



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα:

**Ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν παθογόνους
παράγοντες, εντεροτοξίνες και υπερ-αντιγόνα σε στελέχη
Staphylococcus aureus
στην περιοχή Θεσσαλίας**

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: Νικολάου Σοφία

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Πετεινάκη Έφη
Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα, 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5195/1
Ημερ. Εισ.: 31-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΝΙΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087321

Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	σελ 3
2. Εισαγωγή.....	σελ 4
i. Μορφολογία.....	σελ 4
ii. Ανάπτυξη.....	σελ 5
iii. Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος.....	σελ 5
iv. Βιοχημικές Ιδιότητες.....	σελ 6
v. Αντιγονική Σύσταση.....	σελ 6
vi. Τοξίνες και ένζυμα.....	σελ 7
vii. Ένζυμα που αναζητούνται για την ταυτοποίηση των	
viii. σταφυλοκόκκων.....	σελ 10
ix. Οικολογία.....	σελ 12
3. Νόσοι από τον S.Aureus.....	σελ 12
4. Εργαστηριακή διάγνωση Σταφυλοκοκκικών νόσων.σελ 16	
I. Μικροβιακές εξετάσεις.....	σελ 16
II. Ορολογικές.....	σελ 17
III. Επιδημιολογικές.....	σελ 18
i. Το αντιβιογράμμα.....	σελ 18
ii. Λυσιτυπία.....	σελ 18
iii. Ανάλυση χρωμοσωμικό DNA.....	σελ 19
iv. Πλασμιδιοτυπία.....	σελ 19
6. Σκοπός.....	σελ 20
7. Υλικά και μέθοδοι.....	σελ 20
7.1 Δείγματα.....	σελ 20
7.2 Απομόνωση DNA.....	σελ 20
7.3 Ανίχνευση των γονιδίων αντοχής με τη βοήθεια	
της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. σελ 21	
7.3.1.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR ...σελ 21	
7.3.2.Αντίδραση της ενίσχυσης.....	σελ 22
7.3.3 Χαρακτηριστικά της Taq πολυμεράσης.....	σελ 24
7.3.4.Συνθήκες της αντίδρασης.....	σελ 25
8. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	σελ 25
9. Αποτελέσματα.....	σελ 33
10. Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	σελ 37
11.Βιβλιογραφίες- Αναφορές.....	σελ 38

Ευχαριστίες

Περισσότερο από όλους θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υπεύθυνη καθηγήτρια μου κ. Έφη Πετεινάκη, που η βοήθεια της ήταν πολύτιμη καθόλη την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης ευχαριστώ όλα τα άτομα με τα οποία ήμασταν στο ίδιο εργαστηριακό χώρο για την κατανόηση και συμπαράσταση τους καθώς και τον κ. Σταθόπουλο, που με κατεύθυνε στην προσπάθεια μου να επλέξω διπλωματική εργασία. Φυσικά όλα αυτά ήταν εφικτά με την πολύτιμη υποστήριξη της μητέρας μου, Δήμητρας.

1.Περίληψη

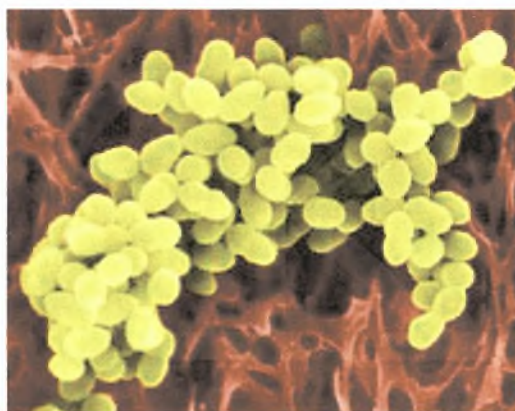
Σε στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών στην περιοχή της Θεσσαλίας μελετήθηκε η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν αντίστοιχες τοξίνες, υπεύθυνες για διάφορα κλινικά σύνδρομα. Οι κυριότερες σταφυλοκοκκικές τοξίνες είναι η τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας και μια σειρά εντεροτοξινών, ενώ τα γονίδια που τις κωδικοποιούν είναι αντιστοίχως το *tst-1* και τα γονίδια *seo, sei, seg, sem* και *sen*. Σε ένα σύνολο 260 στελεχών *S. aureus*, το 58% των στελεχών βρέθηκε ότι έφερε ένα τουλάχιστον από τα εξεταζόμενα γονίδια, ποσοστό αρκετά υψηλό σε σχέση με αυτό που περιγράφεται σε αντίστοιχη μελέτη που έγινε στην περιοχή τη Πάτρας. Το κυρίαρχο γονίδιο στα στελέχη της περιοχής μας ήταν το *seg* γονίδιο, που κωδικοποιεί μια εντεροτοξίνη. Ωστόσο, η ανίχνευση των γονιδίων δεν μπορεί να πιστοποιήσει και τη δυνατότητα παραγωγής των αντίστοιχων τοξινών.

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Staphylococcus Aureus

2.i Μορφολογία

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια των *Micrococcaceae*. Είναι *Gram* θετικοί κόκκοι διαμέτρου περίπου 1μm που διατάσσονται άτακτα σε μικρές ομάδες σαν τσαμπιά σταφυλιού ή σε σειρά από 4 το πολύ κόκκους (εικόνα 1). Είναι ακίνητοι, άσποροι, αερόβιοι. Δεν έχουν έλυτρο αλλά μερικά στελέχη αναπτύσσουν ένα λεπτό αμινογλυκουρονικό περίβλημα που προσδίδει σ'αυτά αντοχή στη φαγοκυττάρωση. Η αναπνοή τους γίνεται με κυτόχρωμα α και β τύπου. Η δε πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος έχει L-λυσίνη, οι δε ενδοπεπτιδικές γέφυρες συνίστανται από ολιγογλυκονικά πεπτίδια. Σ'αυτά οφείλεται η ευαισθησία του στη λυσοσταφίνη.



Εικ.1. Τυπική απεικόνιση S.aureus

Μικροβιακές ιδιότητες

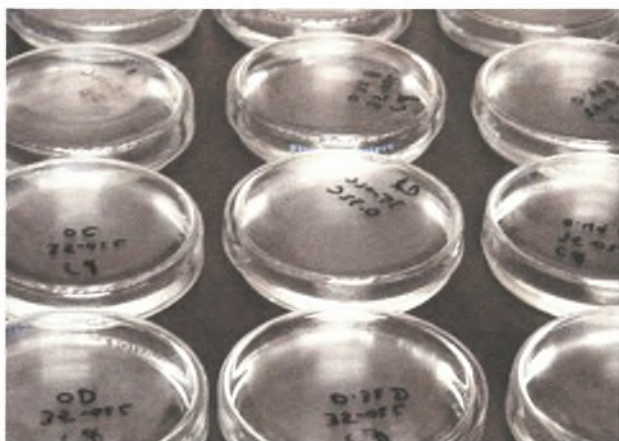
Είναι μικρόβιο ανθεκτικό στη ξήρανση που υφίστανται στον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και στη θέρμανση στους 56° C για 30 min. Αντέχει σε μεγάλες πυκνότητες NaCl μέχρι 9 ή 10% στον υδράργυρο, στο κάδμιο, στο αρσενικό και σε άλλα μέταλλα. Η αντοχή του αυτή στα μέταλλα ρυθμίζεται από γόνους που έχουν σχέση με τους γόνους που καθορίζουν την αντοχή του μικροβίου στην πενικιλίνη. Συχνά η αντοχή εμφανίζεται όχι σε όλο το καλλιέργημα αλλά σε μεταλλάκτες. Είναι ευαίσθητο στην εξαχλωροφαίνη 3%, σε χρωστικές όπως το κρυσταλλικό ιώδες. Η αντοχή του εξαφανίζεται υπό την επίδραση ακριδίνης, ουρίας, ριφαμπικίνης κ.α.

Είναι μικρόβιο αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο. Ευνοϊκή θερμοκρασία αναπτύξεως του είναι η των 35° - 37° C και ακραία όρια 10° - 42° C. Κάποια στελέχη απαιτούν παρουσία 2-10% CO₂.

2.ii. Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά

Οι αποικίες του στα **άγαρ** είναι κυκλικές, σχετικά μεγάλες, με διάμετρο περί τα 1-3 mm μετά από 24ωρη επώαση στους 37° C. Αν η επώαση παραταθεί μέχρι και 5 μέρες οι αποικίες μεγαλώνουν μέχρι 3-10 mm. Οι διαφορές στο μέγεθος των αποικιών χαρακτηρίζουν ορισμένα στελέχη του *S.aureus* και περιλαμβάνονται στους διαχωριστικούς χαρακτήρες των διαφόρων ειδών του γένους των σταφυλοκόκκων. Οι αποικίες του *S.aureus* μετά 3-5 ημέρες στην θερμοκρασία των 34° - 35° C και παραμονή επί 2 ημέρες στη θερμοκρασία δωματίου έχουν διάμετρο 6-8 mm και χρώμα κρεμο-κίτρινο πορτοκαλί. Στο **αιματούχο άγαρ** οι αποικίες περιβάλλονται από ζώνη αιμολύσεως διάφορης έντασης και έκτασης που εξαρτάται από το είδος των ερυθρών αιμοσφαιρίων που υπάρχουν στο άγαρ. Στο **MacConkey** αναπτύσσεται αργά και κάνει λεπτότερες, συμπαγέστερες και φουσκωτές αποικίες με ελαφρό ροζ χρώμα από τη διάσπαση της λακτόζης. Στο **αλατούχο άγαρ Charman** αναπτύσσεται καλά και κάνει αποικίες μικρές αλλά συμπαγείς και φουσκωτές μετά από 24-48 ώρες. Είναι υλικό εκλεκτικό για δείγματα πολυμικροβιακά. Αν στο υλικό υπάρχει μαννιτόλη και δείκτης τότε οι αποικίες είναι κίτρινες. Αναπτύσσεται σε **ζωμό** με χλωριούχο νάτριο 7% αλλά και μέχρι 10%. Προκαλεί ομοιομερή θολερότητα, όταν αναπτυχθεί σε ζωμό. Η ανάπτυξη είναι ταχεία και άφθονη.

Σε κάθε καλλιέργημα εμφανίζονται μεταλλάκτες με διαφορετικούς μορφολογικούς, καλλιεργητικούς και μεταβολικούς χαρακτήρες όπως π.χ. μέγεθος και τύπος αποικιών, παραγωγή ή μη χρωστικής, έκταση και μορφή αιμολύσεως, παραγωγή ή μη ορισμένων ενζύμων, αντοχή ή ευπάθεια προς αντιμικροβιακούς παράγοντες, μικρή ή μεγάλη παθογονικότητα.



Εικόνα 2. Διάφορα τρυβλία θετικά ως προς *S.aureus*

2.iii. Χρυσίζων σταφυλόκοκκος

Η χρυσίζουσα χρωστική εμφανίζεται μόνο στα στερεά θρεπτικά υλικά και επιτείνεται καθώς το 24ωρο καλλιέργημα παραμένει στο μπάγκο του εργαστηρίου στη θερμοκρασία του δωματίου. Επίσης αναπτύσσεται το χρώμα αφθονότερο και ταχύτερα αν στο υλικό υπάρχουν ειδικοί προαγωγοί της

χρωστικής ουσίας όπως η λακτόζη, η γλυκερίνη κ.ά. Σε αναερόβια ανάπτυξη δεν παράγεται η χρωστική.

2.iv. Βιοχημικές ιδιότητες:

© Σάκχαρα

Ο *Staphylococcus Aureus* διασπά τη γλυκόζη και τη μαννιτόλη αεροβίως αλλά και αναεροβίως. Αυτή είναι η βασικότερη βιοχημική διαφορά του από τους άλλους σταφυλόκοκκους και τους μικροκόκκους. Διασπά και πολλά άλλα σάκχαρα αργά με παραγωγή οξέος όχι όμως και αερίου όπως τη λακτόζη, τη μαλτόζη, τη σουκρόζη και την τρεχαλόζη. Δεν διασπά την αραβινόζη, τη σελλοβιόζη, την ινοσιτόλη, την ξυλόζη, τη ραφινόζη κ.α.

© Παράγει ινδόλη

© Δίνει θετικές τις αντιδράσεις ερυθρού του μεθυλίου (MR) και Voges-Proskauer (VP)

© Ανάγει τα νιτρικά

© Διασπά την ουρία

© Μερικά στελέχη παράγουν ίχνη υδροθείου.

© Δεν υδρολύει την εσκουλίνη και το άμυλο, ρευστοποιεί όμως την πηκτή και πήζει το γάλα.

Οι κυριότερες βιοχημικές διαφορές εμφανίζονται μεταξύ στελεχών από τα ζώα. Έτσι έχουν διαχωρισθεί 6 διαφορετικοί βιότυποι από Α έως F αλλά όλοι οι *S.aureus* που απομονώνονται από τον άνθρωπο ανήκουν στον βιότυπο Α.

2.v. Αντιγονική σύσταση

Αντιγονικές ιδιότητες έχουν πολλές από τις δομικές ουσίες του μικροβιακού κυττάρου και ιδιαίτερα οι ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος. Τα πιο γνωστά αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος είναι τα εξής:

1. Η πεπτιδογλυκάνη με τις ολιγογλυκονικές γέφυρες. Από αυτήν αποτελείται το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος.

2. Τειχοϊικά οξέα. Αυτά είναι πολυμερή της γλυκερίνης ή της ριβιτίλης που διαπερνούν και συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη. Έτσι σχηματίζουν ένα αντιγόνο ισχυρό και εξαιρετικά ειδικό για το είδος.

3. Οι πρωτεΐνες. Ομάδες πρωτεϊνών στην επιφάνεια και μέσα στο πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης επιτελούν διάφορες, μη ακόμη απόλυτα γνωστές λειτουργίες. Μερικές δρουν σαν ένζυμα, άλλες σαν μέσα συνδέσεως με αντισώματα, με το συμπλήρωμα και άλλες κάπως πιο γνωστές για τη σύνδεση τους με τις αντιμικροβιακές ουσίες. Συγκεκριμένα οι πιο γνωστές πρωτεΐνες είναι οι εξής:

α.) Πενικιλλινোসυνδετικές πρωτεΐνες ή PBP (Penicillin Binding Proteins). Είναι 4 διαφορετικές και η πιο διαφορετική η PBP 2a που έχει σχέση με την εμφάνιση αντοχής στη μεθικιλίνη. Η πρωτεΐνη PBP-4 είναι τρανσπεπτιδάση και πενικιλλινάση.

β.) Πρωτεΐνη Α. Είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται μόνο στο κυτταρικό τοίχωμα του *S.aureus*. Έχει το ιδιαίτερο γνώρισμα ότι είναι ο δέκτης του Fc κλάσματος της IgG ανοσοσφαιρίνης. Καλύπτει εξωτερικά το σύμπλεγμα της πεπτιδογλυκάνης και των τειχοϊκών οξέων. Όταν ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης έλθει σε επαφή με την Α πρωτεΐνη τότε συνδέει τα Fc κλάσματα της με την Α πρωτεΐνη και κολλά πάνω στο σταφυλόκοκκο. Στη συνέχεια ξεδιπλώνεται το μόριο της ανοσοσφαιρίνης, προβάλλουν ελεύθερα τα δυο Fab κλάσματα της και με αυτά συνδέει το ειδικό αντιγόνο. Η ιδιότητα αυτή της Α πρωτεΐνης χρησιμοποιείται σήμερα σε πολλές ορολογικές αντιδράσεις αναζήτησης αντιγόνων όταν διαθέτουμε το αντίσωμα σαν **δοκιμή επισυγκολλησεως**. Ίσως συμβάλλει στην παθογόνο δράση παρεμβαίνοντας στη φαγοκυττάρωση.

4. Το έλυτρο. Όταν υπάρχει προσδίδει τοξικότητα και εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση. Τα περισσότερα από νόσους του ανθρώπου στελέχη δεν έχουν έλυτρο.

2.vi Τοξίνες και ένζυμα

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος παράγει περί τις 30 τοξίνες που οι περισσότερες είναι ένζυμα. Οι καθ'αυτό τοξικές ουσίες που έχουν σχέση με την παθογόνο δράση του μικροβίου είναι οι εξής:

α.) Αιμολυσίνες. Έχουν διαχωρισθεί 4 αιμολυσίνες οι α, β, γ και δ και μια ακόμη με το όνομα ε-λυσίνη που όμως δεν είναι ακόμη πολύ καλά μελετημένη. Οι ιδιότητες των τοξινών αυτών είναι οι εξής:

α-αιμολυσίνη. Είναι λεύκωμα θερμοευαίσθητο, που αδρανοποιείται πληρέστερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρά στους 100° C. Παράγεται από τα περισσότερα στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου όχι όμως και από όλα. Έχει τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες. Είναι ουσία αιμολυτική για τα ερυθρά αιμοσφαίρια κουνελιού και προβάτου, ελαφρά για τα του ανθρώπου όχι όμως για τα του ίππου. Είναι θανατηφόρος και δερμονεκρωτική για το κουνέλι.

Συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και των λευκών και των αιμοπεταλίων. Προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων δηλαδή αιμόλυση και θάνατο των λευκών και των αιμοπεταλίων. Δρα επί των λείων μυϊκών ινών ιστών και αγγείων στα πειραματόζωα με αποτέλεσμα σύσπαση των μικρών αγγείων, στάση αίματος και ισχαιμική νέκρωση.

Είναι ουσία αντιγονική. Τα προς αυτήν αντισώματα εξουδετερώνουν την αιμολυτική της ικανότητα αλλά δεν προφυλάσσουν από νόσο σταφυλοκοκκική τα πειραματόζωα.

β-αιμολυσίνη. Είναι σφιγγομυελίνη. Παράγεται συνήθως από στελέχη που απομονώνονται από ζώα. Αιμολύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια μόνου του προβάτου και δεν αιμολύει τα ερυθρά του ανθρώπου και του κουνελιού. Είναι θανατηφόρος για το κουνέλι. Η αιμολυτική της δραστηριότητα στους 37° C σταματά μετά μία ώρα αλλά συνεχίζεται εάν το καλλιέργημα παραμείνει στους 10° C για 18 ώρες (φαινόμενο Hot-Cold). Ενισχύει την αιμολυτική ιδιότητα των στρεπτοκόκκων της Β-ομάδας και του αιμοφίλου της γρίππης και προκαλεί την αντίδραση CAMP.

δ-αιμολυσίνη. Μοιάζει πολύ με την α-αιμολυσίνη από την οποία δύσκολα διαχωρίζεται κατά τις τεχνικές αποχωρισμού των τοξινών από τα καλλιεργήματα. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της τοξίνης αυτής είναι ότι είναι εντονότατα αιμολυτική για τα ερυθρά του ανθρώπου και στην δράση της αυτή οφείλεται η εμφάνιση μεγάλης ζώνης β-αιμολύσεως στο αιματούχο άγαρ με αίμα ανθρώπου. Επίσης αιμολύει, ακόμη εντονότερα, τα ερυθρά ψαριού (της ρέγγας).

β.) Λευκοκτονίνες. Έχουν διαχωρισθεί δύο είδη ή κλάσματα η F (Fast) και η S (Slow). Λέγεται τοξίνη P από το όνομα των ερευνητών Panton και Valentin. Παράγονται από τα 50% περίπου των σταφυλοκόκκων. Σκοτώνουν τα λευκά αιμοσφαίρια του ανθρώπου και του κουνελιού. Τα λευκά υπό την επίδραση των τοξινών αυτών χάνουν την κινητικότητά τους, εξαφανίζονται τα κοκκία τους και το κύτταρο πεθαίνει αλλά δεν λύεται. Η δράση της τοξίνης αυτής εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η σημασία της στην παθογένεια των σταφυλοκοκκικών νόσων αποδίδεται στο ότι αδρανοποιεί τα μικροφαγοκύτταρα και τα κάνει ευάλωτα στη δράση των ενζύμων και τοξινών του μικροβίου. Είναι ουσίες θερμοευαίσθητες και έχουν δερμονεκρωτική ιδιότητα στο κουνέλι. Είναι αντιγονικές και αντισώματα προς αυτές βρίσκονται σε τίτλο ανερχόμενο στο αίμα πασχόντων από ενεργό σταφυλοκοκκική νόσο εφ' όσον ο σταφυλόκοκκος της νόσου παράγει τις

τοξίνες αυτές. Ανιχνεύονται με διάφορες ορολογικές μεθόδους όπως με τη μέθοδο της έμμεσης αιμοσυγκόλλησης. Τα αντισώματα αυτά είναι προστατευτικά για τις επαναμολύνσεις

γ) Εντεροτοξίνες. Είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, θερμοανθεκτικές, που αντέχουν στους 100° C για 30 min και ανθεκτικές στη δράση της τρυψίνης. Παράγονται από σταφυλοκόκκους κυρίως της βακτηριοφαγικής ομάδας III και IV, και λυσιτύπου 6/47. Έχουν διαχωρισθεί 5 εντεροτοξίνες βάσει της αντιγονικής των διαφοράς, οι A, B, C, D και E.

Οι γόνιμοι που ρυθμίζουν την παραγωγή των B και C είναι χρωμοσωμικοί ενώ οι της A και E βακτηριοφαγικοί και της D πλασμιδικός. Στο Εργαστήριο μπορούμε να επιτύχουμε την παραγωγή των εντεροτοξινών αυτών όταν καλλιεργήσουμε τα εντεροτοξιγόνα στελέχη παρουσία διοξειδίου του άνθρακα, νικοτινικού οξέος και θειαμίνης υπό συνεχή κίνηση αεροβίως. Στη φύση ο σταφυλόκοκκος παράγει εντεροτοξίνη όταν αναπτυχθεί σε τρόφιμο κατάλληλο και υπό κατάλληλες συνθήκες. Τροφές με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες όπως τα γαλακτερά, οι κρέμες, το τυρί, τα γλυκίσματα που διατηρήθηκαν εκτός ψυγείου με ζάχαρη (όπως τα κόλυβα) ή με κρέμα (όπως το γαλακτομπούρεκο) είναι αυτές στις οποίες εύκολα πολλαπλασιάζεται ο

σταφυλόκοκκος και εάν τύχει να είναι εντεροτοξινογόνος παράγει την τοξίνη του και προκαλεί τη χαρακτηριστική τροφική δηλητηρίαση. Από τις 5 εντεροτοξίνες η B είναι η συχνότερη στις τροφικές δηλητηριάσεις του ανθρώπου. Οι C και D παρατηρήθηκαν σε επιδημικές δηλητηριάσεις. Ευαίσθητοι στην εντεροτοξίνη του σταφυλοκόκκου είναι μόνο ο άνθρωπος και ο πίθηκος. Κανένα από τα γνωστά πειραματόζωα δεν παθαίνει δηλητηρίαση όταν του δοθεί από το στόμα η τοξίνη. Τα νεαρά γατάκια παθαίνουν αστάθεια βαδίσματος, έμετο και διάρροια όταν τα ενέσουμε ενδοπεριτοναϊκά με την τοξίνη. Φαίνεται ότι φέρεται στο κέντρο εμέτου στον εγκέφαλο μέσω των νευρικών υποδοχέων στομάχου και νήστιδος.

Ένα και το αυτό στέλεχος χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου μπορεί να παράγει δύο ειδών εντεροτοξίνες. Η παρουσία εντεροτοξίνης σε ένα καλλιέργημα ή σε ένα τρόφιμο ανιχνεύεται με ανοσολογικές μεθόδους εφόσον διαθέτουμε τους

ειδικούς αντιορούς. Η ανοσοδιάχυση, η RIA, η ELISA, η διπλής φορές ανοσοδιάχυση, η έμμεση ανοσογκόλληση και η συγκόλληση Latex σωματιδίων έχουν εφαρμοσθεί στα ειδικά κέντρα, τους ειδικούς αντιορούς μπορεί κανείς να προμηθευτεί από τα Κέντρα αυτά.

Αποφολιδωτική τοξίνη

Παράγεται μόνο από ορισμένα στελέχη του λυσιτύπου 71 της βακτηριοφαγικής ομάδας II και είναι δύο, Α και Β. Είναι από τους σταφυλοκόκκους που συνήθως αποικίζουν τη μύτη. Είναι πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, οξυάντοχη και θερμοάντοχη. Ευαίσθητα στην τοξίνη αυτή είναι το δέρμα του νεογέννητου ανθρώπου και ποντικού. Αν ενεθεί σε νεογέννητο ποντικό ενδοπεριτοναϊκά μέσα σε λίγες ώρες εμφανίζεται ερυθρότητα του δέρματος και αποφολίδωση της επιδερμίδας. Στον άνθρωπο προκαλεί την τοξική επιδερμική νεκρόλυση (fEN) ή σύνδρομο ζεματισμένου δέρματος (scalded skin syndrome) στα νεογνά. Στους ενήλικες συμμετέχει στις φαρμακευτικές αποφολιδωτικές δερματοπάθειες. Η παραγωγή της Α ρυθμίζεται από χρωμόσωμα και της Β από πλασμίδιο. Η τοξίνη αυτή μαζί με την εντεροτοξίνη και την τοξίνη του συνδρόμου του τοξικού «σοκ» είναι οι τοξίνες του σταφυλοκόκκου που προκαλούν μόνες τους τα αντίστοιχα νοσήματα. Στις άλλες σταφυλοκοκκικές νόσους δεν υπάρχει ορισμένη τοξίνη. Ανιχνεύεται μέσα στο υγρό των φυσαλίδων με ανοσολογικές μεθόδους (RIA, PCR κ.ά)

Τοξίνη του συνδρόμου τοξικού σοκ ή TSST-1

Είναι μια εξωτοξίνη που παράγεται από τον *S. aureus* της βακτηριοφαγικής ομάδας I λυσιτύπου 29 ή άλλου της αυτής ομάδας. Ο λυσίτυπος αυτός δεν αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα ή του δέρματος. Η παραγωγή της ρυθμίζεται από το χρωμοσωμικό *tst* γονίδιο. Καλείται TSST-I από τη νόσο που προκαλεί, Toxic Shock Syndrome. Το συγκεκριμένο σύνδρομο χαρακτηρίζεται από διάρροια και πυρετό. Έχει πυρετογόνο δράση στα πειραματόζωα, ενισχύει την ευπάθεια του ανθρώπου στη δράση των ενδοτοξινών και προφανώς επιφέρει αναστολή στη σύνθεση των ανοσοσφαιρινών. Προκαλεί ευρύ φάσμα οργανικών και λειτουργικών διαταραχών που οδηγούν στην εκδήλωση βαρέος θανατηφόρου σοκ. Παράγεται εν αφθονία στις *in vitro* σε υγρά υλικά καλλιέργειες του σταφυλοκόκκου που φέρει τον *tst* γόνο. Η παραγωγή είναι αφθονότερη όταν οι συνθήκες καλλιέργειάς του είναι λιγότερο ευνοϊκές, π.χ. σε μείωση των ιόντων μαγνησίου. Είναι ουσία αντιγονική και προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων απόλυτα ειδικών που εμφανίζονται στο αίμα κατά την ανάρρωση και παραμένουν για πολλούς μήνες. Κατά την πορεία της νόσου στο αίμα ανιχνεύεται η ίδια η TSST-1. Τα αντισώματα για την τοξίνη αυτή φαίνεται ότι προστατεύουν από τη νόσο. Ένδειξη για την υπόθεση αυτή είναι η παρατήρηση ότι δεν βρέθηκαν αντι-TSST-I αντισώματα στο αίμα γυναικών στην οξεία φάση του συνδρόμου. Αντίθετα, τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό 82% στο αίμα υγιών γυναικών.

Οι τοξίνες, TSST-1 και εντεροτοξίνες δρουν σαν υπερ-αντιγόνα, και ενεργοποιούν άμεσα τα Τ-κύτταρα. Σαν αποτέλεσμα απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες κυτοκινών, οι οποίες και ευθύνονται για το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας.

Υαλουρινιδάση

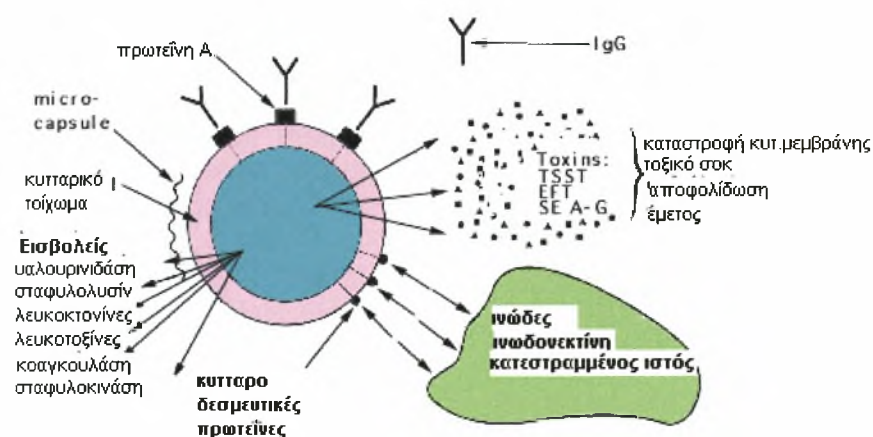
Είναι ένζυμο που διασπά το υαλουρονικό οξύ, προσδίδει διεισδυτικότητα στο μικρόβιο γι' αυτό λέγεται παράγων διασποράς. Παράγεται από τα 90% των στελεχών του *S. aureus*. Είναι ουσία αντιγονική και αντισώματα προς αυτή βρίσκονται στο αίμα των πασχόντων από σταφυλοκοκκική νόσο. Είναι διαφορετική από την υαλουρινιδάση του στρεπτοκόκκου.

Ινωδολυσίνη

Είναι ουσία που ενεργοποιεί το πλασμινογόνο του πλάσματος και προκαλεί λύση της ινικής. Η σημασία της στην παθογένεση των νόσων δεν είναι γνωστή αλλά εργαστηριακά μπορεί να προκαλέσει λύση του πηγματος που προκλήθηκε από τη δράση της κοαγκουλάσης. Παράγεται από τα 70-90% των σταφυλοκόκκων. Είναι ουσία αντιγονική και τα προς αυτήν αντισώματα εξουδετερώνουν τη δράση της. Λέγεται και σ τ α φ υ λ ο κ ι ν ά σ η.

Πυρετογόνος εξωτοξίνη

Παράγεται από πολλούς σταφυλοκόκκους και μοιάζει με τις ανάλογες τοξίνες του στρεπτοκόκκου Α-ομάδας. Προκαλεί πυρετό, βλάβη του μυοκαρδίου και θανατηφόρο σοκ. Μεταβάλλει το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και είναι μιτογόνος για τα Τ-λεμφοκύτταρα. Παραλαμβάνεται από το υγρό καλλιέργημα με διαφοροποιητική φυγοκέντρηση.



Εικόνα 3. Ιδιότητες *S. aureus*

2.vii Ένζυμα που αναζητούνται για την ταυτοποίηση των σταφυλοκόκκων

© Κοαγκουλάση. Είναι μια εξωκυτταρική πρωτεΐνη. Παράγεται από το 95% και πλέον των στελεχών χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου που απομονώνεται από τον άνθρωπο. Η παραγωγή της κοαγκουλάσης είναι η βασική διαχωριστική ιδιότητα με την οποία ξεχωρίζουμε τον *S. aureus* από την ομάδα των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλοκόκκων. Προκαλεί πήξη του πλάσματος του κουνελιού και του ανθρώπου, όχι όμως και του πλάσματος προβάτου. Μοιάζει με την προθρομβίνη αλλά διαφέρει απ' αυτήν κατά το ότι προκαλεί πήξη, χωρίς την απαραίτητη παρουσία ασβεστίου. Διασπάται από την τρυψίνη και την πεψίνη. Στα καλλιέργηματα του χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου εμφανίζεται με δύο μορφές, σαν ε λ ε ύ θ ε ρ η και σαν σ υ ν

δ ε δ ε μ έ ν η . Η ελεύθερη εκκρίνεται από το σταφυλόκοκκο που αναπτύσσεται σε ζυμό και είναι μια εξωτοξίνη ενώ η συνδεδεμένη βρίσκεται πάνω στο μικροβιακό κύτταρο σταφυλοκόκκων που αναπτύχθηκαν πάνω σε άγαρ, δηλ. σε στερεό θρεπτικό υλικό. Η ελεύθερη κοαγκουλάση προκαλεί την πήξη του πλάσματος με τη συμμετοχή παράγοντος που βρίσκεται στο πλάσμα που ενεργοποιείται με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της ενεργοποίησης της προθρομβίνης προς θρομβίνη-ινωδογόνο-ινική. Αντίθετα, η συνδεδεμένη προκαλεί αδρυσυγκόλληση πυκνού εναιωρήματος σταφυλοκόκκου χωρίς τη μεσολάβηση παράγοντος από το πλάσμα, δεδομένου ότι η συγκόλληση αυτή προκαλείται και με σκέτο ινωδογόνο. Η παραγωγή της συνδεδεμένης κοαγκουλάσης είναι ανεξάρτητη από την παραγωγή της ελεύθερης και αναστέλλεται παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό. Η σημασία της κοαγκουλάσης στην παθογένεση των σταφυλοκοκκικών νόσων ίσως δεν είναι πολύ σημαντική αλλά είναι βέβαιο ότι προφυλάσσει το μικρόβιο από τη φαγοκυττάρωση δημιουργώντας μια κάψα από ινική γύρω από το σημείο της αναπτύξεώς του στον ιστό. Δεν είναι τοξική ουσία για τα πειραματόζωα. Είναι ουσία αντιγονική, και παρουσιάζει αντιγονικές διαφορές που αποκαλύφθηκαν με ανοσολογικές μεθόδους. Ήδη έχουν διαχωρισθεί 7 κοαγκουλάσες αντιγονικά διαφορετικές. Αντισώματα βρίσκονται στο αίμα πασχόντων αλλά και υγιών; ο προσδιορισμός τους δεν έχει διαγνωστική σημασία.

© Θερμοανθεκτική νουκλεάση T-N-άση ή t-DN-άση. Νουκλεάσες παράγονται από αρκετά είδη σταφυλοκόκκων αλλά και Gram αρνητικών μικροβίων όπως οι σερράτιες . Θερμοανθεκτική όμως νουκλεάση παράγεται μόνο από τον *S. aureus*. Τα 99% των στελεχών του *S. aureus* παράγουν το ένζυμο αυτό και από πολλούς θεωρείται σαν ο καλύτερος δείκτης ταυτοποίησης του *S. aureus*. Επιπλέον, η παραγωγή του ενζύμου αυτού συνδέεται και με την παραγωγή εντεροτοξίνης. Έτσι σε πρώτη φάση, σε περίπτωση τροφικής δηλητηρίασης μπορούμε να αναζητήσουμε την παραγωγή της DN-άσης που είναι ευκολότερη από ότι η δοκιμή παραγωγής εντεροτοξίνης και γίνεται σε όλα τα εργαστήρια. Είναι ουσία αντιγονική. Η μέθοδος αναζητήσεως του ενζύμου αυτού γίνεται με τα έτοιμα εμπορικά kit που δίνουν αποτέλεσμα σε 4 ώρες.

© Καταλάση. Ένζυμο που διασπά το H_2O_2 προς οξυγόνο (O_2) μοριακό και νερό. Παράγεται από όλα τα είδη σταφυλοκόκκων και μικροκόκκων και είναι το βασικό διαχωριστικό χαρακτηριστικό των δύο αυτών γενών από τους στρεπτοκόκκους.

© Λιπάση. Παράγεται συνήθως από στελέχη χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου που απομονώνονται από δοτιήνες ή ακμή όχι όμως από στελέχη του λυσιτύπου 71, ο οποίος προκαλεί το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας. Στο αιματούχο άγαρ με αίμα ανθρώπου, η λιπάση προκαλεί μια βαθυκόκκινη άλω γύρω από την αποικία του μικροβίου.

2.viii Οικολογία

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος αποικίζει το βλεννογόνο της πρόσθιας ρινικής

κοιλότητας και αποτελεί μέλος παροδικό της φυσιολογικής χλωρίδας του. Επίσης αποικίζει παροδικά το φάρυγγα και το παχύ έντερο. Από τα σημεία αυτά διασπείρεται και επιβιώνει στο δέρμα, στο τριχωτό της κεφαλής, στο περίνεο. Λόγω της αντοχής του στην ξήρανση βρίσκεται και διατηρείται ζωντανός στα εσώρουκα, στα σεντόνια, στις κουβέρτες. Από το σώμα του ανθρώπου και από το ρουχισμό του διασπείρεται στο φυσικό του περιβάλλον και μολύνει τη σκόνη των δωματίων, τα τρόφιμα ακόμη και σπανιότατα το νερό.

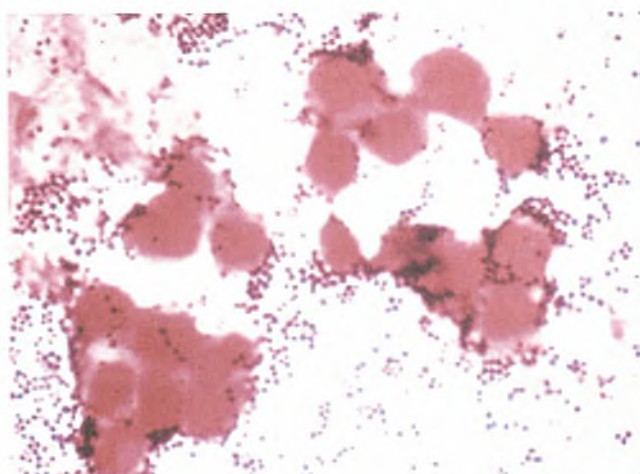
Αποικίζει το δέρμα και τη μύτη λίγες ώρες μετά τον τοκετό κάθε νεογνού που γεννιέται σε Μαιευτήριο. Στα Νεογνικά Τμήματα ο αποικισμός αυτός είναι επικίνδυνος γιατί μπορεί να προκαλέσει σταφυλοκοκκική νόσο από κάποιο ανθεκτικό νοσοκομειακό στελέχος. Σε μερικά νοσοκομεία κάνουν τεχνητό αποικισμό της μύτης του νεογνού με στελέχη μη παθογόνου σταφυλοκόκκου. Η εξαχλωροφαίνη 3% είναι το καλύτερο αντισταφυλοκοκκικό αντισηπτικό.

Αποικίζει τη μύτη του νοσηλευτικού και ιατρικού προσωπικού στα νοσομεία. Με λυσιτυπία βρέθηκε ότι ο αποικισμός αυτός είναι παροδικός διάρκειας 2-4 εβδομάδων. Τα 30-50% των ατόμων αυτών είναι φορείς χρυσιζοντος σταφυλοκόκκου.

Οι ενδονοσοκομειακές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις έχουν σαν πηγή του μικροβίου κάποιον πάσχοντα από ενεργό σταφυλοκοκκική νόσο και σπανιότατα τους υγιείς ρινικούς φορείς.

3. Νόσοι από *S.aureus*

Ο *S. aureus* είναι μικρόβιο παθογόνο που προσβάλλει όλα τα όργανα και όλους ιστούς. Ο αντιπροσωπευτικός τύπος της σταφυλοκοκκικής νόσου είναι η πυώδη φλεγμονή (εικ 4). Εξαιρέση αποτελούν τρεις κλινικές οντότητες, η τροφική δηλητηρίαση, η τοξική επιδερμική νεκρόλυση και το σύνδρομο του τοξικού σοκ που οφείλονται στην δράση των αντίστοιχων εξωτοξινών και εξελίσσονται χωρίς πυώδη φλεγμονή



Εικ.4 Gram στελέχη του *S. Aureus* στην πυώδη φλεγμονή

Οι πυώδεις φλεγμονώδεις σταφυλοκοκκικές νόσοι είναι οι εξής.

✿ Δερματικές σταφυλοκοκκιάσεις

Δοθιήν. Ψευδάνθραξ. Πυοδερμία. Ακμή. Διαπυήσεις τυχαίων και εγχειρητικών τραυμάτων, εγκαυμάτων.

Ο δοθιήν είναι το πρότυπο της σταφυλοκοκκικής φλεγμονής. Η βλάβη αρχίζει με συγκέντρωση σταφυλοκόκκων στο θύλακο της τρίχας που οδηγεί σε νέκρωση ιστού ίσως υπό την επίδραση της αιμολυσίνης. Ακολουθεί πήξη ινωδογόνου και συγκέντρωση ινικής γύρω από τους σταφυλοκόκκους (από τη δράση κοαγκουλάσης). Ταυτόχρονα εξελίσσεται η συνεχής συγκέντρωση πολυμορφοκυττάρων μικροφάγων, η τήξη του νεκρωτικού ιστού στο κέντρο της φλεγμονής, η συγκέντρωση πύου και τελικά η ρήξη του αποστήματος, εκκένωση της κοιλότητας από το πύο και πλήρωσή του με κοκκιώδη ιστό και επούλωση.

✿ Αποστήματα εσωτερικών οργάνων και εμπίσματα κοιλοτήτων.

Δημιουργούνται κατά τον ίδιο περίπου μηχανισμό όπως και ο δοθιήνας από κάποιο σημείο του ιστού όπου έγινε εγκατάσταση και ανάπτυξη του σταφυλοκόκκου. Αποστήματα εγκεφάλου, ήπατος, πνευμόνων, περινεφρικό απόστημα, πυοθώραξ, πυοπερικάρδιο, περιτονίτις είναι από τα πιο γνωστά.

✿ Οστεομυελίτις και σπητική αρθρίτιδα

Στην οστεομυελίτιδα ο σταφυλόκοκκος εγκαθίσταται στα τελικά τριχοειδή αγγεία της μεταφύσεως των μακρών οστών και προκαλεί την ανάπτυξη της οξείας πυώδους φλεγμονής. Εισβάλλει με πυρετό και πόνο και εφ' όσον γίνει έγκαιρα η διάγνωση και μπει ο άρρωστος σε αντισταφυλοκοκκική θεραπεία η φλεγμονή υποχωρεί χωρίς να γίνει διαπύηση. Αν όμως δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα ή αν δεν πετύχει η εξαφάνιση του μικροβίου, η φλεγμονή εξακολουθεί με νέκρωση και τήξη του οστού. Μπορεί να καταλήξει σε χρόνια οστεομυελίτιδα με αναπόφευκτες παραμορφώσεις, αναπηρία, κ.λ.π.

Επιπλοκή της σταφυλοκοκκικής οστεομυελίτιδας είναι η σπητική αρθρίτιδα, δηλ. φλεγμονή των αρθρικών υμένων της άρθρωσης όπου βρίσκεται το πάσχον οστό.

Στην οστεομυελίτιδα και τη σπητική αρθρίτιδα το μικρόβιο μεταφέρεται αιματογενώς από κάποια μικρή, ελάχιστη ή φανερή εστία σταφυλοκοκκικής φλεγμονής.

✿ Σταφυλοκοκκική πνευμονία

Στους ενήλικες η πνευμονία από σταφυλόκοκκο είναι μια επιπλοκή γρίπης ή άλλης ιογενούς νόσου του αναπνευστικού και στα παιδιά επιπλοκή ιλαρά ή κοκκύτη. Στα βρέφη η σταφυλοκοκκική πνευμονία είναι πρωτοπαθής χαρακτηρίζεται από πολλαπλές διάσπαρτες περιγεγραμμένες νεκρωτικές εστίες στους πνεύμονες. Στην ακτινογραφία οι περιοχές αυτές φαίνονται σαν «μπούλες». Είναι νόσος βαρεία. με την υψηλότερη θνητότητα ανάμεσα σ' όλες τις σταφυλοκοκκικές νόσους. Στην κυστική ίνωση του παγκρέατος αναπτύσσεται επίσης σταφυλοκοκκική φλεγμονή ή αποικισμός του πνεύμονος με *S. aureus*.

✿ Σταφυλοκοκκική σηψαιμία

Συνήθως είναι σύμπτωμα μιας τοπικής ή πολλαπλής σταφυλοκοκκιάσεως σε διάφορα εσωτερικά όργανα οπότε χαρακτηρίζεται σαν πύαια. Δεν λείπουν όμως και τα γενικά συμπτώματα με βλάβη του μυοκαρδίου από την επίδραση πυρετογόνου εξωτοξίνης. Στη σταφυλοκοκκική σηψαιμία συνήθως

συνυπάρχει μικροβιουρία 1/3 περίπου των ασθενών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι υπάρχει περινεφρικό απόστημα.

❖ Σηπτική ενδοαρτηρίτιδα

Συνήθως παρατηρείται μετά από αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις ή αγγειακούς καθετηριασμούς. Προδιαθεσικώς παράγων είναι ο διαβήτης.

❖ Σταφυλοκοκκική ενδοκαρδίτιδα

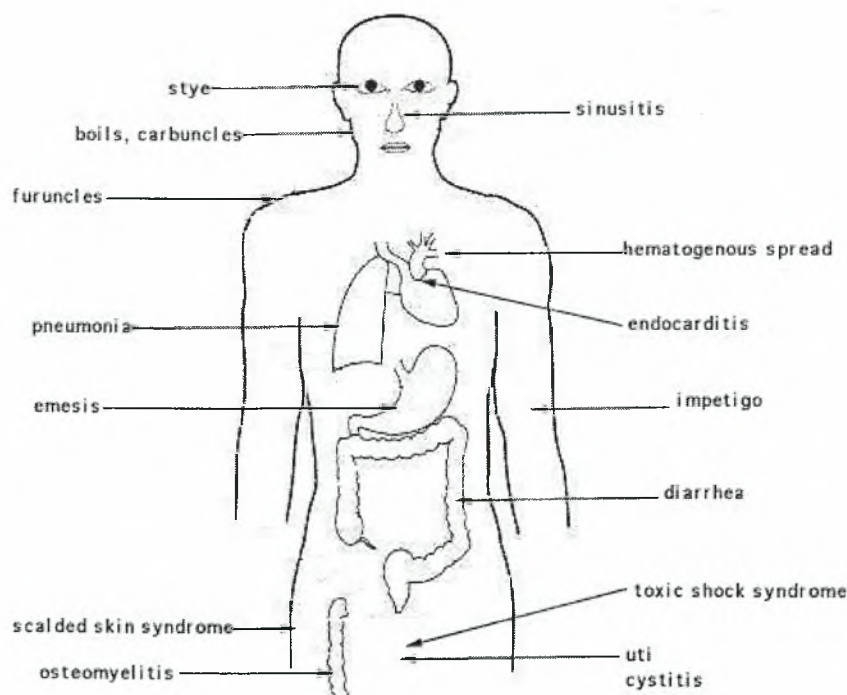
Ο *S. aureus* είναι ένας από τους παράγοντες της οξείας μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας. Άτομα ευπαθή στην ανάπτυξη της νόσου αυτής είναι αυτοί που έχουν κάποια βλάβη στις βαλβίδες της καρδιάς είτε γιατί έπαθαν κάποτε ρευματική καρδίτιδα είτε γιατί έχουν συγγενή ανωμαλία στις βαλβίδες. Άτομα που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική διόρθωση βαλβιδών ή άλλες επεμβάσεις παθαίνουν υποξεία ενδοκαρδίτιδα συνήθως από *S. epidermidis*. Επίσης τέτοια ενδοκαρδίτιδα παρατηρείται σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών.

Η σταφυλοκοκκική ενδοκαρδίτις δύσκολα υποχωρεί στη χημειοθεραπεία γιατί παραμένουν εστίες του μικροβίου στις βαλβίδες. Το εργαστήριο θα βοηθήσει στη σωστή χημειοθεραπεία με την απομόνωση του μικροβίου από το αίμα, τον προσδιορισμό της MIC των διαφόρων αντιβιοτικών, τον προσδιορισμό της στάθμης των στο αίμα και με τη δοκιμή συνδυασμού αντιβιοτικών.

Ο συνδυασμός είναι απαραίτητος για να επιτευχθεί η υψηλότερη κατά το δυνατό μικροβιοκτόνα δράση των αντιβιοτικών.

❖ Σταφυλοκοκκική μηνιγγίτιδα

Είναι σπανιότερη από τις άλλες μικροβιακές μηνιγγίτιδες είναι συνήθως δευτεροπαθής, με αιματογενή μεταφορά από κάποια εστία.



Εικ 6 . Περιοχές μόλυνσης και αρρώστειες από *S. Aureus*

Οι σταφυλοκοκκικές νόσοι οι οποίες προκαλούνται από την παραγωγή και τη δράση τοξινών είναι:

Τροφική δηλητηρίαση. Εμφανίζεται 6-12 ώρες μετά απο λήψη τροφής, όπου είχε αναπτυχθεί *S. aureus* που παράγει εντεροτοξίνες. Το πρώτο

σύμπτωμα είναι ναυτία και έμετος, ζάλη, ίλιγγος, υπνηλία, λήθαργος ή άλλα συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Διάρροια μπορεί να υπάρχει ή να μην υπάρχει. Πυρετός δεν εμφανίζεται. Η τοξίνη παραλαμβάνεται από τις νευρικές απολήξεις του πνευμονογαστρικού στο έντερο. Είναι συνήθως η Β τοξίνη. Ομαδικές δηλητηριάσεις π.χ. από κόλυβα, είναι συνηθισμένες στη χώρα μας, αλλά και μεμονωμένες ή οικογενειακές από κρέμες, γλυκίσματα με κρέμες, γαλακτερά, τυρί, κ.ά. ιδίως το καλοκαίρι.

Τοξική επιδερμική νεκρόλυση. Οφείλεται στη δράση της αποφολιδωτικής τοξίνης που εκκρίνεται από *S. aureus* του λυσιτύπου 71.

Από τη νόσο πάσχουν μόνο τα νεογνά του ανθρώπου. Χαρακτηρίζεται από εμφάνιση φυσαλλίδων μικρών και μεγάλων γεμάτων από υγρό που τελικά οδηγούν σε αποκόλληση της επιδερμίδας και απόπτωσή της σε κομμάτια μεγάλα. Λέγεται και σύνδρομο ζεματισμένου δέρματος (scalded Skin syndrome). Συνήθως συνυπάρχει επιπεφυκίτιδα. Ο σταφυλόκοκκος δεν βρίσκεται στις δερματικές βλάβες, αλλά ανιχνεύεται η τοξίνη στο υγρό των φυσαλίδων. Ο παθογόνος σταφυλόκοκκος λυσιτύπου 71 μπορεί να βρεθεί στο μάτι ή σε κάποια άλλη σταφυλοκοκκική φλεγμονή δερματική που τυχόν υπάρχει. Οι ενήλικες μπορεί να πάθουν αποφολιδωτική δερματίτιδα που συνδυάζεται συνήθως με παρόμοιες δερματοπάθειες από φάρμακα.

Σύνδρομο του τοξικού σοκ ή TSS (Toxic shock syndrome)

Το σύνδρομο του τοξικού σοκ είναι μια οξεία λοίμωξη που παρατηρήθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1978 σε 7 παιδιά και αποδόθηκε στη δράση τοξινών που παράγονται από τον *S. aureus* της βακτηριοφαγικής ομάδας I λυσιτύπου 29. Ο σταφυλόκοκκος αυτός δεν αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος ή των βλεννογόνων. Γρήγορα αποδείχθηκε ότι από το σύνδρομο αυτό προσβάλλονται κυρίως γυναίκες νεαρές που χρησιμοποιούν κατά την περίοδο της έμμηνης ρύσης ταμπόν, και ότι είναι οξύτατο και με υψηλή θνητότητα. Το σύνδρομο αρχίζει ξαφνικά 2-5 ημέρες από τη χρήση των ταμπόν με πόνους σ'όλο το σώμα, υψηλό πυρετό, μεγάλη πτώση της αρτηριακής πίεσης κάτω των 90 mmHg, έμετο, εξάνθημα παρόμοιο με εκείνο της οστρακιάς, διάρροια και με τη συμμετοχή 3-4 ακόμη συστημάτων όπως oligουρία και συμπτώματα από το ΚΝΣ. Στο αίμα παρατηρείται αύξηση της ουρίας και της κρεατινίνης, των ηπατικών ενζύμων, υποκαλιαιμία, θρομβοπενία, λευκοκυττάρωση με στροφή προς τα αριστερά. Όλα αυτά τα κλινικά και τα εργαστηριακά στοιχεία θυμίζουν σύνδρομο Kawasaki. Από τον κόλπο βγαίνει δύσοσμο υγρό. Μετά την αποκατάσταση του σοκ αρχίζει απολέπιση από τα πέλματα και τις παλάμες. Το σύνδρομο υποτροπιάζει σε 30% περίπου των γυναικών κατά την επόμενη έμμηνη ρύση αλλά με ηπιότερη μορφή. Στο αίμα ανιχνεύεται η TSST-1. Η είσοδος της τοξίνης αυτής γίνεται από το επιθήλιο του κόλπου. όπου στο λιμνάζον αίμα αναπτύσσεται ο σταφυλόκοκκος. Είναι η αρχική εμμηνορρυσιακή μορφή του TSS. Η προφύλαξη από την εμμηνορρυσιακή μορφή είναι εφικτή με τη διαφώτιση του κοινού να μην χρησιμοποιούν κολπικά ταμπόν και αν τα χρησιμοποιούν να τα αλλάζουν συχνά και ποτέ να μη τα διατηρούν κατά τη διάρκεια της νύχτας, δηλαδή πέρα των 4-8 ωρών. Με τη διαφώτιση αυτή έχει μειωθεί σημαντικά η συχνότητά της στις χώρες όπου η νόσος ήταν συχνή. Από 812 περιπτώσεις που δηλώθηκαν στο CDC (USA) το 1980, μόνο 45 δηλώθηκαν το 1989. Η μείωση αυτή αφορά μόνο τις εμμηνορρυσιακές μορφές. Η θεραπεία είναι συμπτωματική των βαρειών κλινικών εκδηλώσεων με ενυδάτωση, ηλεκτρολυτική εξισορρόπηση και κατάλληλη αντιμετώπιση εκδηλώσεων από τα διάφορα συστήματα.

4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ

Στις σταφυλοκοκκικές νόσους εφαρμόζονται στα εργαστήρια διάφορες εξετάσεις που ανήκουν στις τρεις ακόλουθες ομάδες.

- i. Μικροβιολογικές εξετάσεις
- ii. Ορολογικές εξετάσεις
- iii. Επιδημιολογικές εξετάσεις

4.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Το δείγμα στις εξετάσεις αυτές είναι κάποιο παθολογικό φλεγμονώδες υλικό που πάρθηκε από το σημείο της σταφυλοκοκκικής φλεγμονής ή κάποιο φυσιολογικό υγρό. Τα συνηθέστερα υλικά για μικροβιολογική εξέταση σε σταφυλοκοκκικές νόσους είναι τα εξής.

1. Πύο αποστήματος
2. Υγρό παρακεντήσεως κλειστής κοιλότητας, π.χ. πλευριτικό, περικαρδιακό, εγκεφαλονωτιαίο, αρθρικό υγρό, υγρό φυσαλίδας κ.ά.
3. Επιχρίσματα διαφόρων πασχόντων βλεννογόνων ή υλικό δερματικών ή τραυματικών ανοικτών φλεγμονών. Πτύελα. Κόπρανα. Ούρα κ.ά.
4. Αίμα φλεβικό.

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων αυτών περιλαμβάνει τις εξής εξετάσεις:

Μικροσκοπική εξέταση

Καλλιέργεια και απομόνωση του σταφυλοκόκκου

Ταυτοποίηση του είδους του σταφυλοκόκκου

Δοκιμές ευαισθησίας του σταφυλοκόκκου στα αντιβιοτικά

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Είναι η πρώτη και απαραίτητη εξέταση όταν το δείγμα είναι πύο ή άλλο φλεγμονώδες υλικό, ή υγρό παρακεντήσεως κλειστών κοιλοτήτων. Προκειμένου για επιχρίσματα βλεννογόνων με άφθονη χλωρίδα η μικροσκοπική εξέταση δεν δίνει κάποια ιδιαίτερη πληροφορία.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η τεχνική της καλλιέργειας παθολογικού υλικού για τη διάγνωση σταφυλοκοκκικής νόσου δεν διαφέρει από την τεχνική της γενικής καλλιέργειας. Το μικρόβιο αναπτύσσεται εξαιρετικά εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *S. aureus*

Εφ' όσον το μικρόβιο που απομονώθηκε από τα καλλιεργήματα είναι Gram θετικός κόκκος, με σταφυλοειδή ή άτακτη διάταξη, θα προχωρήσουμε στην ταυτοποίησή του με τις ακόλουθες δοκιμές.

Δοκιμή παραγωγής καταλάσης.

Δοκιμή παραγωγής κοαγκουλάσης ελεύθερης και συνδεδεμένης

Δοκιμή παραγωγής θερμοανθεκτικής νουκλεάσης

Δοκιμή παραγωγής ενζύμων: Φωσφατάση, ουρεάση, γαλακτοσιδάση,

πυρρολιδονάση, υδρόλυση ορνιθίνης
 Δοκιμές αντοχής στη νοβομπίοσίνη και την πολυμυξίνη Β
 Δοκιμή διασπάσεως οξειδωτικής μαννιτόλης, τρεχαζόλης και μαννόζης.

Συστήματα ταυτοποίησης σταφυλοκόκκων, προσφερόμενα στο εμπόριο

Τα συστήματα αυτά προσφέρουν σε εύχρηστη μορφή τα υποστρώματα για τις διάφορες βιοχημικές δοκιμές που επιτρέπουν την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών σταφυλοκόκκου. Η ακρίβειά των εξαρτάται από το πλήθος και την καλή επιλογή των δοκιμών που περιλαμβάνουν και κυμαίνεται από 70-90%. Συνήθως υποδεικνύονται από τον κατασκευαστή οι επιπλέον δοκιμές που πρέπει να γίνουν χωριστά, π.χ. κοαγκουλάση, φωσφατάση, ορνιθίνη κ.ά.

Μερικά από τα συστήματα αυτά απαιτούν και ειδικό μηχάνημα για την ανάγνωση του αποτελέσματος. Άλλα δίνουν το αποτέλεσμα γρήγορα σε λίγες ώρες άλλα μετά από επώαση 18-24 ωρών. Άλλα είναι γενικότερα, ταυτοποιούν δηλ. σταφυλοκόκκους και στρεπτοκόκκους, άλλα ταυτοποιούν ειδικά τους σταφυλοκόκκους από ζώα.

Τα πιο γνωστά συστήματα είναι τα ακόλουθα:

- 1 API Staph Ident (της Analytab Products). Δεν έχει φωσφατάση και δεν διαχωρίζει πάντα τον *S. epidermidis* από τον *S. hominis*.
- 2 API Staph Trac και A TB 32 Staph (API system)
- 3 Minitex Gram Positive (BBL Microb. System)
- 4 Sceptor Gram Positive MIC/ID (Johnston LAB)
- 5 Vitek Gram Positive Ident GPI card
- 6 Minitex Gram Positive set (Becton Dickinson)

Micro Scan Pos Compo pand system με 18 τεστ και για *Listeria*. Ταυτοποιεί και προσδιορίζει την ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Διαβάζεται το αποτέλεσμα με όργανο το Auto SCAN-W / A. από τον φθορισμό που παράγεται. Τα υποστρώματα έχουν συνδεθεί με φθορίζουσες ουσίες. Επώάζεται για 18-48 ώρες.

Rapid Pos ID panel system με 42 τεστ, δίνει το αποτέλεσμα σε 2 ώρες και διαβάζεται με το Auto SCAN-W / A φθοριόμετρο.

4.II. ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Με τις ορολογικές αναζητούνται αντισώματα προς τις διάφορες τοξίνες, τα ένζυμα και τα κυτταρικά αντιγόνα του *S. aureus* για διαγνωστικούς σκοπούς, αλλά κυρίως για διαχωρισμό μιας παροδικής μικροβιαμίας από μια ενεργό σταφυλοκοκική νόσο όπως π.χ. στην ενδοκαρδίτιδα.

4.III. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Σε περιπτώσεις υπόνοιας ενδονοσοκομειακής ή εξωπληθυσμιακής επιδημίας ή ενδονοσοκομειακής μόλυνσεως σποραδικών περιπτώσεων γίνεται μεταξύ των διαφόρων επιδημιολογικών πράξεων και η τ υ π ο π ο ι η σ η, δηλαδή ο διαχωρισμός των στελεχών του *S. aureus* που απομονώθηκαν από τους ασθενείς ή τα τρόφιμα ή το άψυχο φυσικό περιβάλλον σε τύπους, με στόχο την ανεύρεση της εστίας από όπου ξεκίνησε ή ξεκινά το επιδημικό στέλεχος και την ιχνηλάτηση της πορείας και των οδών μεταφοράς του.

Οι συνήθεις επιδημικοί δείκτες του *S. aureus* είναι οι εξής: Το

αντιβιογράμμα. Η λυσιτυπία. Η ανάλυση του χρωμοσωμικού του DNA. Πλασμιδοτυπία.

i. Αντιβιογράμμα

Το αντιβιογράμμα είναι ο πρώτος επιδημικός δείκτης, ιδιαίτερα αν το επιδημικό στέλεχος είναι ανθεκτικό στη μεθικιλλίνη. Δεν είναι όμως πολύ αξιολογήσιμος δείκτης γιατί αντοχή στη μεθικιλλίνη μπορεί να έχουν και άλλα είδη σταφυλοκόκκου ή και *S. aureus* με διαφορετική όμως την κατανομή αντοχής προς τα άλλα αντιβιοτικά. Στο αντιβιογράμμα προστίθενται πολλά αντιβιοτικά άσχετα με την κλινική των χρήση (αντοχήγραμμα).

ii. Λυσιτυπία

Είναι η κλασική και γενικά αποδεκτή μέθοδος τυποποίησης του *S. aureus*.

Τα διάφορα στελέχη του *S. aureus* παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία σε βακτηριοφάγους. Χρησιμοποιώντας λοιπόν μια σειρά βακτηριοφάγων (περί τους 25) μπορούν να διαχωρισθούν τα περισσότερα στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου που απομονώνονται από τον πάσχοντα άνθρωπο σε βακτηριοφαγικούς τύπους. Κατά τη Διεθνή Επιτροπή Λυσιτυπίας Σταφυλοκόκκου χρησιμοποιούνται αρχικά οι ακόλουθοι φάγοι που διαχωρίζονται σε ομάδες ως εξής:

Ομάδα I: 29, 52, 52A, 79 και 80

Ομάδα II: 3A, 3B, 3C, 55 και 71

Ομάδα III: 6, 7, 42E, 53, 54, 77, 83A

Ομάδα IV: 420

Διάφοροι : 81, 187 κ.ά.

Κατά διαστήματα το σχήμα αυτό συμπληρώνεται με νέους φάγους σε αντικατάσταση άλλων που αφαιρούνται.

Αν στην επιφάνεια λεπτού στρώματος καλλιέργηματος, σταφυλοκόκκου προστεθούν οι φάγοι αυτοί θα προκληθεί λύση του καλλιέργηματος, δηλαδή διαύγαση του θολερού ταπητίου από ένα ή από περισσότερους φάγους. Έτσι καθορίζεται ο λυσίτυπος κάθε σταφυλοκόκκου.

Οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται από ενεργό σταφυλοκοκκική νόσο συνήθως ανήκουν στην I ομάδα π.χ. 52/52A/80 ή 80/81. Οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται από ασθενή με τοξική επιδερμική νεκρόλυση ανήκουν στον λυσίτυπο 71.

Οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται από το σύνδρομο του τοξικού σοκ ανήκουν στην ομάδα I λυσιτύπου 29, προκειμένου για την εμμηνορυσιακή μορφή και προκειμένου για μη εμμηνορυσιακή μορφή στους λυσιτύπους της III ομάδας. Σταφυλόκοκκοι από οφθαλμικές λοιμώξεις ανήκουν στο λυσίτυπο 95.

Οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται από τους ρινικούς φορείς ανήκουν συνήθως στους λυσιτύπους της III ομάδας καθώς και αυτοί που απομονώνονται από τα τρόφιμα σε περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης.

Οι ανθεκτικοί στην οξακιλλίνη *S. aureus* ανήκουν κατά 93-99% στην III ομάδα, ο δε επικρατέστερος συνδυασμός ευαισθησίας είναι ο 7/47/53/54/75/77 στις ΗΠΑ [J Clin Microb 1992, 30(1): 252].

Με τους βακτηριοφάγους τυποποιούνται τα 60% και πλέον των νοσοκομειακών σταφυλοκόκκων.

Η τεχνική της λυσιτυπίας είναι αυστηρά καθορισμένη και εφαρμόζεται μόνο

στα Εθνικά Κέντρα λυσιτυπίας σε κάθε χώρα κατά τις οδηγίες και τη συνεργασία της Διεθνούς Επιτροπής.

iii. Ανάλυση του χρωμοσωμικού DNA

Καλείται και μέθοδος δακτυλικών αποτυπωμάτων και γίνεται με μέθοδο της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (restriction endonuclease analysis). Κατ'αυτήν καταστρέφεται το μικροβιακό κύτταρο του υπό τυποποίηση καλλιέργηματος του σταφυλοκόκκου, εκχυλίζεται και παίρνεται σε καθαρή μορφή το χρωμοσωμικό DNA. Αυτό στη συνέχεια κατακερματίζεται με τη δράση μιας ή δύο ενδονουκλεασών όπως είναι η EcoRI και η Hind III σε 20-25 κομμάτια. Ακολουθεί διάσπαση της διπλής αλυσίδας των βάσεων σε μονές και ο υβριδισμός αυτών με διάφορες μεθόδους όπως με ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, rRNA από *E. Coli*.

iv. Πλασμιδική τυποποίηση

Αυτή γίνεται είτε σαν πλασμιδικό προφίλ είτε σαν ανάλυση του DNA των πλασμιδίων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες σαν μέθοδος δακτυλικών αποτελεσμάτων. Η πλασμιδοτυπία γίνεται στον *S. aureus* εφ' όσον υπάρχουν πλασμίδια.

5. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανίχνευση σε κλινικά στελέχη σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών στην περιοχή της Θεσσαλίας γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες παθογονικότητας και που πιθανόν καθιστούν τα στελέχη αυτά δυνητικά περισσότερο παθογόνα. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για μελέτη ήταν το γονίδιο *tst-1*, και τα γονίδια *sem*, *sei*, *seg*, *seo*, και *sen* που κωδικοποιούν τοξίνες που

ενοχοποιούνται για σοβαρά σύνδρομα.

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Δείγματα

Εξετάστηκαν 250 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα (αίμα, πύο, βρογχικές εκκρίσεις κλπ) κατά το πρώτο εξάμηνο του 2006. Τα στελέχη μελετήθηκαν για την παρουσία του γονιδίου της τοξίνης του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας *tst-1*, και για την παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις εντεροτοξίνες *sem*, *sei*, *seg*, *sen*, *seo* μετά από εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

6.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA απευθείας από καλλιέργεια όπου είχε αναπτυχθεί ο εν λόγω μικροοργανισμός

Για την απομόνωση παρασκευάστηκε λυτικό διάλυμα με τημ ακόλουθη σύστασηως εξής:

Tris 1 M pH 7.0
EDTA 0.5 M pH 8.0
Triton X-100

Συγκεκριμένα η απομόνωση έγινε ως ακολούθως:

- i. Με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού παίρνουμε αρκετές αποικίες του *S.aureus* και εν συνεχεία τις εναιωρούμε σε 3 ml απεσταγμένο νερό. Προσθέτουμε σε erpendorf των 1,5 ml ποσότητα ίση με 1,5 ml από το παραπάνω εναιώρημα.
- ii. Φυγοκέντριση του δείγματος στις 13.000 rpm για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min αφαιρούμε το υπερκείμενο με τη χρήση μιας πιπέτας Pasteur και διαλυτοποιούμε το ίζημα που έχει σχηματιστεί στο πάτο του erpendorf με την προσθήκη 100 μl λυτικού.
- iii. Τοποθετούμε τα δείγματα για 1 h στους 56^o C και εν συνεχεία για 10 min στους 100^o C.

6.3 Ανίχνευση των γονιδίων αντοχής με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

6.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μέθοδος μεγάλης ευασθησίας διότι μπορεί να πολλαπλασιάσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA. Ο πολλαπλασιασμός μοναδικών γονιδίων μέσα από πολύπλοκες γονιδιωματικές αλληλουχίες είναι σήμερα πια ρουτίνα. Η αναγνώριση των ειδικά πολλαπλασιασμένων αλληλουχιών DNA γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου το DNA εμφανίζεται σε μια ζώνη. Η PCR χρησιμοποιείται ακόμα για τη γρήγορη ταυτοποίηση και εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κλωνοποιημένου DNA κατευθείαν από αποικίες βακτηρίων ή από πλάκες βακτηριοφάγων. Με την ανακάλυψη των DNA πολυμερασών που έχουν μεγάλη θερμοσταθερότητα και την αυτοματοποίηση της τεχνικής PCR, έγινε δυνατή η ανάπτυξη πολλών διαφορετικών ερευνητικών εφαρμογών, όπως η αναγνώριση ιών και βακτηρίων.

Η όλη διαδικασία ουσιαστικά διακρίνεται από τα εξής στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA
- Υβριδοποίηση των εκκινητών
- Επέκταση των εκκινητών

Αποδιάταξη του DNA

Η επιτυχία της αντίδρασης PCR εξαρτάται από την ολική αποδιάταξη του DNA στόχου και του προϊόντος σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Η συνήθης θερμοκρασία είναι 94-95° C. Ανάλογα με τη σύσταση του υποστρώματος σε G+C η θερμοκρασία είναι υψηλότερη, αλλά πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να μην ελλατωθεί η ενεργότητα του ενζύμου της πολυμεράσης.

Υβριδοποίηση των εκκινητών

Η συνήθης θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι 55-65° C και ρυθμίζεται περίπου στους 5° C χαμηλότερα από το σημείο τήξης των εκκινητών (Tm). Η θερμοκρασία και ο χρόνος της υβριδοποίησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση και το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος μια και έτσι περιορίζεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στις περιοχές του DNA με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

Επέκταση των εκκινητών

Ο χρόνος για την επέκταση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως η επέκταση γίνεται στους 70-75° C. Σε αυτήν τη θερμοκρασία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση ιόντων, το ρυθμιστικό διάλυμα και το είδος του υποστρώματος DNA. Διάρκεια επέκτασης 1 λεπτού στους 72° C είναι αρκετή για προϊόντα τελικού μήκους 2000 νουκλεοτιδίων. Διάρκεια επέκτασης μεγαλύτερη του ενός λεπτού είναι χρήσιμη σε αρχικούς κύκλους πολυμερισμού ανη συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μικρή, ή στα τελικά στάδια όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος υπερτερεί της συγκέντρωσης του ενζύμου.

6.3.2. Αντίδραση της ενίσχυσης

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες των 50 μL . Ενισχύθηκαν 5 μL γενωμικού DNA από κάθε δείγμα σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μL , ο οποίος περιελάμβανε εκτός από το DNA, τα δυο ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές, την πολυμεράση, MgCl_2 , απεσταγμένο νερό, ένα ρυθμιστικό διάλυμα και NTPs με τις εξής ποσότητες:

- 5 μL DNA
- 3 μL MgCl_2
- 1 μL dNTP's
- 0.4 μL Taq πολυμεράση
- 34.6 μL απεσταγμένο νερό
- 0.5 μL εκκινητή 1
- 0.5 μL εκκινητή 2

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν διατηρημένα στους -20°C .

Δραστηριότητα του PCR buffer II

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα χρησιμοποιείται χάρη στην ιδιότητα να διατηρεί σταθερό το pH, γεγονός που είναι απαραίτητο για τη σωστή δράση της πολυμεράσης.

Συγκέντρωση MgCl_2

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο που μπορεί να επηρεάσει την πρόσδεση των εκκινητών, την αποδιάταξη των κλώνων του DNA και προ πάντων τη δραστηριότητα της πολυμεράσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση MgCl_2 ποικίλλει περίπου από μια τιμή 0.5 mM έως 5 mM. Στο διάστημα μεταξύ των βέλτιστων τιμών, τα ελεύθερα ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου και σχηματίζουν διαλυτά συμπλέγματα με τα dNTP's προκειμένου να παραχθεί το υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση. Μικρή ποσότητα ιόντων έχει ως αποτέλεσμα μικρή παραγωγή PCR προϊόντων, ενώ αντίθετα μεγάλη ποσότητα ιόντων την παραγωγή μη ειδικών PCR προϊόντων. Όταν απαιτείται αξιοπιστία στην σύνθεση του DNA χρησιμοποιούνται μικρές συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+}

Συγκέντρωση των dNTP's

Απαιτείται μια ισορροπημένη συγκέντρωση των τεσσάρων dNTP's στο μίγμα της αντίδρασης, ώστε να μην υπάρξει λάνθασμένη ενσωμάτωση ή μεταβολή της ποσότητας των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου. Το τελευταίο θα παρεμπόδιζε τη δραστηριότητα της πολυμεράσης και επομένως την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

Όταν απαιτείται μέγιστη αξιοπιστία στην σύνθεση του DNA η συγκέντρωση των dNTP's πρέπει να είναι μεταξύ 10-50 mM. Η συγκέντρωση του MgCl_2 πρέπει να

επιλεχθεί εμπειρικά, αρχίζοντας από 1mM και σε κάθε βήμα να προστίθεται 0,1 mM, έως ότου παραχθεί επιθυμητή ποσότητα προϊόντος PCR.

Αλληλουχίες και συγκέντρωση των εκκινητών

Η συγκέντρωση τους καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.1 - 0.5 μ M. Οι εκκινητές συνήθως έχουν μήκος 15-30 νουκλεοτίδια. Μεγαλύτεροι σε μήκος εκκινητές παρέχουν μεγαλύτερη ειδικότητα. Η περιεκτικότητα σε GC πρέπει να είναι 40-60 %. Τα νουκλεοτίδια G και C πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στην αλληλουχία του εκκινητή. Περισσότερα από τρία G ή C νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή δεν πρέπει να υπάρχουν, ώστε να ελαττωθεί η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Επίσης οι εκκινητές δεν πρέπει να είναι αυτο-συμπληρωματικοί ή συμπληρωματικοί ως προς άλλον εκκινητή, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών. Οι θερμοκρασίες τήξεως των εκκινητών δεν θα πρέπει να διαφέρουν πάνω από 5° C. Ο υπολογισμός των θερμοκρασιών τήξεως μπορεί να γίνει ως εξής:

- Εάν ο εκκινητής είναι μικρότερος των 25 νουκλεοτιδίων

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T), \text{ όπου } G, C, A, T \text{ ο αριθμός των νουκλεοτιδίων στον εκκινητή}$$

Οι θερμοκρασίες υβριδισμού πρέπει να είναι περίπου 5° C χαμηλότερες των θερμοκρασιών τήξεως.

- Εάν ο εκκινητής είναι μεγαλύτερος των 25 νουκλεοτιδίων

Οι θερμοκρασίες τήξεως υπολογίζονται χρησιμοποιώντας ειδικά προγράμματα μέσω H/Y, όπου μελετούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών βάσεων και οι επιδράσεις των συγκεντρώσεων των αλάτων.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η συγκέντρωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για τον καθένα 0.5 μ L. Οι αλληλουχίες των για το κάθε γονίδιο είναι οι εξής:

sen : 1. 5' ACG TGG CAA TTA GAC GAG TC 3'
2. 5' GAT TGA TCT TGA TGA TTA TGA G..... TTG 3'

seo : 1. 5' AGT TTG TGT AAG AAG TCA AGT G...AGA 3'
2. 5' ATC TTT AAA TTC AGC AGA TAT T..... AAC 3'

sei : 1. 5' CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G 3'
1. 5' GTT ACT ATC TAC ATA TGA TAT T.....ATC 3'

seu : ENT1: 5' ACG TAG ATT TGT TTG GGA CAA ACT 3'
INSEK1: 5' GAC TCG TCT AAT TGC CAC GT 3'

seg : 1. 5' TAA GGG AAC TAT GGG TAA TGT AAT G 3'
2. 5' GAA CAA AAG GTA CTA GTT CTT T.....AGG 3'

TST : 1. 5' TTC ACT ATT TGT AAA AGT GTC A.....ACT 3'

2. 5' TACT AA ATT TTT TTA TCG T.....CTT 3'

6.3.3 Χαρακτηριστικά της Taq πολυμεράσης

Η Taq πολυμεράση είναι θερμοσταθερή (αντοχή σε επαναλαμβανόμενη θέρμανση 94° -95° C) και έτσι δεν χρειάζεται η προσθήκη νεού ενζύμου μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού. Οι πολυμεράσεις αυτές απομονώνονται από θερμοφιλά βακτήρια όπως το είδος *Thermus aquaticus* (Taq), ή από Αρχαία που επίσης ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες (90° C).

Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94 kDa και βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75° – 80° C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτίδια/μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες δίνεται από τον παρακάτω πίνακα:

Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος ημιζωής (min)
92,5	130
95,0	40
97,5	5-6

Η Taq πολυμεράση δεν περιέχει 3'-5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα. Η εισαγωγή λάθους νουκλεοτιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αντίδραση. Έτσι, σε συγκέντρωση 1mM για κάθε νουκλεοτίδιο η συχνότητα λάθους είναι περίπου 1.66×10^{-4} ανά κύκλο. Σε μικρότερη συγκέντρωση (0,2mM) νουκλεοτιδίων, το λάθος ελαττώνεται σημαντικά και γίνεται μικρότερο από 5×10^{-5} . Ένας άλλος παράγοντας που αυξάνει τη συχνότητα του πολυμερισμού λάθους νουκλεοτιδίων είναι η υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} . Υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (10mM) και νουκλεοτιδίων (4-6 mM) αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες της Taq πολυμεράσης. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+} 1.5-2 mM και νουκλεοτιδίων 50-100 mM η αντίδραση επίσης χρειάζεται μονοθενή ιόντα K^+ σε συγκέντρωση 25-50 mM. Το pH της αντίδρασης πρέπει να είναι 8,3 στους 20° C και η συγκέντρωση του ενζύμου 1-2,5 μονάδες.

Συνήθως χρησιμοποιούνται 1-1,5 u Taq πολυμεράσης σε μείγμα 50μl. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων PCR. Ωστόσο, εάν στην αντίδραση υπάρχουν αναστολείς (π.χ. επιμολυντές), απαιτούνται υψηλότερες δόσεις για να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη απόδοση των προϊόντων.

6.3.4. Συνθήκες της αντίδρασης

Ο αριθμός των κύκλων της PCR εξαρτάται από την ποσότητα του DNA, που πρόκειται να ενισχυθεί και από την επιθυμητή απόδοση των προϊόντων PCR. Για τουλάχιστον 10 αντιγραφα του DNA απαιτούνται 40 κύκλοι. Εάν η αρχική ποσότητα του DNA είναι μεγαλύτερη, 25-35 κύκλοι είναι επαρκείς. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Multi Gene II Biosure Round Cell Co. [Labnet].

Πρόγραμμα για γονίδια TST, sen, seo, sei, seg

94° C	4 min	
94° C	30 sec	{30 κύκλοι}
55° C	30 sec	
72° C	30 sec	
72° C	10 min	

Πρόγραμμα για γονίδιο seu

94° C	5 min	
94° C	1 min	{30 κύκλοι}
55° C	1 min	
72° C	1 min	
72° C	10 min	

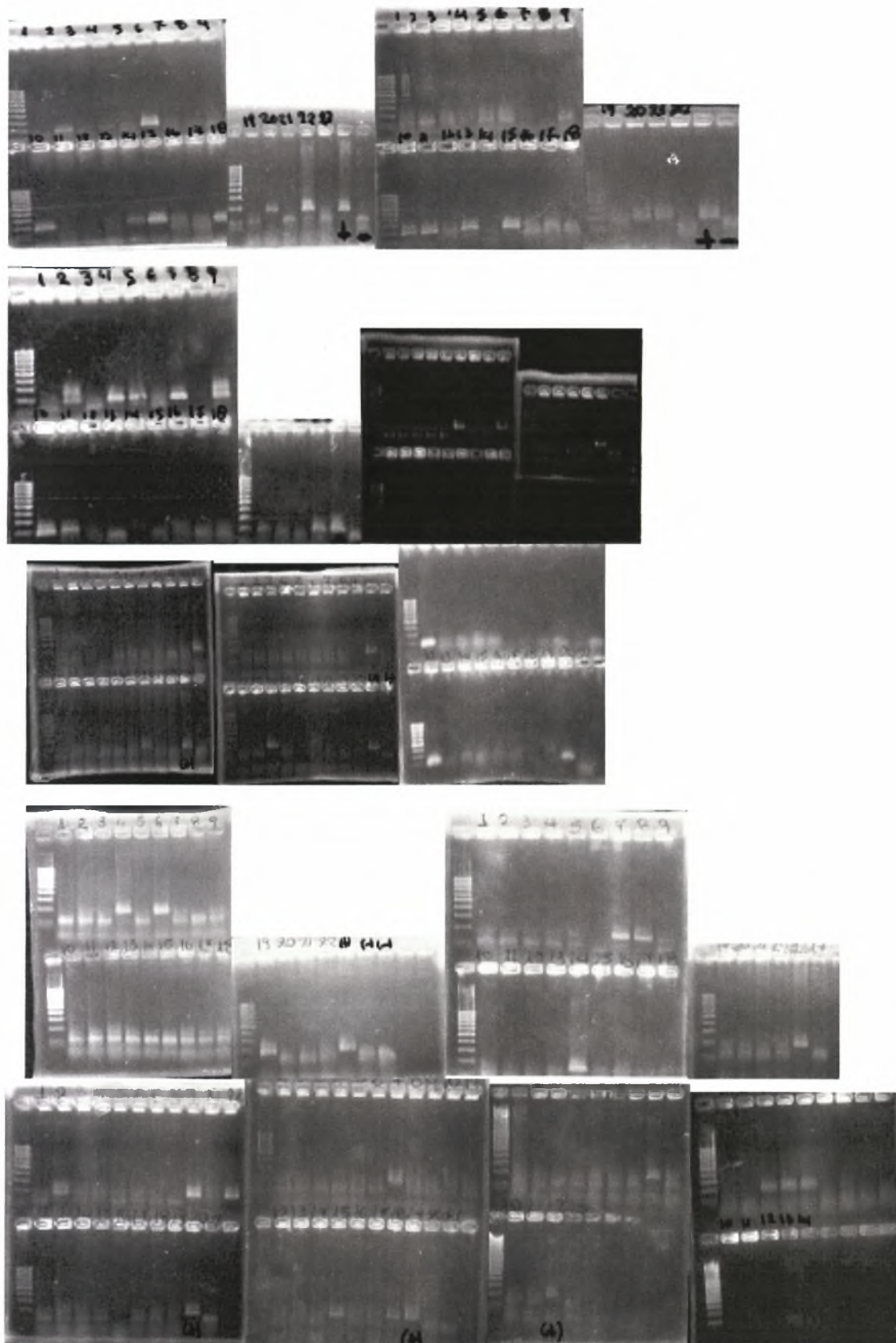
7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Μετά το τέλος της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν 5 μ L του προϊόντος της ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρασκευάστηκε με τη διάλυση περίπου 1,8 gr αγαρόζης [Seakem(AMBREX)] σε 5 mL buffer TBE 10x και προσθήκη αποστειρωμένου νερού, τόσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 mL (δηλαδή περίπου 90ml).

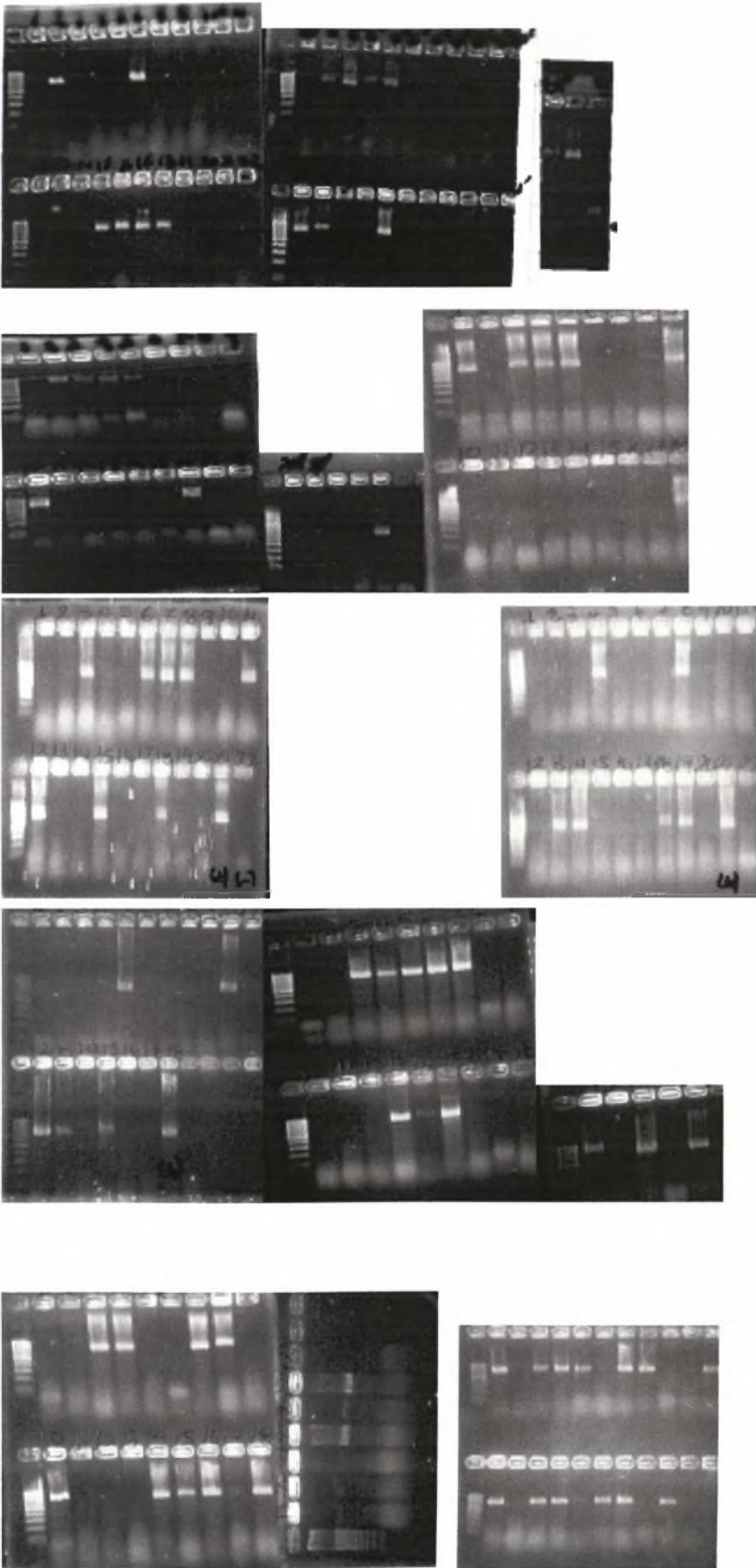
Τα 5 μ L αναμειχθηκαν με 6x loading dye solution, χρωστική που βοηθά στην εμφάνιση των ζώνων του DNA κατά την ανάγνωση τους στο υπεριώδες φως. Η σύσταση του οποίου είναι 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.005% bromophenol blue, 0.005% xylene cyanol FF και 10% glycerol [FERMENTAS-LIFE SCIENCES].

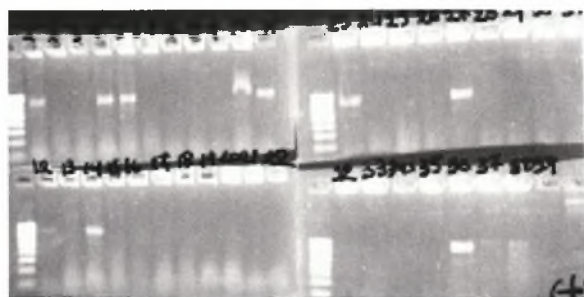
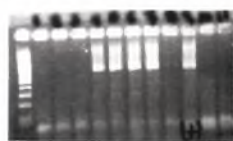
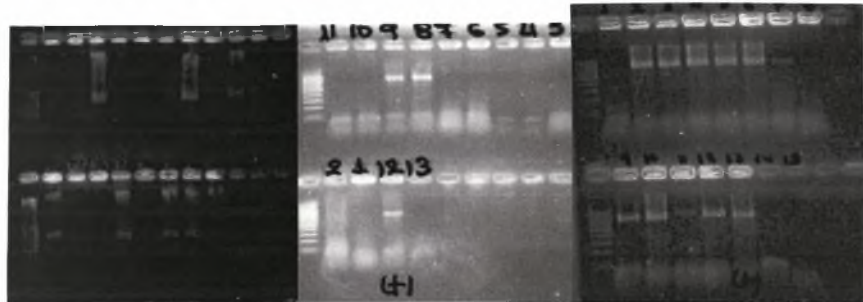
Μετά την ανάμειξη, τα μείγματα φορτώθηκαν στο gel και εφαρμόστηκε διαφορά δυναμικού 130 V στα ηλεκτρόδια της συσκευής Thermo Electron Corporation EC105. με αποτέλεσμα το DNA να αρχίσει να τρέχει προς την κάθοδο, εφόσον είναι ένα μακρομόριο αρνητικά φορτισμένο, με μια ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη με τις διαστάσεις του, ώστε να διαχωρίζονται τα διάφορα κλάσματα του. Μετά το πέρασ 20 περίπου λεπτών. Ακολούθησε τοποθέτηση τους σε διάλυμα που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 10 ng/mL για περίπου 10 λεπτά και μετέπειτα έκθεση του gel σε συσκευή υπεριώδους φωτός. Εν συνεχεία τα gel φωτογραφήθηκαν με τη χρήση ειδικής φωτογραφικής Canon.

TST (190 kb):

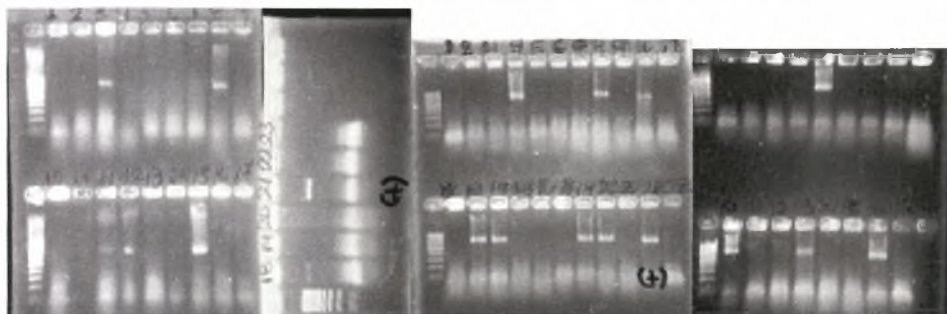
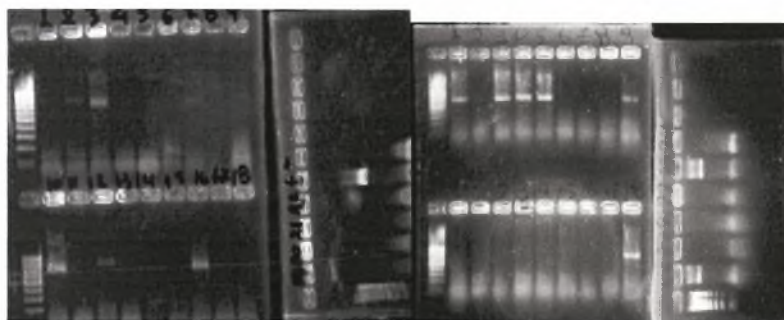
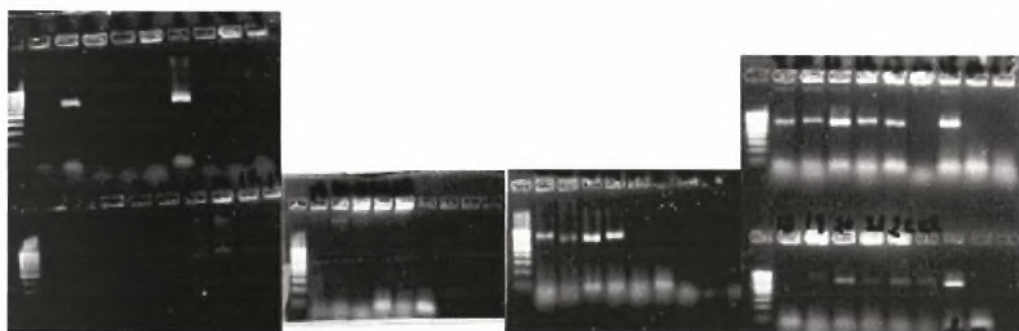


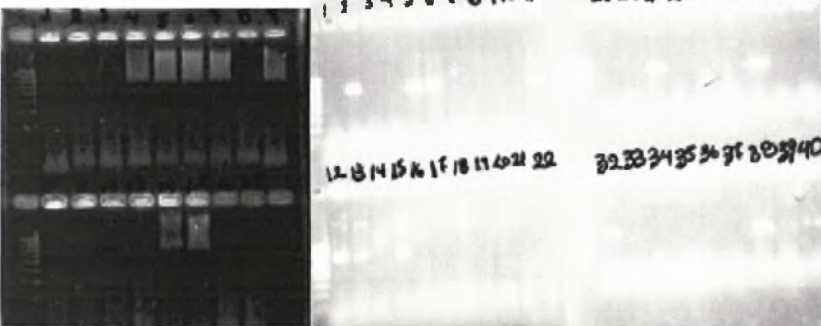
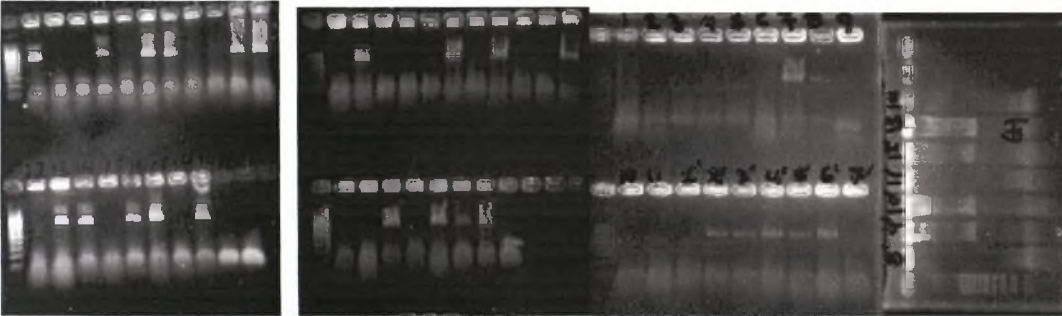
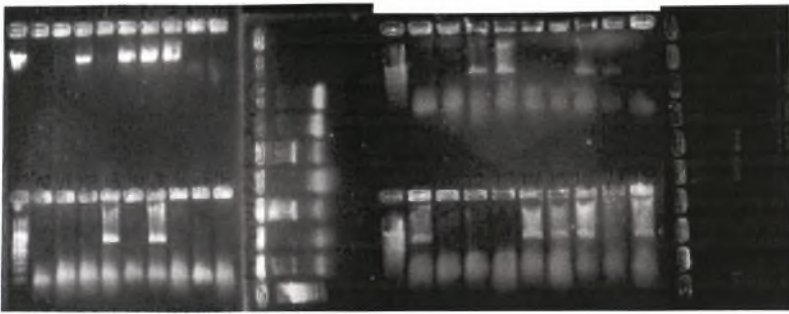
SEU(~750 kb):



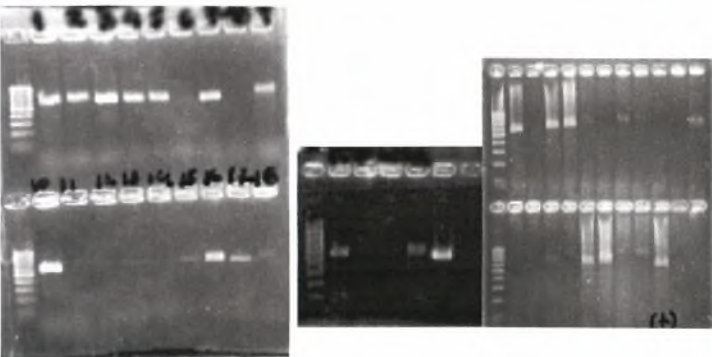
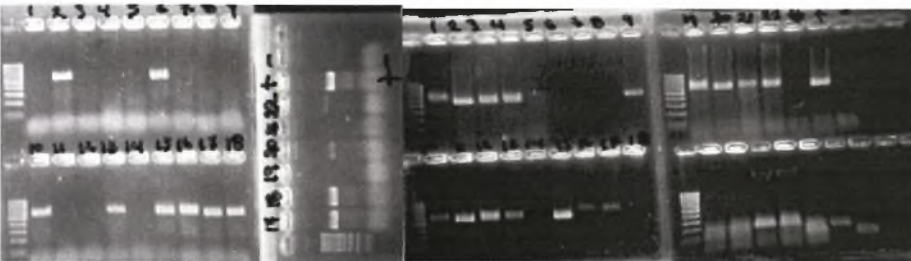


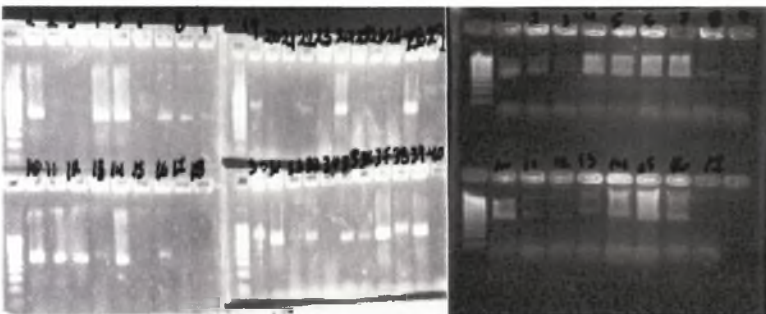
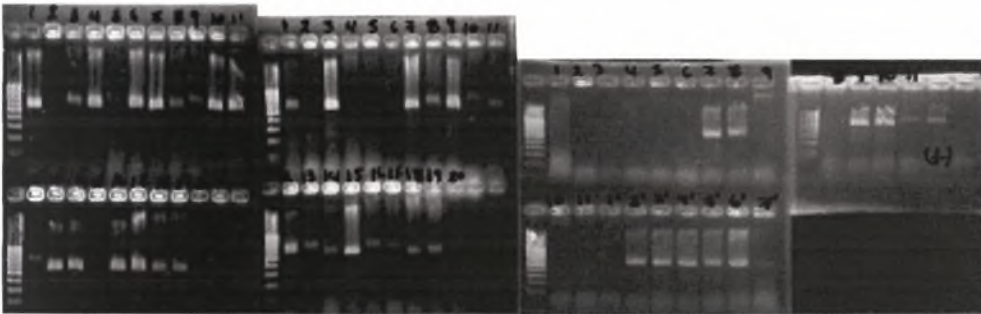
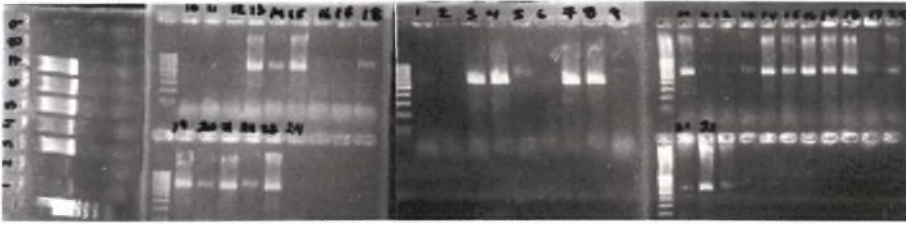
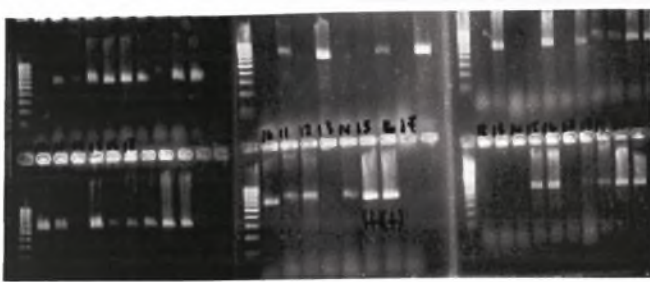
SEI (~800 kb):



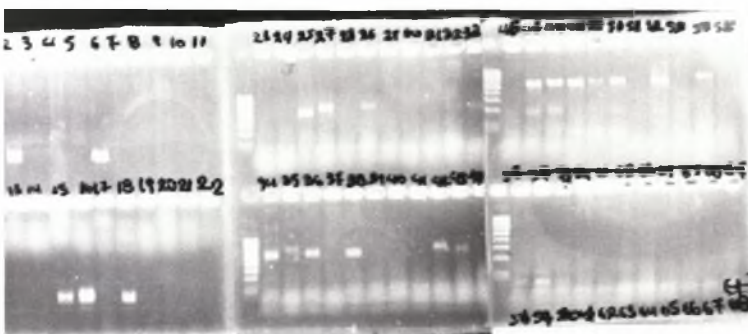


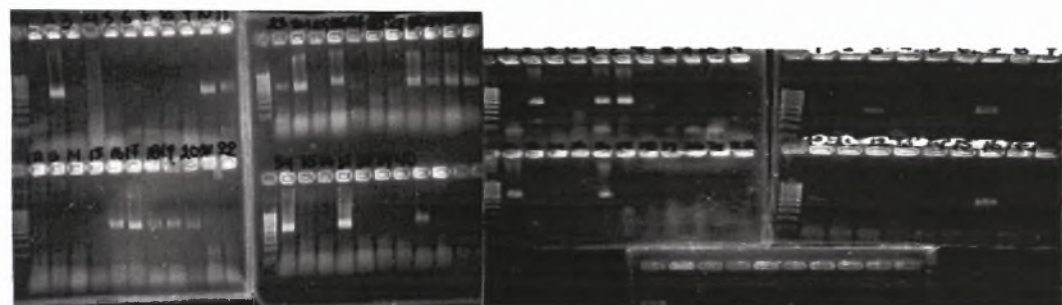
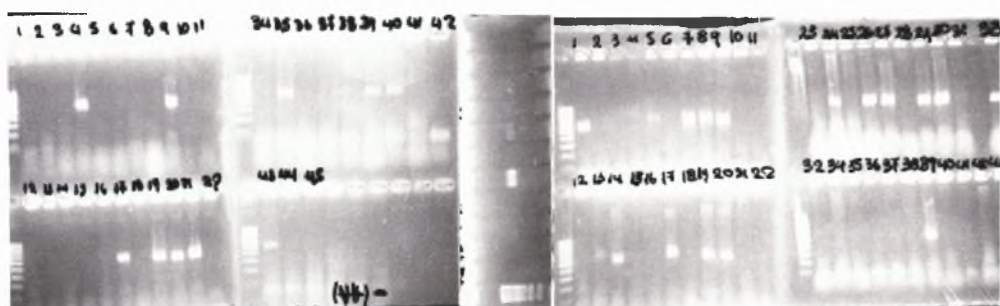
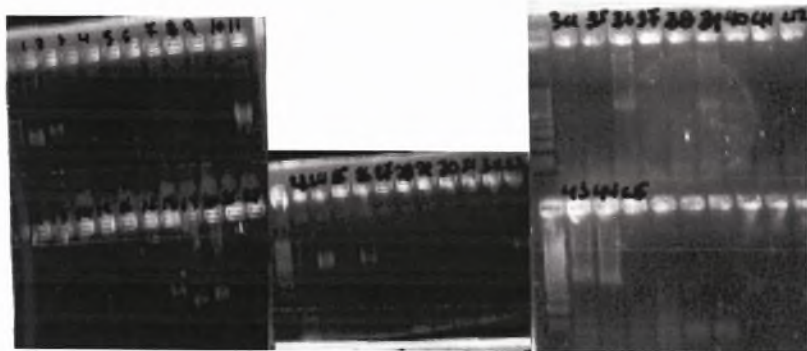
SEG(~600 kb):



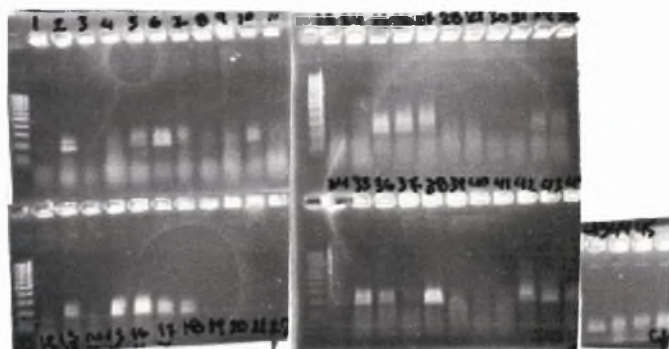


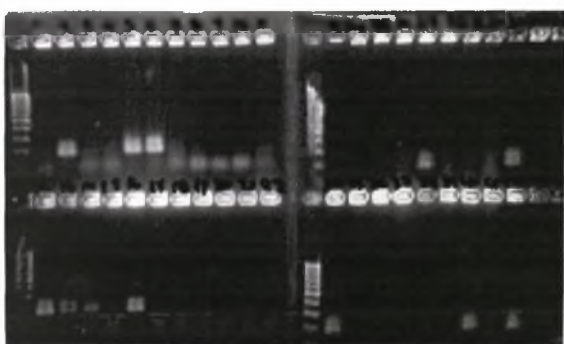
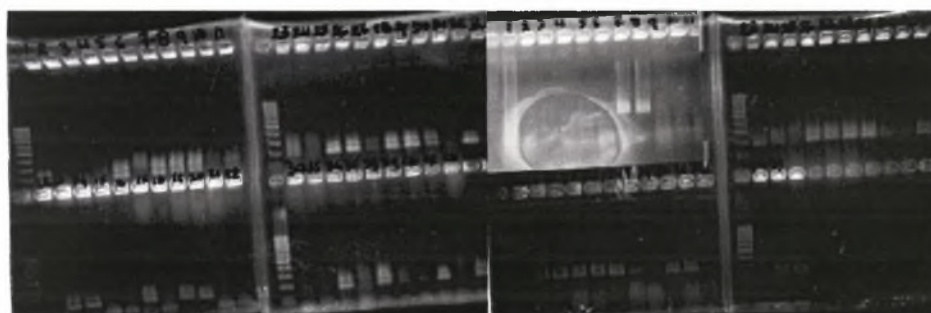
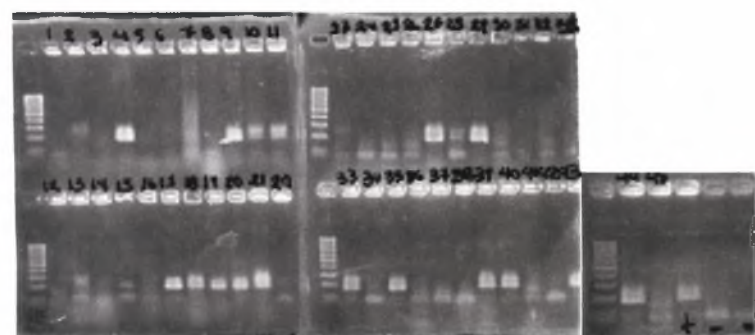
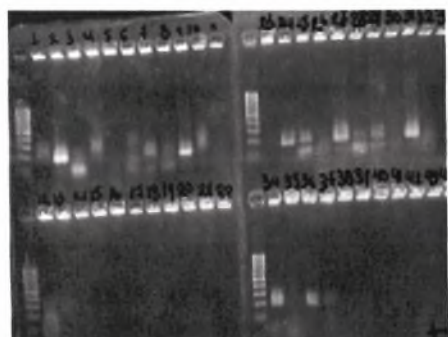
SEN (~500 kb):





SEO(~190 kb) :





8. Αποτελέσματα

Από τα 260 στελέχη *S. aureus* που εξετάστηκαν, τα 151, ποσοστό 58%, ήταν θετικά για ένα τουλάχιστον από τα έξι γονίδια που μελετήθηκαν. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφεται τόσο η παρουσία όσο και ο συνδυασμός των διαφόρων γονιδίων στα 151 στελέχη που βρέθηκαν θετικά.

Αριθμός δειγμάτων	Στελέχη	<i>tst-1</i>	<i>sem</i>	<i>sei</i>	<i>seg</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>
1	5	+	+	+	+	+	+
2	9	+	+	+	+	+	+
3	13	+	-	-	+	-	-
4	16	-	-	-	+	-	-
5	18	+	+	+	+	+	+
6	19	+	+	+	+	+	+
7	20	+	+	+	+	+	-
8	21	+	+	+	+	+	+
9	23	+	-	-	-	-	-
10	25	+	-	-	-	-	-
11	27	+	+	+	+	+	+
12	30	+	+	+	+	+	+
13	31	+	+	+	+	+	+
14	32	-	+	+	+	+	+
15	33	+	-	-	-	-	-
16	34	+	-	-	-	-	-
17	37	+	-	+	-	-	-
18	38	+	-	+	-	-	-
19	40	+	+	+	+	+	+
20	41	+	-	+	+	+	+
21	43	-	+	+	+	+	+
22	44	+	+	+	+	+	+
23	52	-	+	+	+	+	+
24	53	+	+	+	+	+	+
25	54	+	-	+	+	-	+
26	56	-	+	+	+	-	+
27	57	-	-	-	+	+	+
28	58	+	+	+	+	+	+

29	59	-	+	+	+	+	+
30	60	+	+	-	+	+	+
31	61	+	+	-	+	+	+
32	64	+	-	-	+	+	+
33	74	+	-	-	+	+	+
34	75	+	+	+	+	+	+
35	79	+	-	-	-	-	+
36	83	-	-	+	-	-	-
37	90	-	+	+	+	-	+
38	96	+	-	-	+	-	+
39	100	+	-	-	+	-	+
40	91	-	-	-	-	-	+
41	433	+	-	-	-	-	-
42	3268	+	+	-	-	-	+
43	2907	+	+	-	-	-	-
44	2979	+	+	+	+	-	+
45	7870	+	-	+	+	-	-
46	2617	+	-	-	-	-	-
47	2526	+	-	-	-	-	-
48	7583	+	+	+	+	+	+
49	3743	+	+	-	-	-	+
50	3798	+	+	+	+	+	+
51	5140	+	+	+	+	-	+
52	6262	+	+	+	+	+	+
53	6077	+	+	+	+	-	-
54	9277	+	-	-	+	-	-
55	5054	+	+	+	+	+	+
56	6202	+	+	+	+	-	+
57	5832	+	+	+	+	-	+
58	9576	+	+	+	+	+	+
59	8711	+	+	+	+	-	-
60	1493	+	+	+	+	+	+
61	1901	+	+	+	+	+	+
62	1996	+	+	+	+	+	+
63	2008	+	+	+	+	+	+
64	6514	+	+	+	+	-	+
65	3092	+	+	+	+	+	+
66	6434	-	+	+	+	-	-
67	8176	-	+	+	+	+	+
68	9378	-	+	+	-	-	-
69	9817	-	+	+	+	+	+
70	6539	-	+	+	+	+	+
71	7595	-	+	+	+	+	-
72	3321	-	+	+	-	-	-
73	6	-	+	-	+	+	-
74	2105	-	+	-	+	+	-

75	2913	-	+	+	+	+	-
76	3419	-	+	+	+	+	-
77	8246	-	+	+	+	+	+
78	9710	-	+	+	+	+	+
79	3266	-	+	+	+	+	+
80	1522	-	+	+	+	+	+
81	9001	-	+	+	+	+	-
82	9607	-	+	+	+	+	-
83	8650	-	+	+	+	+	+
84	8347	-	+	-	+	-	+
85	306	-	+	+	+	-	+
86	4329	-	+	+	-	+	+
87	3586	-	+	+	+	+	+
88	3907	-	+	+	+	+	+
89	4559	-	+	+	-	+	+
90	4431	-	+	+	+	-	+
91	4410	-	+	+	+	+	+
92	4853	-	+	+	+	+	+
93	5014	-	+	+	+	+	+
94	5393	-	+	+	+	+	+
95	5739	-	+	+	+	-	+
96	6431	-	+	+	+	+	+
97	7047	-	+	+	+	+	+
98	6953	-	+	+	+	+	+
99	8434	-	+	+	+	+	+
100	7825	-	+	-	+	-	-
101	5733	-	+	+	+	+	+
102	8837	-	+	+	+	+	+
103	8776	-	+	+	+	+	+
104	8780	-	+	+	+	+	-
105	8528	-	+	+	+	+	+
106	6257	-	+	+	+	+	+
107	9133	-	+	+	+	+	+
108	7649	-	+	+	+	+	+
109	9577	-	+	+	+	+	+
110	3613	-	+	+	+	+	+
111	9820	-	+	+	+	-	-
112	9575	-	+	+	-	+	+
113	1497	-	+	+	-	-	-
114	869	-	-	-	+	+	-
115	1878	-	+	-	+	+	+
116	2218	-	+	+	+	+	+
117	2338	-	+	+	+	+	+
118	2351	-	+	+	+	+	+
119	2366	-	+	+	+	+	-
120	6909	-	-	-	+	+	+
121	4328	-	-	-	+	+	+
122	3092	+	+	+	+	+	+
123	8528	-	+	+	+	+	+
124	1238	-	-	+	+	+	+
125	3425	-	-	-	+	+	-

126	3009	-	+	+	+	+	+
127	3033	-	+	+	+	+	+
128	3089	-	+	+	+	+	+
129	3095	-	-	+	-	-	-
130	3366	-	-	-	+	+	+
131	2230	-	-	-	+	+	+
132	2463	-	-	-	-	+	+
133	2733	-	-	-	-	+	+
134	3094	-	-	-	+	+	+
135	3156	-	+	+	-	+	+
136	6174	+	+	+	+	+	+
137	5993	+	+	+	+	+	+
138	5971	-	+	+	+	+	+
139	4375	-	+	+	+	+	+
140	4486	-	+	+	+	-	+
141	4544	-	+	+	+	-	+
142	4557	+	+	-	-	-	-
143	4631	-	-	+	+	+	+
144	5066	+	+	+	-	+	+
145	5338	-	-	+	-	+	+
146	5573	+	+	+	-	+	+
147	5580	-	-	-	+	-	+
148	5706	-	-	+	-	+	-
149	5707	-	-	-	+	-	+
150	6380	+	+	-	-	-	+
151	6497	+	+	+	-	-	+

Στον πίνακα 2 περιγράφεται το ποσοστό των στελεχών που ήταν θετικά για κάθε γονίδιο

Γονίδια	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό (%)
TST	60	23 %
SEU	111	43 %
SEI	111	43 %
SEG	121	46 %
SEO	93	36 %
SEN	108	41 %
Σύνολο	151*	58 %

*το σύνολο των θετικών δειγμάτων (=151) αφορά τον αριθμό των θετικών ως προς ένα ή σε περισσότερα γονίδια **TST, seu, sei, seg, sen και seo.**

Από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται ότι το 58% των στελεχών του *Staphylococcus aureus* βρέθηκαν θετικά στο γονίδιο της τοξίνης του τοξικού σοκ ή/και σ'ένα ή περισσότερα γονίδια εντεροτοξινών *seu, sei, seg, sen και seo.* Επίσης ότι το γονίδιο *seg* είναι αυτό που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη αναλογία, ενώ ακολουθούν με μικρή διαφορά τα γονίδια *seu, sei και seo.*

9. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στην μελέτη αυτή σε στελέχη *S. aureus* της περιοχής της Θεσσαλίας εκτιμήθηκε το ποσοστό της παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορες τοξίνες. Ο *S. aureus* είναι ο αιτιολογικός παράγων πολλών μολυσματικών ασθενειών ενώ ευθύνεται τόσο για τροφικές δηλητηριάσεις όπως και για το σύνδρομο του τοξικού σοκ.

Ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης ήταν ότι μεγάλος αριθμός των στελεχών, πάνω από το 50%, έφεραν κάποιο από τα μελετηθέντα γονίδια. Σε πρόσφατη μελέτη που έγινε στην περιοχή της Πάτρας βρέθηκε ότι μόνο 33.8% των στελεχών έφεραν κάποιο από τα γονίδια που αναφέραμε. Το κυρίαρχο γονίδιο στα στελέχη της περιοχής μας ήταν το γονίδιο *seg*, και ακολουθούσαν τα γονίδια *sem, sei, sen και seo.* Σε αντίστοιχες μελέτες παγκοσμίως σε στελέχη *S. aureus* το γονίδιο *seg* είναι το κυρίαρχο.

Ο ρόλος που πιθανόν παίζουν οι τοξίνες στην παθογονικότητα του ανωτέρω μικροοργανισμού δεν έχει επακριβώς διευκρινιστεί. Σήμερα, η εισαγωγή τεχνικών μοριακής βιολογίας στο κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο βοηθά στην γρήγορη ανίχνευση των συγκεκριμένων γονιδίων παθογονικότητας. Ωστόσο, η ανίχνευση των παραπάνω γονιδίων με την τεχνική της αλυσιδωτής υποδηλώνει μόνο την παρουσία των γονιδίων χωρίς να μπορεί να αποδείξει την παραγωγή των αντίστοιχων τοξινών. Πιθανότατα, η εφαρμογή μιας ανοσοενζυμική μέθοδος για την ανίχνευση τοξινών, θα μπορούσε να διευκρινήσει αν τα στελέχη που στο γονιδιώμα τους φέρουν τα γονίδια παθογονικότητας έχουν παράλληλα και ικανότητα να παράγουν τις αντίστοιχες τοξίνες.

10. Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Becker K, A. W. Friefrich, G. Peters, and C von Eiff. 2004. Systematic surveillance on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. *Mol Nutr Food Res* 48: 488-95
2. Chini V, G. Dimitracopoulos, and I. Spiliopoulou. Occurrence of the enterotoxin gene cluster and the toxic shock toxin 1 gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is related to clonal type and agr alleles. *J Clin Microbiol* 44: 1881-1883
3. Dinges M, P. Orwin, and P. M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* *Rev* 13: 16-34
4. El-Huneidi W, S. Bdour, A. Mahasneh. 2006. Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and o a novel *aroA* genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56 : 127-132
5. Jarraud s, M. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M.Bes, C. Mougel, J Etienne, and G. Lina. 2001. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a pu in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 166:669-667
6. Lettetre C, S. Perelle, F. Dilasser, and P. Fach. 2003. Identification of a new p of the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95: 38-43
7. Lina G, G. A. Bolach, S. P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche, and R. M. Nomenclature Committee for Staphylococcal superantigens. 2004. Standards superantigens expressed by *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 189: 2334-2336
8. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339 :520-532
9. Mendoza FJM, MC Martin. 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: Epidemiology and genetic findings. *Microb Infect* 7:187-194

10. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική των λοιμώξεων
Τόμος 1. Σταφυλόκοκκος σελ 69-92
11. www.foogle.biz-super.bugs.mrsa-gram.positive.jpg
12. www.nmconline.org-images.Staureus.jpg

