλεχος GRE6007 (*mupA* θετικό) (237 bp); θέση 8, θετικός μάρτυρας; θέση 9, αρνητικός μάρτυρας; θέση 10, στέλεχος GRE6007 (*PVL* θετικό) (433 bp); θέση 11, θετικός μάρτυρας;θέση 12, αρνητικός μάρτυρας; θέση 13, στέλεχος GRE6007 (*fusB* θετικό) (492 bp); θέση 14, θετικός μάρτυρας; θέση 15,

αρνητικός μάρτυρας; θέση 16, στέλεχος GRE6007 (*ermC* θετικό) (572 bp); θέση 17, θετικός μάρτυρας; θέση 18, αρνητικός μάρτυρας; Θέση 19, στέλεχος GRE6007 (*etb* θετικό) (612 bp); θέση 22, θετικός μάρτυρας; θέση 23, αρνητικός μάρτυρας; θέση 24, στέλεχος GRE6007 (*agr*IV θετικό) (650 bp); θέση 25, θετικός μάρτυρας; θέση 26, αρνητικός μάρτυρας; θέση 27, στέλεχος GRE6007 (*fnbA* θετικό) (1,026 bp).

Σχήμα 9: Δενδρόγραμμα PFGE με τους τύπους (κλώνους) στελεχών *S. aureus* με αντοχή στη μουπιροκίνη.



Επιλεγμένα στελέχη από τους κύριους PFGE τύπους και υποτύπους χαρακτηρίστηκαν με MLST (http://saureus.beta.mlst.net) και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τον eBURST αλγόριθμο προσδιορίζοντας STs (Sequence types) και CCs (Clonal Complexes) [69,73]. Χαρακτηρίστηκαν ως ST121 (των PFGE τύπων 1a με 1e), ST123 (PFGE τύπος 2) και ST80 (PFGE τύπος 3/ MRSA). Οι ST121 και ST123 ανήκουν στο CC121.

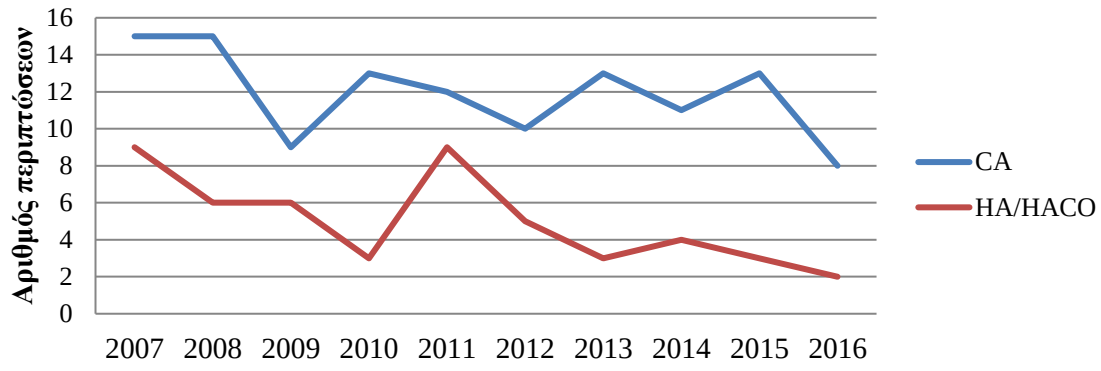
Πίνακας 35. Τύποι PFGE και μοριακή διερεύνηση των ανθεκτικών στη μουπιροκίνη στελεχών *S. aureus* (n=102)

Ευαισθησία στη μεθικιλλίνη (n)	**PFGE τύπος**	**Αριθμός Στελεχών (%)**	***agr* I-IV (n)**	***SCC mec* τύποι**	***PVL*-θετικό n (%)**	***eta* -θετικό n (%)**	***etb*-θετικό n (%)**	***fnbA* -θετικό n (%)**	***arcA* -θετικό**	***mupA* -θετικό n (%)**	***fusB* -θετικό n (%)**
MSSA (99)	1	83 (83.8)	IV (82) II (1)		67 (80.7)	82 (98.8)	82 (98.8)	81 (97	0	83 (100	81 (97.6)
	1a	2 (2)	IV (2)		1	2	2	2	0	2	2
	1b	4 (4)	IV (4)		3	4	4	3	0	4	4
	1c	3 (3)	IV (3)		3	3	3	3	0	3	3
	1d	2 (2)	IV (2)		2	2	2	2	0	2	2
	1e	2 (2)	IV (2)		2	2	2	2	0	2	2
	2	1 (1)	I (1)		1	0	0	1	0	1	0
	3	1 (1)	III (1)		1	0	0	1	0	0	1
	4	1 (1)	I (1)		1	0	0	1		0	0
MSSA (99)	4 τύποι	99 (100)	I (2) II (1) III (1) IV (95)		81 (81.8)	95 (95.9)	95 (95.9)	96 (96	0	97 (97.9)	95 (95.9)
MRSA (3)	C	1	I	IV	1	0	1	1	0	1	1
	F	1	II	I	1	1	0	1	0	1	0
	E	1	IV	I	0	1	1	1	0	1	1

2.1 Διεισδυτικές λοιμώξεις από *S. aureus* σε παιδιά (2007-2016)

Κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης καταγράφηκαν 169 περιστατικά διεισδυτικής σταφυλοκοκκικής νόσου σε 166 παιδιά (αγόρια 56.4%, ηλικίας από 2 ημερών έως 15 ετών). Το 35% (59/166) των περιπτώσεων αφορούσε σε παιδιά ηλικίας κάτω των 12 μηνών. Η διάμεση ηλικία ήταν τα 4 έτη (IQR: 8μήνες - 10 έτη). Η ετήσια διακύμανση των περιστατικών παρουσιάζεται στο σχήμα 10.

Σχήμα 10. Περιπτώσεις διεισδυτικής σταφυλοκοκκικής νόσου (2007-2016)



Η επίπτωση των MRSA ήταν 34.3% επί του συνόλου των απομονωθέντων στελεχών, 41.2% επί των CA και 20% επί των HA/HACO λοιμώξεων ($p<0.01$). Στις διεισδυτικές λοιμώξεις της κοινότητας επικράτησαν οι οστεοαρθρικές λοιμώξεις (55.5%). Το ποσοστό των MRSA στελεχών στις οστεοαρθρικές λοιμώξεις ήταν 33.3%, ενώ στην πνευμονία ήταν 86.4% ($p<0.01$). Αντίθετα στις βακτηριαιμίες της κοινότητας επικράτησαν τα MSSA στελέχη (80%). Όσον αφορά στις νοσοκομειακές διεισδυτικές λοιμώξεις, επικράτησε η βακτηριαιμία (66%, 33/50), με υψηλό ποσοστό MSSA στελεχών (81.2%, 27/33) και ιδιαίτερα η σχετιζόμενη με Κεντρικό Αγγειακό Καθετήρα (56%, 28/50), που διαγνώστηκε σε ασθενείς της ΜΕΘ, του Ογκολογικού τμήματος και σε χρόνια πάσχοντα παιδιά των άλλων τμημάτων με μακρά νοσηλεία.

Εισαγωγή στη ΜΕΘ απαιτήθηκε σε 18 παιδιά, 10 εξ αυτών με MRSA πνευμονία της κοινότητας, ενώ ένα παιδί κατέληξε. Σποραδικά επεισόδια HACO/HA βακτηριαιμίας συνέβησαν σε 16 νεογνά στη ΜΕΝΝ (4/16, 25% οφείλονταν σε MRSA).

Τα κλινικά, επιδημιολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των διεισδυτικών λοιμώξεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 36.

Πίνακας 36. Κλινικά, επιδημιολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά διεισ τικών ικών λοιμώξεων από *S. aureus* στα παιδιά, (2007-2016)

Τύπος λοίμωξης	**COMMUNITY ASSOCIATED, n (%),** 119 (70.4)		**HACO και HA, n (%),** 50 (29.6)	
	MSSA	**MRSA**	**MSSA**	**MRSA**
Κυτταρίτιδα κόγχου με Μικροβιαιμία	1	1		
Πνευμονία/Εμπύημα	3	19		
Οστεοαρθρικές	44	22		
Μικροβιαιμία	20	5	4	1
Μικροβιαιμία (Κεντρικός Αγγειακός Καθετήρας)			23	5
Ενδοκαρδίτιδα		1		
Νεογνική μικροβιαιμία			12	4
Περιτονίτιδα			1	
Ουρολοίμωξη/Μικροβιαιμία	3			
ΣΥΝΟΛΟ	71 (58.8)	48 (41.2)	40 (80)	10 (20)

Μοριακή διερεύνηση έγινε σε 12 από τα 58 MRSA διεισδυτικά στελέχη (αφορούσαν σε λοιμώξεις των ετών 2007 και 2010). Όλα βρέθηκαν να ανήκουν στον ST80 κλώνο (τύπος PFGE C) και ήταν *lukS/lukF*-θετικά.

2.2 Σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας στα παιδιά (Community-Associated *S. aureus*, CA-SA)

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δημοσιεύτηκαν το 2016 [77].

Συνολικά την περίοδο 2007-2014 καταγράφηκαν στα νοσοκομεία Παίδων «Π. & Α. Κυριακού» και «Η Αγία Σοφία» 41 περιπτώσεις CA-SA πνευμονίας σε παιδιά ηλικίας

από 30 ημερών έως 14.5 ετών, διάμεση ηλικία 4.3 μήνες. Στο 75.6% (31/41) των περιπτώσεων απομονώθηκε MRSA. Η ετήσια κατανομή των περιπτώσεων (2007 έως 2014) ήταν: τέσσερα, πέντε, τρία, τέσσερα, έξι, έξι, εννέα και τέσσερα, αντίστοιχα. Υπήρχε τάση αύξησης των περιπτώσεων διαχρονικά, αλλά όχι στατιστικά σημαντική (p=0.09).

2.2.α Δημογραφικά Χαρακτηριστικά

Στον πίνακα 37 φαίνονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας στα παιδιά.

Τέσσερις ασθενείς (9.75%) είχαν υποκείμενο νόσημα, σε δύο εξ αυτών ηλικίας μικρότερης των 2 μηνών η πνευμονία από MSSA ήταν πρωτολοίμωξη σε έδαφος ινοκυστικής νόσου και σοβαρής μικτής ανοσοανεπάρκειας (SCID), αντίστοιχα. Ένα παιδί 19 μηνών είχε συγγενή καρδιοπάθεια και ένα με MRSA πνευμονία είχε ιστορικό γλοιώματος ΚΝΣ και ήταν εκτός ανοσοκατασταλτικής θεραπείας τον προηγούμενο χρόνο. Όσον αφορά τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με MSSA και MRSA πνευμονία, εκτός από την παρουσία υποκείμενου νοσήματος που ήταν συχνότερη σε ασθενείς με MSSA στελέχη (p=0.012).

Πίνακας 37. Δημογραφικά στοιχεία των περιπτώσεων σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας στα παιδιά, 2007-2014

Μεταβλητή	**Αριθμός ασθενών (%)**			
	Όλες οι περιπτώσεις n=41	**MSSA n=10**	**MRSA n=31**	p-value
Φύλο (άρρεν)	25 (60.9)	6 (60.0)	19 (61.3)	0.94
Ηλικία (μήνες, IQR	4.3 (2.9-28)	6 (1.7-20)	4.3(2.9-42)	0.46
Φυλή				
Ελληνική	33 (80.5)	10 (100)	23 (74.2)	0.22
Ρομά	3 (7.3)	-	3 (9.7)	
Άλλη	5 (12.2)	-	5 (16.1)	
Υποκείμενο νόσημα	4 (11.4)	3(30.0)	1(3.2)	0.012
Νοσηλεία ή χειρουργική επέμβαση το προηγούμενο έτος	7 (17.1)	3 (30.0)	4 (12.9)	0.21

2.2.β Ακτινολογικά, Εργαστηριακά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Τα ακτινολογικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας φαίνονται στον πίνακα 38.

Ο απεικονιστικός έλεγχος περιλάμβανε ακτινογραφία θώρακα σε όλες τις περιπτώσεις, υπερηχογράφημα θώρακα σε 24/41 (58.5%) περιπτώσεις και αξονική τομογραφία σε 6 (14.6%). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ακτινολογικής εικόνας και της αντοχής στη μεθικιλλίνη, αν και σε όλες τις περιπτώσεις νεκρωτικής πνευμονίας (με πνευματοκήλες) το αίτιο ήταν ο MRSA. Είναι πιθανό η μη έυρεση στατιστικά σημαντικής διαφοράς να οφείλεται στον μικρό αριθμό περιστατικών. Ομοίως, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και αντοχής στη μεθικιλλίνη, αν και οι έξι περιπτώσεις με λευκοπενία ήταν από MRSA. Ασθενείς με MRSA λοίμωξη είχαν σημαντικά υψηλότερη CRP (222 mg/L *vs* 110 mg/L, p=0.012).

Δύο ασθενείς (4 μηνών και 10 ετών) είχαν πνευμονία από MRSA με συνοδό οστεομυελίτιδα, ένας με οστεομυελίτιδα κνήμης, μικροβιαιμία, εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) και σηπτικά πνευμονικά έμβολα και ένας με οστεομυελίτιδα ισχίου και αμφοτερόπλευρες διηθήσεις. Τεκμηριωμένη προηγηθείσα ίωση αναπνευστικού (H1N1, CMV, PIV1, PIV3, RSV) βρέθηκε σε 5 περιπτώσεις. Δεν έγινε συστηματική αναζήτηση αναπνευστικών ιών σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 38. Ακτινολογικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας, 2007-2014

	Αριθμός ασθενών (%)			
	Όλες οι περιπτώσεις 41 (100)	**MSSA** 10 (24.4)	**MRSA** 31 (75.6)	P value
Ακτινολογικά ευρήματα				
Πύκνωση	39 (95.1)	9 (90.0)	30 (96.8)	0.384
Αμφοτερόπλευρη πύκνωση	4 (9.8)	2 (20.0)	2 (6.5)	0.217
Εμπύημα	25 (61.0)	5 (50.0)	20 (64.5)	0.413
Πνευμονικό απόστημα	1 (2.4)	1 (10.0)	0	0.070
Νεκρωτική πνευμονία	7 (17.0)	0	7 (22.6)	0.164
Σηπτικά έμβολα	1 (2.4)	0	1 (3.2)	0.564
Εργαστηριακά αιματολογικά		**Διάμεση (IQR)**		
WBC /μL *	16,745 (6,780-25,100)	15,410 (9,380-21,940)	20,200 (6,260-25,400)	0.949
WBC<3000/μL*	6 (17.6)	0	6 (22.2)	0.220
C-reactive protein (mg/L)	199 (110-273)	110 (83-159)	222 (145-293)	**0.012**

*: Δεδομένα διαθέσιμα για 34 ασθενείς, 27 (79.4%) με MRSA και 7 (20.6%) με MSSA

2.2.γ Θεραπεία και Έκβαση

Στον πίνακα 39 φαίνεται το είδος της θεραπευτικής αντιμετώπισης και της αντιμικροβιακής θεραπείας.

Οριστική θεραπεία για 15-25 ημέρες με βανκομυκίνη μόνη ή ως μέρος της θεραπείας χορηγήθηκε σε 16 (43.2%) παιδιά, ένα (11.1%) με MSSA και 15 (53.6%) με MRSA πνευμονία.

Δύο ασθενείς κατέληξαν, ένα αγόρι 5 μηνών με προηγηθείσα ιογενή συνδρομή [(parainfluenza virus 1 (PIV1)] και οξύ σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας (ARDS) και ένα κορίτσι 14 ετών με προηγηθείσα γρίπη H1N1. Και οι δυο ασθενείς είχαν λευκοπενία στην εισαγωγή με ουδετεροπενία (900 και 1000 WBC/μl αντίστοιχα). Ασθενείς με MSSA πνευμονία είχαν μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας (26.5 vs 21 ημέρες, p=0.02). Αυτή η διαφορά δεν ήταν σημαντική όταν αφαιρέθησαν από την ανάλυση οι δύο ασθενείς που κατέληξαν την 1^{η} και 3^{η} ημέρα νοσηλείας (26.5 versus 22 ημέρες, p= 0.06).

Δεν βρέθηκε διαφορά στην βαρύτητα της νόσου, στο είδος θεραπείας και στην έκβαση μεταξύ PVL-αρνητικών και PVL-θετικών στελεχών, αλλά παιδιά με υποκείμενο νόσημα εμφάνισαν συχνότερα πνευμονία από PVL- αρνητικό στέλεχος (p=0.056).

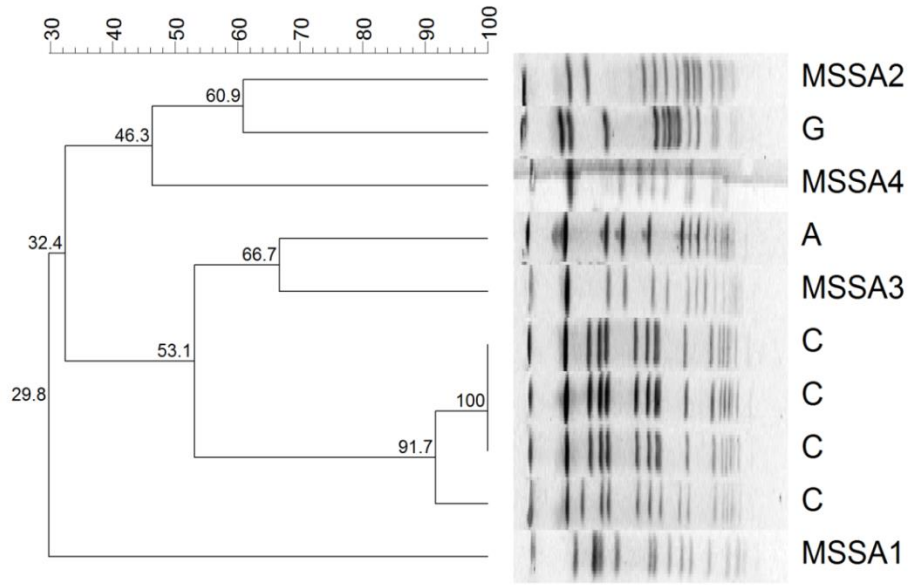
2.2.δ Μικροβιολογική και Μοριακή Ανάλυση

Όλα τα MRSA στελέχη ήταν ανθεκτικά στο φουσιδικό οξύ, την καναμυκίνη και την τετρακυκλίνη. Ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη ήταν 11/41 (26.8%), και ειδικά για τα MSSA 1/10 (10%) και για τα MRSA στελέχη 10/31 (32.2%) (p=0.16). Ο επαγώγιμος φαινότυπος αντοχής MLSBi ήταν ο συχνότερος (81.8%). Οι τιμές MIC_{90} για τη βανκομυκίνη ήταν 2mg/l (1-2), τεϊκοπλανίνη 1.5mg/l (0.5-2) και λινεζολίδη 1mg/l (0.25-2).

Ο μοριακός έλεγχος περιλάμβανε PFGE για τον χαρακτηρισμό του κλώνου, και ανίχνευση των γονίδιων για τις Panton-Valentine leukocidin (PVL) (*lukS/lukF*-PV), και fibronectin binding protein A (*fnbA)* και τις κασσέτες SCC*mec* (*mecA* και *mecC).*

Μελετήθησαν 25 διαθέσιμα στελέχη (πέντε MSSA και είκοσι MRSA). Όλα τα MRSA στελέχη ήταν *mecA*-θετικά και κανένα δεν έφερε το *mecC* γονίδιο. Δεκαοκτώ MRSA στελέχη ήταν *luks-lukF*-θετικά και ανήκαν στον ST80-IV/*agr*III κλώνο (PFGE

τύπος C). Ένα *lukS-lukF*-θετικό στέλεχος ανήκε στον ST80-IV/*agr*I και ένα PVL-αρνητικό στον ST30-IV/*agr*I κλώνο. Όλα ήταν θετικά για το *fnbA* γονίδιο. Τα MSSA στελέχη ανήκαν στους κλώνους Y, V, W, X. Τρία από τα πέντε ήταν *lukS-lukF*-θετικά και άλλα τρία θετικά για το *fnbA* (πίνακας 40 και εικόνα 17)



Εικόνα 17. Δενδρόγραμμα και PFGE τύποι στελεχών *S. aureus* από πνευμονία της κοινότητας σε παιδιά.

Πίνακας 39. Είδος θεραπευτικής αντιμετώπισης και αντιμικροβιακής θεραπείας περιπτώσεων σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας στα παιδιά, 2007-2014

	Αριθμός περιπτώσεων (%)			
	Σύνολο	MSSA	MRSA	P-value
	41 (100)	10 (24.4)	31 (75.6)	
Θεραπεία και Έκβαση				
Καθετήρας Bullaw	32 (78)	7 (70)	25 (80.6)	0.4
Ανοιχτή θωρακοτομή	5 (12.2)	2 (20)	3 (9.7)	0.39
Video-assisted thoracoscopic surgery (VATS)	1 (2.4)	1 (10)	0	
Διάρκεια νοσηλείας (ημέρες)	23 (17-27)	26.5 (23.5-32	21 (15-25)	0.04
Εισαγωγή στη ΜΕΘ	24 (58.5)	6 (60.0)	18 (58.1)	0.91
Θάνατος	2 (4.87)	0 (0)	2 (6.45)	0.41
Οριστική αντιμικροβιακή θεραπεία*				
Αντισταφυλοκοκκική β-λακτάμη μονοθεραπεία	7 (18.9)	7 (77.8)	0 (0)	<0.0001
Βανκομυκίνη, με ή χωρίς άλλα αντιβιοτικά	16 (43.2)	1 (11.1)	15(53.6)	0.025

Βανκομυκίνη μονοθεραπεία	8 (21.6)	0 (0)	8(28.6)	0.07
Κλινδαμυκίνη, με ή χωρίς άλλα αντιβιοτικά	10 (27)	2 (22.2)	8 (28.6)	0.70
Κλινδαμυκίνη μονοθεραπεία	3 (8.1)	0 (0.0)	3 (10.7)	0.30
Λινεζολίδη μονοθεραπεία	12 (32.4)	2 (22.2)	10 (35.7)	0.45

* Διαθέσιμα δεδομένα για 34 περιπτώσεις, δεν ευρέθησαν για 2 MSSA και 5 MRSA πνευμονίες

Πίνακας 40. Μοριακή διερεύνηση 25 στελεχών *Staphylococcus aureus* από πνευμονία της κοινότητας σε παιδιά, 2007-2014

	Αριθμός Μελετηθέντων στελεχών	***mecA***	***mecC***	***agr* (I-IV)**	**PFGE τύποι***	**Κλώνος MLST**	***lukS-lukF*-P**	***fnbA***
MSSA	5	0	0	*agr*III: 3	X: 1	-	0	0
				agr NT**:2	Y: 2		1	1
					W: 1		1	1
					V: 1		1	1
MRSA	20	20	0	*agr*I: 2	C: 19	ST80-IV: 19	19	19
				*agr*III: 18	A: 1	ST30-IV: 1	0	1

* Pulsed Field Gel Electrophoresis

**NT: Μη τυποποιήσιμο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις της κοινότητας

Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις της κοινότητας κατά κύριο λόγω αφορούν λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (SSTIs) σε υγιή παιδιά. Από την ανάλυση των δεδομένων μας προκύπτει μείωση των οφειλόμενων σε MRSA λοιμώξεων στα παιδιά της περιοχής μας κατά την τελευταία δεκαετία. Από τους Sutter DE et al. (2016) μελετήθηκαν 41745 στελέχη *S. aureus* από 39207 παιδιά για τα έτη 2005-2014 από 266 Στρατιωτικά νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών. Η μικρότερη επίπτωση MSSA ήταν το 2007 (53%), από εκεί και πέρα για κάθε έτος η επίπτωση των MSSA στελεχών αυξανόταν και έφτασε το 70% το 2014 (MRSA=30%). Η μελέτη επίσης διαπίστωσε μείωση κατά 46% των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων της κοινότητας μεταξύ 2008 (5732) και 2014 (3112) με αντίστοιχη μείωση των MRSA στελεχών [78]. Η ηλικία με την μεγαλύτερη επίπτωση MRSA στα παιδιά είναι από 1-5 έτη, γεγονός που συμφωνεί και με τα δικά μας αποτελέσματα με τη διάμεση ηλικία των ασθενών τα 3,5 έτη. Στη Μασσαλία της Γαλλίας η επίπτωση των MRSA σε μη διεισδυτικές λοιμώξεις ήταν 24,7% το 2010 και μειώθηκε στο 11,2% το 2015 [79]. Μία εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση αυτή είναι η κυκλική επιτυχία στο χρόνο ορισμένων κλώνων MSSA, που τείνουν να αντικαταστήσουν τον επικρατούντα MRSA κλώνο [79]. Αυτό παρατηρήθηκε και στη μελέτη μας με τη μείωση του MRSA και τη μεγάλη επικράτηση του ανθεκτικού στη μουπιροκίνη MSSA κλώνου που προκαλεί μολυσματικό κηρίο και λιγότερο συχνά SSSS στα παιδιά της περιοχής μας. Ο πληθυσμός σε μια κοινότητα των MSSA στελεχών είναι γενετικά πολύμορφος, με πολλούς κλώνους να κυκλοφορούν ανά δεδομένη χρονική στιγμή, σε αντίθεση με τον MRSA και την επιδημία της τελευταίας εικοσαετίας από τον Ευρωπαϊκό (ST-80 ή υπάρχουν και άλλοι?) και USA300 κλώνο, που ανήκουν σε καθορισμένο κλωνικό τύπο ο καθένας.

Λοιμώξεις από ανθεκτικά στη μουπιροκίνη στελέχη Staphylococcus aureus στα παιδιά της κοινότητας

Ταυτόχρονα, προκύπτει ότι η επιδημιολογία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων (SSTIs) αλλάζει από το 2013 και μετά. Συχνότερη είναι η προσέλευση στα εξωτερικά ιατρεία ασθενών με μολυσματικό κηρίο ενώ η εμφάνιση αποστημάτων και δοθιήνων από MRSA είναι λιγότερο συχνή. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε για πρώτη φορά την ανάδυση ενός νέου κλώνου MSSA στην κοινότητα,

με αντοχή στα τοπικά εφαρμοζόμενα αντιβιοτικά μουπιροκίνη και φουσιδικό οξύ, που παράγει και τις δύο επιδερμολυσίνες ΕΤΑ και ΕΤΒ. Τα στελέχη που ανήκουν στον κλώνο αυτόν προκαλούν επιπολής λοιμώξεις δέρματος με το μολυσματικό κηρίο να είναι το συχνότερο και να ακολουθεί το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο ζεματισμένου δέρματος (SSSS). Την τελευταία δεκαετία οι λοιμώξεις από MRSA οδήγησαν στη μεγαλύτερη χρήση της μουπιροκίνης για τη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων ή την εκρίζωση της ρινικής φορείας. Είναι πιθανό ότι η αυξημένη αυτή χρήση οδήγησε στην μεγάλη αύξηση της αντοχής στο τοπικό αντιβιοτικό όπως και στη διείσδυση αυτού του νέου κλώνου. Η αύξηση των λοιμώξεων από τον κλώνο αυτό είναι συνεχής και ανησυχητική χρόνο με το χρόνο από το 2013. Η επίπτωση της αυξήθηκε 7 φορές από 4.2% το 2013 σε 37.7% το 2016, αντίστοιχα με μεγάλη αύξηση αντοχής στο φουσιδικό (26.8% σε 51.9% για την ίδια περίοδο), ενώ η αντοχή στην κλινδαμυκίνη διατηρήθηκε περίπου σταθερή. Η κλωνική διασπορά και σε λιγότερο βαθμό η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (όπως το *ermC*) ευθύνεται για τον φαινότυπο ευαισθησίας που παρατηρήθηκε.

Τα δεδομένα για την αντοχή στελεχών *S. aureus* στη μουπιροκίνη στην Ελλάδα δεν είναι πολλά. Οι Petinaki E. et al. ανέφεραν συχνότητα αντοχής 2% σε 1200 στελέχη που συλλέχθηκαν το 2002 από 4 Ελληνικά νοσοκομεία, ενώ η ανάλυση με PFGE έδειξε ότι αυτά ανήκαν σε έναν κλώνο [80]. Σε μια γαλλική μελέτη σε 201 MSSA στελέχη από SSTIs σε 71 νοσοκομεία τον Νοέμβριο 2006, η αντοχή στη μουπιροκίνη και φουσιδικό ήταν 1.5% και 5.5%, αντίστοιχα [81]. Οι Cadilla A. *et al.* έδειξαν το 2011 σε CA-MRSA-USA300 στελέχη ότι υπήρχε συσχέτιση της παρουσίας του *mupA* γονιδίου και της αντοχής σε μεγαλύτερο αριθμό μη λακταμικών αντιμικροβιακών (≥3) [105]. Από το 2000, στελέχη MSSA ανθεκτικά στο φουσιδικό παρατηρήθησαν σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης. Τα βακτήρια αυτά ανήκαν σε έναν κλώνο, τον επονομαζόμενο επιδημικό Ευρωπαϊκό fusidic acid-resistant impetigo clone (EEFIC) που τυποποιήθηκε ως ST123 (CC121). Η κυκλοφορία του κλώνου αυτού διαπιστώθηκε σε Ηνωμένο Βασίλειο, Ιρλανδία, Γαλλία και σε Σκανδιναβικές χώρες [82,83]. Ο παραπάνω κλώνος ήταν *spa* type 171, ή των μονοτοπικών παραλλαγών (single locus variants) t408, t659, t874 και t875. Η παρουσία του αλληλίου *agr*IV, του γονιδίου *eta* και σε μεγάλο ποσοστό του *etb*, καθώς και του *fusB* ήσαν χαρακτηριστικά αυτού του κλώνου [26,82-84]. Η τελευταία αναφορά στον παραπάνω κλώνο προέρχεται από τη Νορβηγία το 2014, δείχνοντας τάση εξαφάνισης από το 2012 [85]. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε τη διασπορά ενός τοξινογόνου MSSA κλώνου με συνοδά γονίδια αντοχής σε τοπικά χορηγούμενα αντιβιοτικά, που

τυποποιήθηκε ως ST121 (CC121). Ο ST121 θεωρείται ως ο προγονικός τύπος εντός του CC121, και ο ST123 διαφέρει από τον ST121 μόνο σε δύο αλλήλια [86].

Οι J.C.Mc Neil *et al* έδειξαν το 2011 ότι ή αντοχή στη μουπιροκίνη είναι ειδικά πρόβλημα σε SSTIs από στελέχη MSSA της κοινότητας και με αντοχή στην κλινδαμυκίνη [87]. Στην ίδια μελέτη, από 136 στελέχη *S. aureus* από ασθενείς με τουλάχιστον τρία επεισόδια SSTIs, βρέθηκε ποσοστό φορείας 14.5% του *mupA* έναντι 7.5% στο πρώτο επεισόδιο, ενώ 5/15 των *mupA*-θετικών στελεχών ήταν και ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη [87]. Πρόσφατα, οι Antonov *et al*. ανέφεραν επίπτωση αντοχής στη μουπιροκίνη 31% σε στελέχη *S. aureus* προερχόμενα από παιδιά με λοίμωξη που εξετάστηκαν σε παιδοδερματολογικό τμήμα στη Νέα Υόρκη. Η προηγούμενη χρήση μουπιροκίνης εδείχθη ότι σχετιζόταν με την εμφάνιση αντοχής. Σε αυτή την ομάδα ασθενών, η επιμολυσμένη ατοπική δερματίτιδα ήταν η πιο συχνή κλινική οντότητα, ενώ το μολυσματικό κηρίο ευθυνόταν για ποσοστό 14.9% των περιττώσεων [88].

Οι κλινικές εκδηλώσεις του κλώνου ST121 με συνηθέστερη το ΜΚ προκύπτουν ως αποτέλεσμα της ύπαρξης των επιδερμολυσινών. Είναι αξιοσημείωτο ότι ποσοστό 95% των στελεχών που ανήκουν στον κλώνο αυτό παράγουν και τις δύο επιδερμολυσίνες ενώ από άλλες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι μόνο το 0.5-3% των σταφυλοκόκκων φέρουν τα παραπάνω γονίδια [18]. Για το λόγο αυτό, το ΜΚ ήταν η συνηθέστερη κλινική εκδήλωση, ακολουθούμενο και από σημαντικό αριθμό περιπτώσεων SSSS εκ των οποίων ένας ασθενής νοσηλεύτηκε στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παίδων. Μεγαλύτερη διασπορά του κλώνου ST121 στην κοινότητα μπορεί ενδεχομένως να προκαλέσει περισσότερα τέτοια περιστατικά. Επιπλέον, σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ΜΚ που τεκμηριώθηκαν στο νοσοκομείο μας οφείλονταν σε αυτόν τον κλώνο. Το γονίδο *eta* μεταφέρεται από βακτηριοφάγο και το *etb* εδράζεται σε πλασμίδιο. Τα γονίδια αυτά έχουν δράση πρωτεάσης της σερίνης με στόχο τη δεσμογλεϊνη 1 (Dsg1), μια γλυκοπρωτεΐνη στα δεσμοσώματα της επιδερμίδας. Η διακοπή της συνέχειας της διάμεσης ουσίας της κοκκιώδους στοιβάδας του δέρματος (stratum granulosum) έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των κυτταρικών συνδέσεων και την έξοδο περιεχομένου του διάμεσου χώρου που παρατηρούνται στο ΜΚ και το SSSS [26]. Η ύπαρξη ταυτόχρονης αντοχής σε μουπιροκίνη και φουσιδικό οξύ σε συνδυασμό με το πλούσιο τοξινικό προφίλ είναι πιθανό ότι ευθύνεται για την εμμένουσα μικροβιοφορία των στελεχών του ως άνω κλώνου στα παιδιά. Όμως, αξίζει να σημειωθεί, ότι τα στελέχη του συγκεκριμένου κλώνου δεν φέρουν το στοιχείο ACME. Το τελευταίο αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό

του Αμερικανικού κλώνου USA-300-MRSA και ευνοεί τον αποικισμό του δέρματος και των βλεννογόνων [64].

Όσον αφορά την Panton Valentine (PVL) λευκοκτονίνη, είναι γενικά παραδεκτό ότι είναι βασικός λοιμογόνος παράγοντας σε στελέχη που προκαλούν αποστήματα και δοθιήνωση, ιδιαίτερα όταν απαιτείται διάνοιξη και παροχέτευση, αλλά λιγότερο σε άλλου τύπου δερματικές λοιμώξεις [89]. Επίσης, είναι βασικός λοιμογόνος παράγοντας των CA-MRSA στελεχών με παγκόσμια κατανομή. Υποθέτουμε ότι, στη συγκεκριμένη ομάδα λοιμώξεων, η PVL είναι επικουρικός και όχι βασικός λοιμογόνος παράγοντας, όσο τουλάχιστον οι επιδερμολυσίνες ΕΤΑ και ΕΤΒ που ευθύνονται για το χαρακτηριστικό έκθυμα του ΜΚ. Επίσης, παρόλη την παρουσία της PVL στο 80% των στελεχών αυτού του κλώνου, δεν καταγράφηκε απόστημα οφειλόμενο σε αυτόν.

Η εποχικότητα των σταφυλοκοκκικών SSTIs είναι κάτι που έχει δειχθεί και από άλλους ερευνητές. Το καλοκαίρι και οι πρώτοι φθινοπωρινοί μήνες είναι η εποχή του χρόνου με αυξημένη επίπτωση σταφυλοκοκκικών δερματικών λοιμώξεων. Η υγρασία και η επαφή με γυμνό δέρμα μεταξύ των ανθρώπων ενισχύουν τη μεταφορά του *S. aureus* στο δέρμα. Μετά από αμυχή, δήγμα εντόμου ή άλλη λύση της συνέχειας του δέρματος, δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου, με τη σύνδεση του στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου των Fibronectin binding proteins (FnBPs) [38,90]. Αναμένεται ότι με την περαιτέρω διάδοση του κλώνου ST121 στην κοινότητα στο άμεσο μέλλον θα αυξηθούν οι περιπτώσεις ΜΚ και SSSS και θα μειωθούν τα αποστήματα ή οι δοθιήνες που προκαλούνται από σταφυλόκοκκο και ειδικά MRSA. Η κυκλική αντικατάσταση του MRSA από επιτυχημένους κλώνους MSSA, όπως στον πληθυσμό της μελέτης μας, ίσως να ευθύνεται για την προαναφερθείσα μείωση του MRSA σε παγκόσμιο επίπεδο [79]. Οι κλινικοί ιατροί που ασχολούνται με παιδιά και ενήλικες με δερματικές λοιμώξεις θα πρέπει να είναι ενημερωμένοι για την ύπαρξη αυτού του κλώνου με αντοχή στα τοπικά χορηγούμενα αντιμικροβιακά. Θα πρέπει να γίνει πράξη η συνετή χρήση των σκευασμάτων αυτών στην κοινότητα. Επίσης, θα πρέπει να επαναθεωρηθεί η εκτεταμένη χρήση μουπιροκίνης ή άλλου τοπικού αντιμικροβικού για ρινική εκρίζωση *S. aureus*.

Διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στα παιδιά

Όσον αφορά στις διεισδυτικές λοιμώξεις, ο MRSA εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στις λοιμώξεις της κοινότητας (κύρια μυοσκελετικές και πνευμονικές) και λιγότερο σε νοσοκομειακές λοιμώξεις. Ειδικά στις διεισδυτικές λοιμωξεις η PVL-

λευκοκτονίνη θεωρείται σημαντικός παράγων λοιμογονικότητας που αυξάνει τη σοβαρότητα της νόσου που προκαλείται τόσο από τα MSSA όσο και από τα MRSA στελέχη. Σε πρόσφατη πολυκεντρική ευρωπαϊκή μελέτη έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των διεισδυτικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στα παιδιά και να αναλυθούν οι παράγοντες που σχετίζονται με τη βαρύτητα τους. Παιδιά με διεισδυτική λοίμωξη της κοινότητας από *S. aureus* από 13 κέντρα σε επτά Ευρωπαϊκές χώρες μελετήθηκαν προοπτικά για χρονικό διάστημα δύο ετών (2012-2014). Σοβαρή λοίμωξη ορίστηκε αυτή που ο άρρωστος κατέληξε ή εισήχθη σε ΜΕΘ λόγω αιμοδυναμικής αστάθειας ή αναπνευστικής ανεπάρκειας. Συνολικά 152 παιδιά (88 αγόρια) συμπεριλήφθησαν, μέσης ηλικίας 7.2 έτη (IQR, 1.3-11.9). Εικοσιέξι (17%) παιδιά είχαν σοβαρή λοίμωξη, τα τρία (2%) κατέληξαν. Η επίπτωση των PVL-θετικών λοιμώξεων ήταν 18.6% και των MRSA 7.8%. Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η πνευμονία, η λευκοπενία στην εισαγωγή (<3000 λευκά/μl) και το PVL-θετικό στέλεχος ήταν οι μόνοι ανεξάρτητοι παράγοντες σχετιζόμενοι με σοβαρή έκβαση [91]. Δεν υπήρξε διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ MSSA και MRSA στελεχών. Στη δική μας μελέτη και ειδικά στη μελέτη της σταφυλοκοκκικής πνευμονίας καταλήξαμε σε παρόμοια συμπεράσματα [77].

Σταφυλοκοκκική πνευμονία της κοινότητας σε παιδιά

Στην παιδιατρική πνευμονία της κοινότητας (CAP) ο *S. pneumoniae* και ο *S. aureus* ήταν τα συχνότερα απομονωθέντα βακτηριακά παθογόνα μεταξύ ασθενών με θετικές καλλιέργειες αίματος ή πλευριτικού υγρού. Η μελέτη αυτή είναι μοναδική γιατί εξέτασε αυτή τη σπάνια βακτηριακή λοίμωξη σε παιδιά που νοσηλεύθηκαν σε δυο μεγάλα παιδιατρικά νοσοκομεία σε χώρα με υψηλή επίπτωση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από MRSA. Αντίθετα, μέχρι σήμερα υπάρχουν μόνο λίγες μεμονωμένες αναφορές περιπτώσεων από ευρωπαϊκά κέντρα [92-94]. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 4.2 μήνες, μικρά βρέφη, γεγονός που συμφωνεί με την πρώτη μελέτη που δημοσιεύθηκε το 1982 από τους Chartrand SA και McCracken GH [95]. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ διαφόρων χαρακτηριστικών όπως ηλικία, εθνικότητα, ακτινολογική εικόνα, επιπλοκές της νόσου (συμμετοχή πολλών λοβών, πνευματοκήλες, εμπύημα, απόστημα ή εξέλιξη σε νεκρωτική πνευμονία) με την ευαισθησία ή μη του σταφυλοκόκκου στη μεθικιλλίνη.

Στην περιοχή μας ο MRSA επικρατεί ως αίτιο σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της παιδικής ηλικίας. Παρόμοια είναι και τα ευρήματα από πρόσφατη αμερικανική μελέτη,

όπου μεταξύ 117 περιστατικών σταφυλοκοκκικής πνευμονίας το αίτιο ήταν MRSA στο 74% των περιπτώσεων [96]. Και από την παρούσα μελέτη του εύρους των διεισδυτικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων διαπιστώνεται ένας ειδικός τροπισμός του MRSA-PVL-θετικού στελέχους για την πρόκληση πνευμονίας. Το ποσοστό των MRSA στη μελέτη μας ήταν 41.2% επί των CA-λοιμώξεων, 33.3% επί των οστεοαρθρικών λοιμώξεων και 86.4% στην πνευμονία για το νοσοκομείο μας, 75.6% και για τα δύο παιδιατρικά νοσοκομεία. Ο *S. aureus* προκαλεί πνευμονία είτε από επινέμηση του πνευμονικού παρεγχύματος από το τραχειοβρογχικό δένδρο ή αιματογενώς. Στην παρούσα μελέτη είχαμε δύο περιστατικά με σύγχρονη οστεομυελίτιδα και πνευμονία από MRSA. Η σύγχρονη πνευμονική συμμετοχή του MRSA σε μία οστεοαρθρική λοίμωξη δεν είναι σπάνια και έχει αναφερθεί και αλλού [97]. Γνωρίζουμε ότι στην Ελλάδα ενδημεί ο ST80-*mecA*-PVL-θετικός κλώνος, ο οποίος φαινοτυπικά εμφανίζεται ανθεκτικός στα φουσιδικό οξύ, καναμυκίνη και τετρακυκλίνη [38,44]. Είναι γενικά παραδεκτό και συμφωνούν και τα ευρήματα της μελέτης μας ότι η PVL λευκοκτονίνη σχετίζεται με την πρόκληση πνευμονίας από στελέχη *S. aureus* [10]. Αντίστοιχα και εδώ όλα πλην ενός από τα MRSA στελέχη ήταν PVL-θετικά και από τους MSSA τρία στα πέντε στελέχη. Οι Thomas B. et al. δημοσίευσαν μια σειρά περιστατικών όπου PVL-θετικά-MSSA στελέχη προκάλεσαν πνευμονία με επιπλοκές, όπως πνευματοκήλες, εμπύημα, απόστημα πνεύμονα, πνευμοθώρακα [98]. Οι Diep BA et al. απέδειξαν με πειραματικό μοντέλο σταφυλοκοκκικής πνευμονίας σε κουνέλι την έντονη συσχέτιση της λοίμωξης με την PVL τοξίνη [20].

Όλα πλην δύο στελεχών στην παρούσα μελέτη ήταν θετικά για το γονίδιο *fnbA* υπεύθυνο για την fibronectin binding protein A, βασικό μεσολαβητή της προσκόλλησης του παθογόνου στους βλεννογόνους και ειδικά στο αδιαφοροποίητο αναπνευστικό επιθήλιο [99]. Η SpA και ο ClfA δεν παίζουν ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία [99].

Η νεκρωτική πνευμονία είναι μια ασυνήθης επιπλοκή της CAP στα παιδιά. Συνηθέστερο αίτιο είναι ο *S. pneumoniae* και δευτερευόντως ο *S. aureus*. Στην περίπτωση αυτή συνδέεται με PVL-θετικά στελέχη *S. aureus*. Σε πρόσφατη μελέτη από τη Γαλλία, σε 41 περιστατικά νεκρωτικής πνευμονίας, στα 21 απομονώθηκε βακτηριακό αίτιο, με τον *S. aureus* υπεύθυνο για 13/21 από αυτά τα περιστατικά. Ένα μόνο στέλεχος ήταν MRSA, τα υπόλοιπα ήσαν MSSA-PVL-θετικά [92].

Η θνητότητα στη μελέτη μας ήταν χαμηλή (4.9%) σε σύγκριση με το 39% που παρατηρήθηκε σε γαλλική μελέτη από 133 περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής-PVL-θετικής

πνευμονίας σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες με διάμεση ηλικία τα 22 έτη. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το ερύθημα του δέρματος, η αιμορραγία στο βρογχικό δέντρο και η λευκοπενία ήταν προγνωστικοί παράγοντες που συσχετίζονταν με τη θνητότητα [21]. Αντίθετα, σε άλλη μελέτη από τις ΗΠΑ, η θνητότητα στα παιδιά ήταν πολύ χαμηλή (0.85%) [96]. Η πρόσφατη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης αναφέρεται ως αίτιο που αυξάνει την επίπτωση σοβαρής σταφυλοκκοκικής πνευμονίας [100,101]. Και στη μελέτη μας οι δύο θάνατοι που συνέβησαν αφορούσαν σε ασθενείς με γρίπη, οι οποίοι εμφάνισαν και λευκοπενία. Η τελευταία αναφέρεται ως δείκτης κακής πρόγνωσης της λοίμωξης. Σε γαλλική μελέτη 62 περιπτώσεων με PVL-θετικό *S. aureus* και αριθμό λευκών στο περιφερικό αίμα <3000/μl αναφέρεται θνητότητα 75.8%. [102].

Η πλειονότητα των περιστατικών της παρούσας μελέτης απαίτησαν επεμβατική πράξη για την παροχέτευση του πλευριτικού εξιδρώματος με τοποθέτηση θωρακικού σωλήνα ή αποφλοίωση πετάλου του υπεζωκότα. Στην περίπτωση εμπυήματος η συντηρητική μόνο αντιμετώπιση με αντιβιοτικά δεν είναι επαρκής και παρατείνει τη διάρκεια νοσηλείας [103]. Αν και η κλινδαμυκίνη ενδείκνυται ως κατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία, στην παρούσα μελέτη η αντοχή σε αυτήν ήταν υψηλή (26.8%) και υψηλότερη από το μέσο όρο αντοχής 17.8% όλων των MRSA στελεχών της κοινότητας που απομονώθηκαν το αντίστοιχο χρονικό διάστημα (n=1394 για το διάστημα 2007-2016). Επομένως, ο ρόλος της εμπειρικής μονοθεραπείας με κλινδαμυκίνη στη σταφυλοκοκκική πνευμονία είναι επισφαλής. Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεΐνοσύνθεση όπως η κλινδαμυκίνη και η λινεζολίδη μειώνουν την παραγωγή PVL, SpA και Hla από το βακτήριο. Αυτό δεν ισχύει για τη βανκομυκίνη. Εντούτοις, δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να δείχνουν βελτιωμένο κλινικό αποτέλεσμα με την χρήση λινεζολίδης έναντι της βανκομυκίνης στην πνευμονία της κοινότητας από MRSA. Οι οδηγίες του IDSA χαρακτηρίζουν ως εναλλακτική θεραπεία και όχι αντιβιοτικό πρώτης γραμμής τη λινεζολίδη για τη θεραπεία της λοίμωξης αυτής σε παιδιά ηλικίας άνω των 3 μηνών [104].

Συμπερασματικά, από τη μελέτη αυτή καταδεικνύεται ο ιδιαίτερος «τροπισμός» του MRSA-ST80-IV/PVL-θετικού κλώνου στην πρόκληση της σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας στα παιδιά. Τα στελέχη αυτά είναι συχνά ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη. Η βέλτιστη αντιμετώπιση περιλαμβάνει παροχέτευση της πλευριτικής συλλογής σε συνδυασμό με κατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία. Η θεραπευτική επιτυχία της βανκομυκίνης παραμένει, παρά τις σχετικά υψηλές MICs (≥1 mg/l) σε όλες τις

περιπτώσεις.

Συμπερασματικά στα επιμέρους τμήματα αυτής της μελέτης προέκυψε:

- Μείωση της επίπτωσης του MRSA στις λοιμώξεις της κοινότητας. Για τα έτη 2015 και 2016 είναι σε ποσοστό<20%. Μεταξύ 2016 και 2007 η πτώση του MRSA ήταν 48.5%.

- Η ανάδυση ενός κλώνου MSSA-ST121 από το 2013, με αντοχή στα τοπικά αντιμικροβιακά, που παράγει επιδερμολυσίνες και ευθύνεται για περιστατικά Μολυσματικού κηρίου σε παιδιά της κοινότητας.

- Ο MRSA-ST80-PVL-θετικός κλώνος (Ευρωπαϊκός κλώνος) είναι το κύριο αίτιο της σταφυλοκοκκικής πνευμονίας της κοινότητας στα παιδιά, με αρκετά υψηλό ποσοστό αντοχής στην κλινδαμυκίνη.

Με τη διασπορά των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών στην κοινότητα αλλά και σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας, η κατάσταση γίνεται δύσκολη και το μέλλον στον περιορισμό των λοιμώξεων από *S. aureus* φαίνεται να είναι η ανακάλυψη εμβολίου και η εφαρμογή του στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Το εμβόλιο SA4Ag μετά από πολλαπλές αποτυχίες διαφόρων αντιγόνων που δοκιμάστηκαν, φαίνεται να αφήνει ένα παράθυρο ελπίδας για τη χρήση του σε προηγμένες χώρες και σε ειδικές κατηγορίες ασθενών, αλλά μιας και όσο αναμένονται τα αποτελέσματα μελετών φάσης ΙΙ, είναι αρκετά νωρίς να αναμένουμε νίκη κατά των σοβαρών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από εμβολιασμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. W. Winn Jr SA, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger, G. Woods, ed. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, *Staphylococci* and Related Gram-positive cocci, Ch. 12. 6th ed: Lippincott Williams and Wilkins 2006.
2. Lazarevic V, Beaume M, Corvaglia A, Hernandez D, Schrenzel J, Francois P. Epidemiology and virulence insights from MRSA and MSSA genome analysis. Future Microbiol 2011;6:513-32.
3. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006;5:2.
4. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010;23:616-87.
5. Yok-Ai Que PM. Mandell, Douglas, and Bennett's, Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. ed: Churchill, Livingstone Elservier 2010; 2010.
6. FDA Guideline ABSSSI 2013. Available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm071185.pdf. . In; Accessed October 20, 2014.
7. Pollack CV, Jr., Amin A, Ford WT, Jr., et al. Acute bacterial skin and skin structure infections (ABSSSI): practice guidelines for management and care transitions in the emergency department and hospital. J Emerg Med 2015;48:508-19.
8. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. Nat Rev Immunol 2011;11:505-18.
9. Ericson JE, Popoola VO, Smith PB, et al. Burden of Invasive *Staphylococcus aureus* Infections in Hospitalized Infants. JAMA Pediatr 2015;169:1105-11.
10. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002;359:753-9.

11. Howard LS, Sillis M, Pasteur MC, Kamath AV, Harrison BD. Microbiological profile of community-acquired pneumonia in adults over the last 20 years. J Infect 2005;50:107-13.
12. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999;29:1128-32.
13. Peltola H, Paakkonen M. Acute osteomyelitis in children. N Engl J Med 2014;370:352-60.
14. Montgomery CO, Siegel E, Blasier RD, Suva LJ. Concurrent septic arthritis and osteomyelitis in children. J Pediatr Orthop 2013;33:464-7.
15. G. L. Darmstadt RS. Cutaneous bacterial infections. In: Behrman R. KR, Jenson H., ed. Nelson textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders; 2004:2222-7.
16. Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Pharmacol 2005;5:479-89.
17. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol 2014;12:49-62.
18. Grumann D, Nubel U, Broker BM. *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. Infect Genet Evol 2014;21:583-92.
19. Sampedro GR, DeDent AC, Becker RE, et al. Targeting *Staphylococcus aureus* alpha-toxin as a novel approach to reduce severity of recurrent skin and soft-tissue infections. J Infect Dis 2014;210:1012-8.
20. Diep BA, Chan L, Tattevin P, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:5587-92.
21. Sicot N, Khanafer N, Meyssonnier V, et al. Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia--results of a prospective observational study. Clin Microbiol Infect 2013;19:E142-8.
22. Ritz N, Curtis N. The role of Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus musculoskeletal infections in children. Pediatr Infect Dis J 2012;31:514-8.

23. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest 2007;87:3-9.
24. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin as a cause of acute osteomyelitis in children. Clin Microbiol Infect 2007;13:651-4.
25. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2013;13:43-54.
26. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel) 2010;2:1148-65.
27. Otto M. Phenol-soluble modulins. Int J Med Microbiol 2014;304:164-9.
28. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. PLoS One 2010;5:e15177.
29. Seidl K, Chen L, Bayer AS, Hady WA, Kreiswirth BN, Xiong YQ. Relationship of agr expression and function with virulence and vancomycin treatment outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:5631-9.
30. Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Infect Immun 2011;79:1927-35.
31. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007;13:222-35.
32. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2014;22:42-7.
33. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48:707-10.
34. Diep BA, Chambers HF, Graber CJ, et al. Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. Ann Intern Med 2008;148:249-57.

35. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis 2010;10:227-39.
36. David MZ, Glikman D, Crawford SE, et al. What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? J Infect Dis 2008;197:1235-43.
37. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. In: Control. ECfDPa, ed.: Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2013.
38. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, et al. A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? Clin Microbiol Infect 2014;20:O796-803.
39. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. Clin Microbiol Infect 2006;12:29-34.
40. Chini V, Petinaki E, Meugnier H, et al. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. Scand J Infect Dis 2008;40:368-72.
41. Sola C, Paganini H, Egea AL, et al. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. PLoS One 2012;7:e30487.
42. Ι. Δ ΚΥΡΙΑΖΗΣ ΜΕΚ, Κ. ΠΟΥΛΑΣ, Γ.Π ΠΑΤΡΙΝΟΣ. Μοριακές τεχνικές. για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014:23-40.
43. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
44. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:831-7.
45. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;239:487-91.

46. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 2009;7:629-41.
47. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. Future Microbiol 2009;4:565-82.
48. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010;23:99-139.
49. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Information Supplement. CLSI document M100-S22.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.: CLSI; 2012.
50. Kos VN, Desjardins CA, Griggs A, et al. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin-resistant S. aureus hospital-acquired infection in the United States. MBio 2012;3.
51. van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2012;54:755-71.
52. Szabo J. hVISA/VISA: diagnostic and therapeutic problems. Expert Rev Anti Infect Ther 2009;7:1-3.
53. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. J Clin Microbiol 2011;49:177-83.
54. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. Clin Infect Dis 2008;46:668-74.
55. Richter SS, Satola SW, Crispell EK, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. J Clin Microbiol 2011;49:4203-7.

56. Magana M, Ioannidis A, Magiorkinis E, et al. Therapeutic options and emerging alternatives for multidrug resistant staphylococcal infections. Curr Pharm Des 2015;21:2058-72.
57. Bonilla H, Huband MD, Seidel J, et al. Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a cfr-containing strain. Clin Infect Dis 2010;51:796-800.
58. Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA. Mupirocin resistance. Clin Infect Dis 2009;49:935-41.
59. Lorian V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th edition ed; 1996.
60. Fowler VG, Jr., Proctor RA. Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? Clin Microbiol Infect 2014;20 Suppl 5:66-75.
61. Salgado-Pabon W, Schlievert PM. Models matter: the search for an effective Staphylococcus aureus vaccine. Nat Rev Microbiol 2014;12:585-91.
62. Giersing BK, Dastgheyb SS, Modjarrad K, Moorthy V. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. Vaccine 2016;34:2962-6.
63. https://www.fda.gov/downloads/.../UCM583779.pdf.
64. Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2006;367:731-9.
65. Hung WC, Chen HJ, Lin YT, et al. Skin Commensal *Staphylococci* May Act as Reservoir for Fusidic Acid Resistance Genes. PLoS One 2015;10:e0143106.
66. Kikuta H, Shibata M, Nakata S, et al. Predominant Dissemination of PVL-Negative CC89 MRSA with SCCmec Type II in Children with Impetigo in Japan. Int J Pediatr 2011;2011:143872.
67. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. erm(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother 2004;53:814-7.
68. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2637-51.

69. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2155-61.
70. Rahim S, Pillai SK, Gold HS, Venkataraman L, Inglima K, Press RA. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2003;36:E146-8.
71. Straub JA, Hertel C, Hammes WP. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. Journal of food protection 1999;62:1150-6.
72. Rahim S, Pillai SK, Gold HS, Venkataraman L, Inglima K, Press RA. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. Clin Infect Dis 2003;36:E146-8.
73. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002;70:631-41.
74. Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H. Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:366-79.
75. Zhang K, Sparling J, Chow BL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative *staphylococci*. J Clin Microbiol 2004;42:4947-55.
76. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. Appl Environ Microbiol 2003;69:18-23.
77. Doudoulakakis AG, Bouras D, Drougka E, et al. Community-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia among Greek children: epidemiology, molecular characteristics, treatment, and outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016;35:1177-85.
78. Sutter DE, Milburn E, Chukwuma U, Dzialowy N, Maranich AM, Hospenthal DR. Changing Susceptibility of *Staphylococcus aureus* in a US Pediatric Population. Pediatrics 2016;137.

79. Rolain JM, Abat C, Brouqui P, Raoult D. Worldwide decrease in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do we understand something? Clin Microbiol Infect 2015;21:515-7.
80. Petinaki E, Spiliopoulou I, Kontos F, et al. Clonal dissemination of mupirocin-resistant *staphylococci* in Greek hospitals. J Antimicrob Chemother 2004;53:105-8.
81. Lamy B, Laurent F, Gallon O, Doucet-Populaire F, Etienne J, Decousser JW. Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among *Staphylococcus aureus* isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:1279-84.
82. O'Neill AJ, Larsen AR, Henriksen AS, Chopra I. A fusidic acid-resistant epidemic strain of *Staphylococcus aureus* carries the fusB determinant, whereas fusA mutations are prevalent in other resistant isolates. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3594-7.
83. Rortveit S, Skutlaberg DH, Langeland N, Rortveit G. Impetigo in a population over 8.5 years: incidence, fusidic acid resistance and molecular characteristics. J Antimicrob Chemother 2011;66:1360-4.
84. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): Breakpoint tables for interpretations of MICs and zone diameters. Version 1.1, April 2010. [http://www.eucast.org/ fileadmin/ src/ media/ PDFs/ EUCAST_files/ Disk_test_documents/ EUCAST_breakpoints_v1.1.pdf. 2010.
85. Rortveit S, Skutlaberg DH, Langeland N, Rortveit G. The decline of the impetigo epidemic caused by the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone: an 11.5-year population-based incidence study from a community in Western Norway. Scand J Infect Dis 2014;46:832-7.
86. Kurt K, Rasigade JP, Laurent F, et al. Subpopulations of *Staphylococcus aureus* clonal complex 121 are associated with distinct clinical entities. PLoS One 2013;8:e58155.
87. McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* causing recurrent skin and soft tissue infections in children. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:2431-3.

88. Antonov NK, Garzon MC, Morel KD, Whittier S, Planet PJ, Lauren CT. High prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from a pediatric population. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:3350-6.
89. Baba-Moussa L, Sina H, Scheftel JM, et al. Staphylococcal Panton-Valentine leucocidin as a major virulence factor associated to furuncles. PLoS One 2011;6:e25716.
90. Leekha S, Diekema DJ, Perencevich EN. Seasonality of staphylococcal infections. Clin Microbiol Infect 2012;18:927-33.
91. Gijon M, Bellusci M, Petraitiene B, et al. Factors associated with severity in invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children: a prospective European multicentre study. Clin Microbiol Infect 2016;22:643 e1-6.
92. Lemaitre C, Angoulvant F, Gabor F, et al. Necrotizing pneumonia in children: report of 41 cases between 2006 and 2011 in a French tertiary care center. Pediatr Infect Dis J 2013;32:1146-9.
93. Haider S, Wright D. Panton-Valentine leukocidin *Staphylococcus* causing fatal necrotising pneumonia in a young boy. BMJ Case Rep 2013;2013.
94. Trieu TV, Gaudelus J, Lefevre S, et al. Sudden death caused by *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin gene in a young girl. BMJ Case Rep 2009;2009.
95. Chartrand SA, McCracken GH, Jr. Staphylococcal pneumonia in infants and children. Pediatr Infect Dis 1982;1:19-23.
96. Carrillo-Marquez MA, Hulten KG, Hammerman W, Lamberth L, Mason EO, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus* pneumonia in children in the era of community-acquired methicillin-resistance at Texas Children's Hospital. Pediatr Infect Dis J 2011;30:545-50.
97. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 2005;41:583-90.
98. Thomas B, Pugalenthi A, Chilvers M. Pleuropulmonary complications of PVL-positive *Staphylococcus aureus* infection in children. Acta Paediatr 2009;98:1372-5.
99. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. Infect Immun 2002;70:620-30.

100. Hageman JC, Uyeki TM, Francis JS, et al. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. Emerg Infect Dis 2006;12:894-9.

101. Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, et al. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. Ann Emerg Med 2009;53:358-65.

102. Khanafer N, Sicot N, Vanhems P, et al. Severe leukopenia in *Staphylococcus aureus*-necrotizing, community-acquired pneumonia: risk factors and impact on survival. BMC Infect Dis 2013;13:359.

103. Chibuk T, Cohen E, Robinson J, Mahant S, Hartfield D. Paediatric complicated pneumonia: Diagnosis and management of empyema. Paediatr Child Health 2011;16:425-9.

104. Otto MP, Martin E, Badiou C, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2013;68:1524-32.

105. Cadilla A, David MZ, Daum RS, Boyle-Vavra S. Association of high-level mupirocin resistance and multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureu*s at an academic center in the midwestern United States.J Clin Microbiol. 2011 Jan;49(1):95-100.