



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διπλωματική Εργασία

**Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του ανθεκτικού στη
μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* σε βιολογικά υγρά**

Ιωάννα Σακλά

Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος Λαγουμιντζής

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Σακλά Ιωάννας που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του ανθεκτικού στη
μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* σε βιολογικά υγρά**

Ιωάννα Σακλά

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Λαγουμιντζής

Μαργαρίτης Αυγέρης

Επίκουρος Καθηγητής

Αναπληρωτής Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Πατρών

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Για τη Μαρία Α., τη Στέλλα Χ., τη Μαρία Φ. και τη Δήμητρα Π.,

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Λαγουμιντζή για την συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του ώστε να πραγματοποιηθεί η συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπροσθετως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου και τους φίλους μου και ιδιαιτέρως τον Μάνο και Αποστόλη που είναι βράχοι σε ό,τι περνάω καλό ή κακό και την οικογένεια μου, κυρίως τον σύζυγό μου Δημήτρη, την μητέρα μου και την καλή μου Αγλαΐα για όλη τη στήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, και συγκεκριμένα του *Staphylococcus aureus* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA), αποτελεί σημαντική πρόκληση για τη δημόσια υγεία. Η ανάπτυξη του MRSA έχει μειώσει την αποτελεσματικότητα παραδοσιακών αντιβιοτικών όπως η βανκομυκίνη και η δαπτομυκίνη, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων.

Η παρούσα εργασία εξετάζει διεξοδικά τις παραδοσιακές και σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης του MRSA σε βιολογικά υγρά. Στις παραδοσιακές μεθόδους περιλαμβάνονται η καλλιέργεια και οι βιοχημικές δοκιμασίες, οι οποίες, αν και αξιόπιστες, συχνά απαιτούν μεγάλο χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό. Αντίθετα, οι σύγχρονες μέθοδοι προσφέρουν γρήγορες και ακριβείς διαγνώσεις. Τεχνολογίες όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και οι βιοαισθητήρες έχουν παρουσιάσει υποσχόμενα αποτελέσματα στη βελτίωση της ταχύτητας και της ακρίβειας της ανίχνευσης του MRSA. Η εργασία συγκρίνει τις μεθόδους αυτές, αναλύοντας τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, και καταλήγει στο ότι οι σύγχρονες μέθοδοι μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά τη διαχείριση των λοιμώξεων από MRSA.

Παράλληλα, αναλύονται οι πρόσφατες εξελίξεις στη χρήση τεχνικών, όπως η ELISA και η PCR, που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην ταυτοποίηση του παθογόνου με μεγαλύτερη ακρίβεια και ταχύτητα.

Λέξεις – Κλειδιά

Μέθοδοι ανίχνευσης, Ταυτοποίηση, MRSA, Βιολογικά υγρά

Detection and Identification Methods of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biological Fluids

Ioanna Sakla

Abstract

The resistance of bacteria to antibiotics, particularly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), presents a significant challenge to public health. The development of MRSA has reduced the effectiveness of traditional antibiotics such as vancomycin and daptomycin, making the development of new and more effective diagnostic and therapeutic methods necessary. This study thoroughly examines traditional and modern methods for the detection and identification of MRSA in biological fluids. Traditional methods include culture and biochemical tests, which, although reliable, often require considerable time and specialized personnel. In contrast, modern methods offer rapid and accurate diagnoses. Technologies such as DNA microarrays and biosensors have shown promising results in improving the speed and accuracy of MRSA detection. The study compares these methods, analyzing their advantages and disadvantages, and concludes that modern methods can significantly improve the management of MRSA infections. Additionally, recent advances in techniques such as ELISA and PCR are analyzed, which have proven effective in identifying the pathogen with greater accuracy and speed.

Keywords

Detection methods, Identification, MRSA, Biological fluids

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	xii
Κεφάλαιο 1. Ο Σταφυλόκοκκος MRSA	1
1.1 Γνωριμία με τον Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 Κατανόηση του MRSA	2
1.2.1 Ιστορικό υπόβαθρο και ανακάλυψη του MRSA	2
1.2.2 Ταξινόμηση του <i>S.aureus</i>	5
1.2.3 Τρόπος Δράσης και Μορφολογικά χαρακτηριστικά στελεχών MRSA	8
1.2.4 Γενετική του MRSA και μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	9
1.2.5 Μετάδοση του MRSA και παράγοντες κινδύνου λοίμωξης	14
1.2.6 Διάγνωση των λοιμώξεων από το βακτήριο MRSA	16
1.2.7 Εργαστηριακές και απεικονιστικές εξετάσεις για λοιμώξεις από MRSA	17
1.2.8 Θεραπευτικές μέθοδοι	17
Κεφάλαιο 2. Είδη βιολογικών σωματικών υγρών	21
2.1 Εισαγωγή	21
2.2 Ορισμός των βιολογικών σωματικών υγρών	21
2.2.1 Κατηγορίες βιολογικών σωματικών υγρών στην διάγνωση ασθενειών ...	22
2.3 Προετοιμασία Δειγμάτων για Καλλιέργεια και Γονοτυπικές Μεθόδους	25
2.3.1 Αίμα	25
2.3.2 Ούρα	26
2.3.3 Σάλιο και Ρινικό Επίχρισμα	27
Κεφάλαιο 3. Ανίχνευση του MRSA	28
3.1 Εισαγωγή στις μεθόδους ανίχνευσης του MRSA	28
3.1.2 Επισκόπηση των παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης MRSA	28
3.1.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης του MRSA	29
3.1.4 Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης MRSA	37
3.2 Τεχνικές φασματομετρίας στην ανίχνευση του MRSA	69
3.2.1 Εισαγωγή στη φασματομετρία	69
3.2.2 Τεχνικές φασματομετρίας	69
3.3 Τεχνικές χρωματογραφίας στην ανίχνευση του MRSA	72
3.3.1 Εισαγωγή στη χρωματογραφία	72
3.3.2 Τεχνικές χρωματογραφίας	72
3.4 Επιπρόσθετες τεχνικές ανίχνευσης	75
	vii

3.4.1 Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH).....	75
3.4.2 Βιοαισθητήρες για ανίχνευση MRSA.....	76
Κεφάλαιο 4. Εφαρμογές μεθόδων ανίχνευσης του MRSA σε δείγματα βιολογικών υγρών...	78
4.1 Σκοπός της έρευνας.....	78
4.2 Ερευνητικές μέθοδοι ανίχνευσης του MRSA	78
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα	94
Βιβλιογραφικές Αναφορές	101

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1. Απεικόνιση του σταφυλόκοκκου ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA).	2
Εικόνα 2. Ποσοστό θνησιμότητας λόγω MRSA βακτηριαμίας εκτός νοσοκομείου (Κοινότητα) στην Αγγλία για τα έτη 2007 – 2022.	4
Εικόνα 3. Ποσοστό θνησιμότητας λόγω MRSA βακτηριαμίας εντός νοσοκομείου (Νοσοκομείο) στην Αγγλία για τα έτη 2007 – 2022.	4
Εικόνα 4. Τύποι του MRSA.	6
Εικόνα 5. Τρόπος δράσης των β-λακταμικών ουσιών.	11
Εικόνα 6. Η χημική ένωση του αντιβιοτικού της μεθικιλίνης.	12
Εικόνα 7. Κύρια γονιδιωματικά στοιχεία στον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> .	13
Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης του της νέκρωσης των ιστών από το βακτήριο MRSA.	16
Εικόνα 9. Γενικός αντιβακτηριακός μηχανισμός βακτηριοφάγων έναντι του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη στελέχους <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).	19
Εικόνα 10. Μορφολογία του βακτηριοφάγου MRSA που προσδιορίζεται με TEM (ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης).	20
Εικόνα 11. Μορφολογία αποικιών όπως παρατηρείται κατά τον έλεγχο CHROMagar MRSA. a) <i>Staphylococcus hominis</i> . b) Επιβεβαιωμένο ως MRSA. c) <i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i> (MSSA). d) <i>Staphylococcus cohnii</i> .	30
Εικόνα 12. Δοκιμή συγκόλλησης λατέξ που δείχνει θετική αντίδραση για PBP2a σε MRSA.	32
Εικόνα 13. Μέθοδος διάχυσης δίσκου Kirby Bauer για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.	33
Εικόνα 14. Western Blotting (Ανοσοαποτύπωση): Ηλεκτροφόρηση πηκτής για πρωτεΐνες.	35
Εικόνα 15. PBP2 στο υπερκείμενο του καλλιιεργημένου διαλύματος MRSA.	36
Εικόνα 16. Σχηματικό διάγραμμα PCR.	42
Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της PCR όπου φαίνεται η εξάρτηση του φθορισμού από τον αριθμό των κύκλων.	43
Εικόνα 18. Τρόπος δράσης της χρωστικής SYBR Green I.	44
Εικόνα 19. Μορφές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται συνήθως για PCR σε πραγματικό χρόνο.	45
Εικόνα 20. Διαδικασία της PFGE.	48
Εικόνα 21. Απλή ρύθμιση και βήματα για ανίχνευση με DNA μικροσυστοιχίες.	49
Εικόνα 22. Σχηματική σύγκριση των τρεχόντων τύπων SCCmec.	51
Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση της εκτομής και της ενσωμάτωσης του SCCmec στον MRSA.	52
Εικόνα 24. Ανάλυση MST στελεχών MRSA βάσει δεδομένων MLST.	54
Εικόνα 25. Δομή του γονιδίου <i>sra</i> , που κωδικοποιεί το πεπτίδιο A.	56
Εικόνα 26. Επίδειξη ποσοτικής τριπλής LAMP δοκιμασίας βασισμένη σε ανιχνευτές για την ανίχνευση του MRSA.	58

Εικόνα 27. Ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδιώματος των κλινικών και περιβαλλοντικών απομονώσεων του CA- MRSA.	61
Εικόνα 28. Είδη της μεθόδου ELISA.	64
Εικόνα 29. Σχηματικό διάγραμμα του πολλαπλού συστήματος LFIA βασισμένο σε διπλό σύζευγμα AuNPs. α) Ταινία πεπτιδογλυκάνης (ταινία ειδική για <i>S. aureus</i>), β) Ταινία PBP2a (ταινία ειδική για MRSA).	66
Εικόνα 30. Lab on a chip (LOC) είναι μια συσκευή που ενσωματώνει εργαστηριακές λειτουργίες σε νανοτσίπ.	68
Εικόνα 31. Η μέθοδος MALDI-TOF MS για τη διάκριση του ευαίσθητου στη μεθικιλίνη και του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Εικόνα 32. Εξοπλισμός αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας Μάζας (GC-MS).	74
Εικόνα 33. Η ροή εργασίας της συνολικής διαδικασίας για την ταχεία ανίχνευση του MRSA βασισμένη στη δοκιμασία RPA-CRISPR/Cas12a σε έναν σωλήνα εντός 20 λεπτών.	77
Εικόνα 34. Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου <i>mecA</i>	82
Εικόνα 35. multiplex PCR γονιδίων <i>mecA</i> και PVL.	82
Εικόνα 36. Πλάκα ELISA που δείχνει την αντιδραστικότητα τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων.	86
Εικόνα 37. Dot-blot ELISA που δείχνει την αντιδραστικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος MAbl κατά των θετικών και αρνητικών στελεχών <i>S. aureus</i> για PVL.....	87
Εικόνα 38. Σχηματικό διάγραμμα ανίχνευσης <i>S. aureus</i>	88
Εικόνα 39. Χαρακτηρισμός των υβριδικών νανοανθών CBD-HRP-Cu ₃ (PO ₄) ₂	88
Εικόνα 40. Βελτιστοποίηση των συνθηκών ανίχνευσης ELISA με βάση τα νανοάνθη.	89
Εικόνα 41. Σχηματικό διάγραμμα μιας χάρτινης συσκευής LAMP.	91
Εικόνα 42. Όριο ανίχνευσης και ειδικότητα των χάρτινων επιθεμάτων LAMP για το βακτήριο MRSA.	92

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των HA-MRSA και CA-MRSA.	7
Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων <i>mecA</i> , <i>PVL</i>	79
Πίνακας 3. Οι συνθήκες της real time PCR.	79
Πίνακας 4. Συνθήκες αλληλούχισης των γονιδίων <i>mecA</i> και <i>PVL</i> με multiplex PCR.....	80
Πίνακας 5. Διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου PCR και της συμβατικής καλλιέργειας	92
Πίνακας 6. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης του MRSA.....	98

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

arcC	carbamate kinase
aroE	shikimate dehydrogenase
BamHI	restriction Enzyme from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
BL21(DE3)-pLysS	<i>E. coli</i> Strain for Protein Expression
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i> DNA Polymerase
CA	Community Associated
CBD-HRP-Cu ₃ (PO ₄) ₂	Choline Binding Domain-Horseradish Peroxidase Copper Phosphate
Ccr	Cassette Chromosome Recombinase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFR	Code of Federal Regulations
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dot-ELISA	Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DFI	DNA Fragmentation Index
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
glpF	glycerol kinase
gmK	guanylate kinase
HA	Healthcare Associated
HindIII	Restriction Enzyme from <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
HRP	Horseradish Peroxidase
IMS	Immunomagnetic Separation
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IsaA	Immunodominant <i>Staphylococcal</i> Antigen A
IgG1-mAb	Immunoglobulin G1 Monoclonal Antibody
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LFIA	Lateral Flow Immunoassay
LukF-PV	Leukocidin F Component of Panton-Valentine Leukocidin
LukS-PV	Leukocidin S Component of Panton-Valentine Leukocidin
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

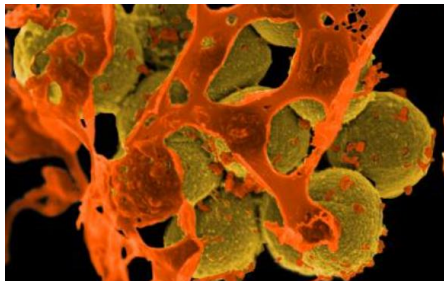
MGEs	Mobile Genetic Elements
MLST	Multilocus Sequence Typing
MSA	Mannitol Salt Agar
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
NGS	Next-Generation Sequencing
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ODD	Oxacillin Disk Diffusion
orfX	Open Reading Frame X
pta	phosphate acetyltransferase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PMNs	Polymorphonuclear Neutrophils
PVL	Panton-Valentine Leukocidin
SE	Staphylococcal Enterotoxin
SCCmec	Staphylococcal Chromosomal Cassette mec
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
spa	Staphylococcal Protein A
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
tpi	triosephosphate isomerase
WGS	Whole Genome Sequencing

Κεφάλαιο 1. Ο Σταφυλόκοκκος MRSA

1.1 Γνωριμία με τον Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

Ο Sir Alexander Ogston χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το όνομα "*Staphylococcus*" το 1883. Ο όρος σταφυλόκοκκος χρησιμοποιείται συνήθως για όλα τα είδη και αναφέρεται στη συνήθεια των κυττάρων να σχηματίζουν ομάδες που μοιάζουν με σταφύλια. Οι σταφυλόκοκκοι ταξινομούνται μικροβιολογικά ως θετικοί κατά Gram, μη σπορογόντοι, μη κινητικοί και προαιρετικά αναερόβιοι. Ο Rosenbach, το 1884, έκανε διαχωρισμό στα στελέχη των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* σε παθογόνους και σε αυτούς που δεν προκαλούσαν ασθένειες. (Britannica, 2024 ; Χίνη, 2007).

Ο MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) είναι ένας τύπος βακτηρίου *S. aureus* 0.5 έως 1.5 μm και ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae* που έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη, ένα είδος αντιβιοτικού που ανήκει στις πενικιλίνες. Πρόκειται για ένα Gram-θετικό παθογόνο μικρόβιο που μπορεί να προκαλέσει πολλές μολυσματικές ασθένειες, ιδιαίτερα λοιμώξεις της κοινότητας και του νοσοκομείου. Ο συγκεκριμένος σταφυλόκοκκος χαρακτηρίζεται για την αντοχή του στα αντιβιοτικά βήτα-λακτάμης, όπως η μεθικιλίνη και για την ικανότητά του να προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο *S. aureus* που σχετίζεται με τη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης αυξάνει τον κίνδυνο πνευμονίας και επακόλουθης θνησιμότητας. Η λοίμωξη από *S. aureus* (MRSA) ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1960 και νέοι κλώνοι εμφανίστηκαν συνεχώς στη συνέχεια. Οι λοιμώξεις από MRSA έχουν γίνει ένα από τα θέματα δημόσιας υγείας του 21ου αιώνα. Αν και η μεθικιλίνη δεν χρησιμοποιείται πλέον, ο MRSA είναι ευρέως διαδεδομένος και πιστεύεται ότι περίπου 50 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως φιλοξενούν τον οργανισμό. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται η δομή του MRSA (Liu et al, 2021).



Εικόνα 1. Απεικόνιση του σταφυλόκοκκου ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA) (Liu et al, 2021).

1.2 Κατανόηση του MRSA

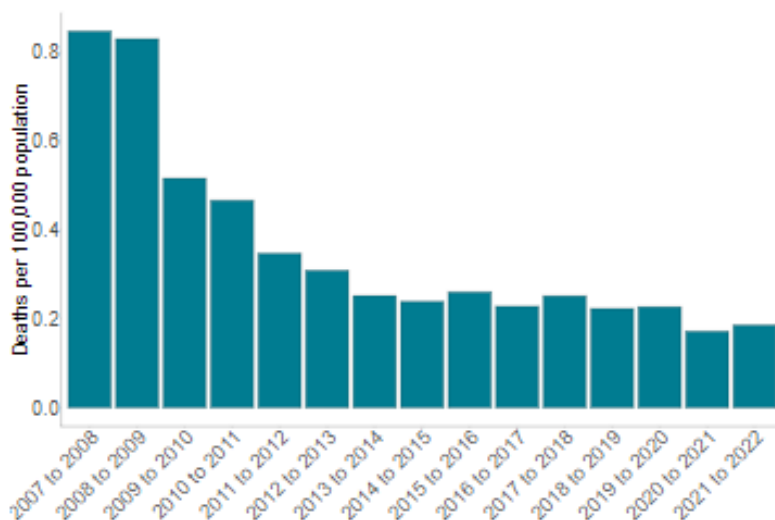
1.2.1 Ιστορικό υπόβαθρο και ανακάλυψη του MRSA

Το ιστορικό υπόβαθρο και η ανακάλυψη του σταφυλόκοκκου MRSA είναι κεντρικής σημασίας για την κατανόηση της εξέλιξης αυτού του παθογόνου και των επιπτώσεών του στην υγειονομική περίθαλψη. Αρχικά, εντοπίστηκε σε νοσοκομεία του Ηνωμένου Βασιλείου τη δεκαετία του 1960, η εμφάνιση του οποίου χαρακτηρίστηκε από ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, ιδίως στην πενικιλίνη, αποτελώντας σημαντική πρόκληση για τα θεραπευτικά σχήματα. Με την πάροδο του χρόνου, ο MRSA άρχισε να δείχνει την προσαρμοστικότητά του και τη δυνατότητά του για ευρεία μετάδοση, διεισδύοντας πέρα από τα όρια των νοσοκομείων και πέρα από κοινότητες και σύνορα, καθώς διάφορα στελέχη του MRSA, όπως τα EMRSA-15, EMRSA-16 και αφρικανικά στελέχη όπως το CC398, έτυχαν παγκόσμιας προσοχής, η πολύπλοκη επιδημιολογία του MRSA έγινε εμφανής, αναδεικνύοντας την ανάγκη για ισχυρή επιτήρηση των λοιμώξεων και μέτρα ελέγχου για τον περιορισμό της εξάπλωσής του (Grema et al., 2015).

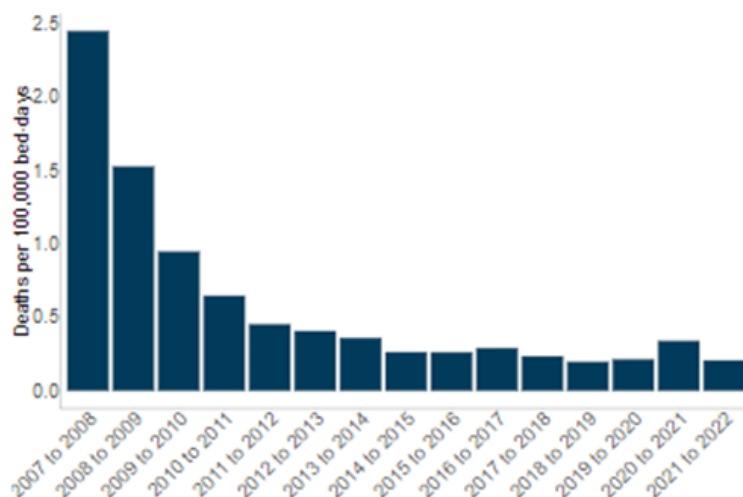
Το 1974, λιγότερο από το 2% των λοιμώξεων από *S. aureus* στις ΗΠΑ οφείλονταν σε MRSA ενώ το 2004 πάνω από το 60% οφείλονταν στο συγκεκριμένο βακτήριο. Αντίστοιχα, στο Ηνωμένο Βασίλειο, περίπου 50 άτομα πέθαναν από λοιμώξεις MRSA το 1993, ενώ το 2006 περισσότεροι από 1.600 άνθρωποι πέθαναν από λοιμώξεις του συγκεκριμένου σταφυλόκοκκου. Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με MRSA αυξάνονται σε όλη τη Δυτική

Ευρώπη, καθώς και στην Αυστραλία, την Κίνα, τη Σιγκαπούρη, την Ιαπωνία και την Ελλάδα. Είναι δύσκολο να εξηγηθεί αυτή η αύξηση, αλλά η έλλειψη ελέγχου των λοιμώξεων στα νοσοκομεία, ο αυξανόμενος αριθμός φορέων MRSA και η εμφάνιση στελεχών MRSA που προσβάλλουν υγιή άτομα στην κοινότητα φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες (Britannica, 2024).

Το 2008, ο MRSA αντιπροσώπευε το 44% των λοιμώξεων που σχετίζονται με την ιατρική και προκάλεσε το 22% των θανάτων. Στις Ηνωμένες Πολιτείες προκάλεσε περίπου 11.000 έως 18.000 θανάτους κάθε χρόνο. Κατά τη διάρκεια του έτους 2021 έως 2022, αναφέρθηκαν 673 περιπτώσεις βακτηριαμίας MRSA στην Αγγλία. Πληροφορίες σχετικά με τη θνησιμότητα ήταν διαθέσιμες για το 97,3% (655 θάνατοι) αυτών των περιπτώσεων. Υπήρξαν 172 θάνατοι μέσα σε 30 ημέρες από τη διάγνωση βακτηριαμίας MRSA, ποσοστό θνησιμότητας 0,3 θανάτων ανά 100.000 πληθυσμού. Παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια αρκετών οικονομικών ετών μειώθηκε η θνησιμότητα εξαιτίας του συγκεκριμένου σταφυλόκοκκου, έχοντας ως επίκεντρο τις τάσεις θνησιμότητας και τους συντελεστές θνησιμότητας (CFR) μεταξύ των κρουσμάτων που προέρχονται από την κοινότητα (CA) και εκείνων που σχετίζονται με τον τομέα της υγείας (HA). Ο ρυθμός θνησιμότητας μειώθηκε από 2,6 σε 0,3 θανάτους ανά 100.000 πληθυσμού μεταξύ των οικονομικών ετών 2007 έως 2008 και 2021 έως 2022. Ο CFR μειώθηκε από 38,9% στο οικονομικό έτος 2007 έως 2008 σε 26,3% στο οικονομικό έτος 2021 έως 2022, όπως φαίνεται στις εικόνες 2 και 3 (UK Health Security Agency, 2023).



Εικόνα 2. Ποσοστό θνησιμότητας λόγω MRSA βακτηριαμίας εκτός νοσοκομείου (Κοινότητα) στην Αγγλία για τα έτη 2007 – 2022 (UK Health Security Agency, 2023).



Εικόνα 3. Ποσοστό θνησιμότητας λόγω MRSA βακτηριαμίας εντός νοσοκομείου (Νοσοκομείο) στην Αγγλία για τα έτη 2007 – 2022 (UK Health Security Agency, 2023).

Γενικά, τα τελευταία 5 χρόνια παρουσιάζεται μία πτωτική τάση στα περιστατικά των λοιμώξεων από MRSA. Αυτό υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα των παρεμβάσεων που στοχεύουν στην μετάδοση σε περιβάλλον υγειονομικής περίθαλψης. Παρ' όλα αυτά, μερικές μελέτες αναφέρουν μια ανησυχητική τάση του MRSA να επηρεάζει νεότερες ηλικιακές ομάδες σε σύγκριση με το παρελθόν (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

1.2.2 Ταξινόμηση του *S. aureus*

Η ταξινόμηση του *S. aureus* περιλαμβάνει διακριτές γενετικές γενεαλογίες και κλωνικά σύμπλοκα, αντανakλώντας τα ποικίλα στελέχη και τις επιδημιολογικές παραλλαγές του (Grema et al., 2015). Οι τύποι κλώνων MRSA (**βλέπε εικόνα 4**) που έχουν ανιχνευθεί είναι οι εξής:

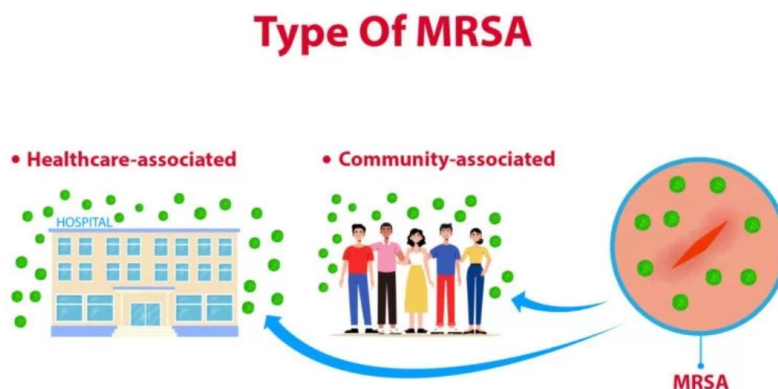
Κλώνος δεκαετίας του 1960: Πρόκειται για έναν αρχαίο κλώνο που πρωτοεμφανίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο. Ήταν αρκετά περιορισμένος γεωγραφικά, εστιάζοντας κυρίως στην Ευρώπη, και έχει πλέον εξαφανιστεί σε μεγάλο βαθμό.

HA-MRSA: Αυτοί οι κλώνοι ευθύνονται για την παγκόσμια πανδημία MRSA που ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980. Εμφανίζονται κυρίως σε νοσοκομειακό περιβάλλον και διακρίνονται από ένα περιορισμένο αριθμό βακτηριακών κλώνων. Λόγω του μειωμένου ανοσοποιητικού τους συστήματος, οι νοσηλευόμενοι ασθενείς είναι πιο επιρρεπείς στη μόλυνση από το παθογόνο βακτήριο. Η παρουσία διαβήτη, η πιθανή προηγούμενη νοσηλεία, η χειρουργική επέμβαση, η προηγούμενη λοίμωξη από MRSA, η αιμοκάθαρση και η νοσηλεία σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) μπορούν όλα να συμβάλλουν στην ευαισθησία σε αυτόν τον μικροοργανισμό. Οι ασθένειες που συνδέονται συνήθως με το εξαιρετικά επικίνδυνο HA-MRSA περιλαμβάνουν λοιμώξεις που σχετίζονται με ενδοφλέβιο καθετήρα, πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, δερματίτιδα, σήψη, καθώς και καρδιαγγειακά και αναπνευστικά προβλήματα (Lakhundi & Zhang, 2018).

CA-MRSA (Κοινοτικοί): Σε αντίθεση με τους HA-MRSA, αυτοί οι κλώνοι εντοπίζονται στην κοινότητα και δεν σχετίζονται άμεσα με νοσοκομειακές ρυθμίσεις. Η μικρότερη δομή των

τύπων SCCmec που φέρουν τους καθιστά πιο ικανούς στην εξάπλωση και τη μόλυνση ατόμων με καλή υγεία. έντε κυρίαρχα στελέχη CA-MRSA μπορούν να βρεθούν παγκοσμίως, αν και ο επιπολασμός τους ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική τοποθεσία. Οι διάφοροι τύποι MRSA περιλαμβάνουν ST1-IV, ST8-IV, ST30-IV, ST59-IV και ST80-IV. Ένας συγκεκριμένος τύπος, το CA-MRSA ST30-IV, ξεχωρίζει μεταξύ τους. Ένα διαδεδομένο στέλεχος του MRSA, γνωστό ως CA-MRSA ST80-IV, βρίσκεται στον νοτιοδυτικό Ειρηνικό και μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές λοιμώξεις. Ωστόσο, είναι ευαίσθητο στην πλειονότητα των διαθέσιμων αντιβιοτικών.

Ο CA-MRSA, ένας μικροοργανισμός που ανακαλύφθηκε αρχικά στην Ελλάδα το 2003, πιστεύεται ότι προέρχεται από τη Βόρεια Αφρική με βάση τα ευρήματα της έρευνας. Τα ST59-IV και ST59-V, τα οποία επικρατούν στις ασιατικές χώρες, έχουν επίσης ανιχνευθεί στην Ευρώπη, την Αμερική και την Αυστραλία. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες παραλλαγές, όπως το ST72. Υπάρχουν διάφορα στελέχη του ιού που υπάρχουν σε διάφορες χώρες, όπως το IV στη Νότια Κορέα και το ST97-V στο Ηνωμένο Βασίλειο. Το κυρίαρχο στέλεχος CA-MRSA που προκαλεί παγκόσμια ανησυχία είναι το CA-MRSA USA300, γνωστό και ως CA-MRSA ST8-IV. Αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος βρίσκεται πιο συχνά στις Ηνωμένες Πολιτείες (Mediavilla et al., 2012). Ωστόσο, περιπτώσεις αυτού έχουν επίσης ανακαλυφθεί στην Ευρώπη, την Αυστραλία και διάφορα άλλα έθνη.



Εικόνα 4. Τύποι του MRSA (Microbe Investigations. (n.d.). MRSA, 2024).

Livestock-associated MRSA (LA-MRSA): Το βακτήριο γνωστό ως LA-MRSA, ακρωνύμιο του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου που σχετίζεται με ζώα, ανθεκτικό στη μεθικιλίνη, έχει σημαντική σημασία όταν πρόκειται για μολυσμένα εκτρεφόμενα ζώα, καθώς έχει τη δυνατότητα να εξαπλωθεί στον άνθρωπο τόσο με άμεση επαφή με το μικρόβιο όσο και με έμμεση, μέσω μολυσμένων αντικειμένων. Αξίζει να τονιστεί ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός μπορεί να επηρεάσει και άλλους τύπους ζώων, αν και με διαφορετική επιδημιολογία. Στα κατοικίδια ζώα, τόσο η παρουσία του *Staphylococcus pseudintermedius* όσο και του βακτηρίου MSSA (ευαίσθητος στη μεθικιλίνη *S. aureus*) είναι υπεύθυνη για τη νοσηρότητα τους. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα είδη MRSA και τα βασικά χαρακτηριστικά τους (Χίνη, 2007 ; Otto, 2012).

	HA-MRSA	CA-MRSA
Παράγοντες κινδύνου	Νοσηλεία	Χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών
	Επαφή με ασθενή	Αθλήματα με τραυματισμούς
	Χειρουργική επέμβαση	Στρατιωτική θητεία
	Αιμοκάθαρση	Διαμονή σε ιδρύματα
	Χρόνια νόσος	Κολύμβηση σε πισίνες
	Προσθετικά υλικά	Φιλομόφυλοι
	Λήψη αντιβιοτικών	Λήψη αντιβιοτικών
Απομόνωση	> 48 ώρες νοσηλείας	Εντός 48 ωρών νοσηλείας
Φαινότυπος	Πολυανθεκτικός (συνήθως)	Αντοχή σε β-λακταμικά (1-3 αντιβιοτικά)
Oxacillin MIC	>4 mg/L	0.38-128 mg/L
SCCmec	I, II, III	IV, V
Τοξίνες	Ποικιλία	PVL

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των HA-MRSA και CA-MRSA (Χίνη, 2007).

Τα στελέχη MRSA που έχουν απομονωθεί στα περισσότερα νοσοκομεία του Ηνωμένου Βασιλείου προσδιορίζονται ως EMRSA-15 (ST22) και EMRSA-16 (ST36) (Ellington et al., 2010) ενώ τα στελέχη που απομονώθηκαν στα κατοικίδια των ΗΠΑ είναι το USA100 (ST5) που έχει ανιχνευθεί και σε ανθρώπους (McDougal et al., 2010). Επιπλέον, μια μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο ανέδειξε την ύπαρξη ενός κλώνου MRSA (ST398) σε σκύλους και άλογα (Loeffler et al., 2010). Η κατανόηση της περίπλοκης ταξινόμησης επιτρέπει στους ερευνητές να παρακολουθούν την εξέλιξη και τη δυναμική μετάδοσης των υποτύπων MRSA σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης, κοινότητας και κτηνοτροφίας. Οι τεχνικές μοριακής τυποποίησης όπως το spa και το MLST παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη διαφοροποίηση των στελεχών και τη γενετική ποικιλομορφία, βοηθώντας στις έρευνες επιδημιών και στις προσπάθειες επιτήρησης (Mehndiratta et al., 2012). Εντός του ευρύτερου πλαισίου ταξινόμησης, η εμφάνιση υποτύπων MRSA, συμπεριλαμβανομένων στελεχών που συνδέονται με νοσοκομεία, κοινότητες και ζώα, υπογραμμίζει την ανάγκη για λεπτομερείς γενετικές μελέτες για να διευκρινιστεί η προέλευσή τους, οι οδοί μετάδοσης και οι μηχανισμοί αντίστασης (Stefani et al., 2012).

1.2.3 Τρόπος Δράσης και Μορφολογικά χαρακτηριστικά στελεχών MRSA

Ο *S. aureus* εκκρίνει τοξίνες, οι οποίες έχουν ως συνέπεια εμφάνιση ασθενειών. Αυτές είναι οι αιμολυσίνες a, b, c και d και οι λευκοκυτταρίνες, μια οικογένεια υπεραντιγόνων συμπεριλαμβανομένων των τοξινών τοξικού σοκ (TSST-1), τις εντεροτοξίνες (SEA-E και SEG-O) και τις επιδερμικές τοξίνες (ETA, B, C, D). Η α-αιμολυσίνη παράγεται από πολλά στελέχη του *S. aureus*, και προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων, προκαλεί νέκρωση του δέρματος και δυσλειτουργίες στο νευρικό σύστημα. Στην κατηγορία των λευκοτονινών ανήκουν η τοξίνη Panton-Valentine (PVL), η LukE/D και η lukM/F'-P. Υπάρχουν δύο τύποι επιδερμολυτικών τοξινών, η A και η B (ETA, ETB). Ωστόσο, δύο επιπλέον επιδερμολυτικές τοξίνες, οι ETC και ETD, έχουν ανιχνευθεί σε βακτηριακά στελέχη *S. aureus* που συνδέονται με λοιμώξεις σε τραύματα του δέρματος (Χίνη, 2007).

Η παθογόνος φύση των ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη στελεχών *Staphylococcus* αποδίδεται στα διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Η επιβίωση και η μολυσματικότητα των στελεχών MRSA επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τους μηχανισμούς αντοχής τους στα αντιβιοτικά, καθιστώντας τη μορφολογία υψίστης σημασίας. Τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως η σύνθεση, το σχήμα και το μέγεθος του κυτταρικού τοιχώματος, επηρεάζουν άμεσα την ικανότητά τους να αποφεύγουν την άμυνα του ξενιστή και να δημιουργούν λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, η παρουσία του γονιδίου *mecA*, το οποίο παρέχει αντίσταση στα αντιβιοτικά της β-λακτάμης, μπορεί να αλλάξει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του MRSA, δυνάμηντας σε κίνδυνο την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και την αρχιτεκτονική της επιφάνειας (Liu et al., 2021; Stefania Stefani et al., 2012; Hafsat Ali Grema et al., 2015). Ο MRSA μπορεί να παράγει εντεροτοξίνες και τοξίνες που σχηματίζουν άλφα πόρους για να καταστρέψει τα κύτταρα και τους ιστούς ξενιστές, προκαλώντας δερματικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις του αίματος, τροφική δηλητηρίαση και αναπνευστικές ασθένειες. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι καθοριστικοί παράγοντες της λοιμογόνου δράσης των λοιμώξεων από *S. aureus*. Η αξιοσημείωτη ικανότητα του βακτηρίου να προκαλεί ασθένειες αποδίδεται στην ικανότητά του να ανιχνεύει και να αντιδρά σε αλλαγές στο περιβάλλον του. Προσαρμόζοντας την παραγωγή των απαραίτητων ουσιών που απαιτούνται για την επιβίωσή του εντός του ξενιστή, εξασφαλίζει τη δική του επιμονή. Μεταξύ των πολλών ρυθμιστικών μηχανισμών που βρέθηκαν στο *S. aureus*, ο βοηθητικός ρυθμιστής γονιδίου *agr* ξεχωρίζει ως το πιο ευρέως αναγνωρισμένο σύστημα. Χρησιμεύει ως μέσο για την αντίληψη της συγκέντρωσης των μορίων σήματος στην άμεση γειτνίαση, επιτρέποντας στα βακτήρια να μετρήσουν την πυκνότητα του πληθυσμού τους και να μεταφράσουν αυτή τη γνώση στην κατάλληλη γονιδιακή έκφραση (Liu et al., 2021).

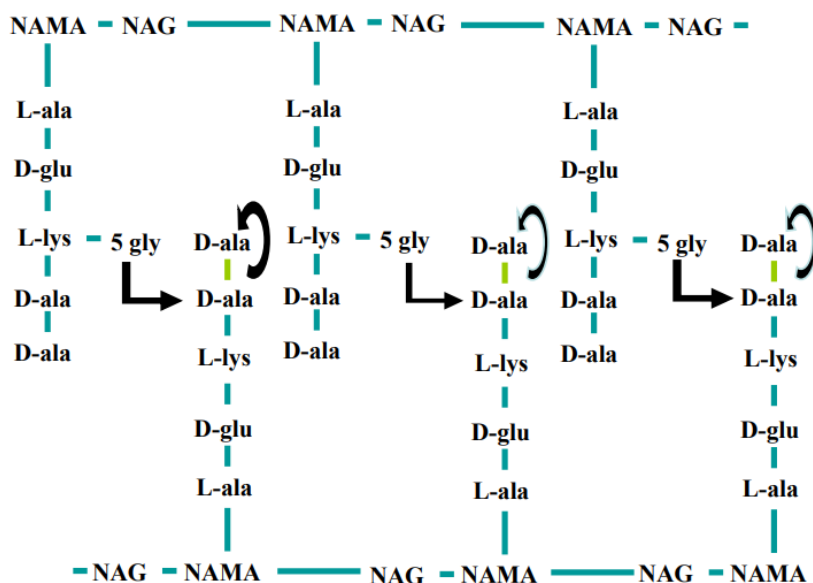
1.2.4 Γενετική του MRSA και μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Η γενετική του MRSA διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην κατανόηση της επιδημιολογίας και των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αυτού του παθογόνου. Το γονιδίωμα των βακτηρίων διακρίνεται σε δύο βασικά μέρη: το κύριο γενετικό υλικό και τα πρόσθετα στοιχεία.

Το κύριο γενετικό υλικό περιλαμβάνει τα γονίδια που είναι κοινά σε όλους τους απομονωμένους οργανισμούς και σχετίζονται με βασικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός μεταβολισμός και η αντιγραφή. Στον *S. aureus*, το κύριο γενετικό υλικό αποτελεί περίπου το 75% του γονιδιώματος και διατηρείται σε μεγάλο βαθμό σταθερός μεταξύ των στελεχών. Από την άλλη πλευρά, τα πρόσθετα στοιχεία του γονιδιώματος παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία και φέρουν γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια, την ανοσοδιαφυγή και την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Αποτελούν περίπου το 1/4 του γενετικού υλικού του *S. aureus* και περιλαμβάνουν κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) όπως νησίδες παθογένειας, βακτηριοφάγους, χρωμοσωμικές κασέτες, τρανσποζόνια και πλασμίδια, τα οποία αποκτώνται μέσω οριζόντιας μεταφοράς μεταξύ στελεχών. Αυτή η διαδικασία εξηγεί την αυξημένη μεταβλητότητα και την εξειδίκευση ανά στέλεχος που παρατηρείται στα πρόσθετα στοιχεία του γονιδιώματος (Turner et al., 2019).

Ο *S. aureus* γενικά διαθέτει μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, και ένας από αυτούς είναι η παραγωγή β-λακταμασών. Αυτά τα ένζυμα απενεργοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία είναι σημαντικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες για την αντιμετώπιση των σταφυλοκόκκων. Τα προαναφερθέντα αντιβιοτικά διαθέτουν β-λακταμικό δακτύλιο, που είναι παρόμοιο, όσον αφορά στη δομή, με το διπεπτίδιο D-alanyl-D-alanyl, το οποίο χρησιμοποιείται από το βακτήριο για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα. Λόγω αυτής της ομοιότητας, τα ένζυμα τρανσπεπτιδάσες του βακτηρίου, που βοηθούν στον πολυμερισμό της πεπτιδογλυκάνης, συνδέονται με τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση τους. Αυτή η αναστολή οδηγεί στο να ενεργοποιηθούν οι αυτολυσίνες του *S. aureus* να καταστραφεί το κυτταρικό τοίχωμα και να το κύτταρο σε θάνατο. Οι τρανσπεπτιδάσες ή αλλιώς πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), βοηθούν στο να σχηματιστούν γέφυρες πενταγλυκίνης ανάμεσα στα πεπτιδικά τμήματα. Όταν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνδέονται με αυτές τις πρωτεΐνες, εμποδίζουν τη δράση τους, διαταράσσοντας έτσι τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και τη λειτουργία του βακτηρίου. Το ανθεκτικό βακτήριο στη μεθικιλίνη, της οποίας η χημική ένωση φαίνεται στην εικόνα 6, παράγει ομόλογα των PBP όπως το PBP2a (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA*) ή, πιο σπάνια, το PBP2c (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecC*), τα οποία δεν επιτρέπουν στα

αντιβιοτικά βήτα-λακτάμης να δεσμεύονται αποτελεσματικά, επιτρέποντας έτσι τον σχηματισμό διασταυρούμενων δεσμών (βλέπε εικόνα 5) (Brable, 2023 ; Χίνη, 2007).



Εικόνα 5. Τρόπος δράσης των β-λακταμικών ουσιών.

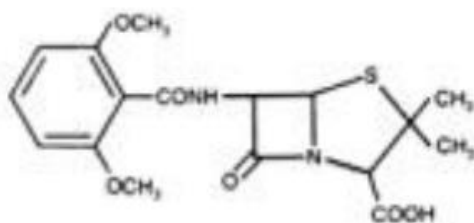
Οι β-λακτάμες είναι όμοιες με το D-ala-D-ala με συνέπεια την αναστολή της γεφύρωσης (Χίνη, 2007).

Τα στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου που παράγουν β-λακταμάσες παρουσιάζουν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Υπεύθυνο για την παραγωγή των ενζύμων είναι το γονίδιο blaZ (Crossley&Archer, 1997). Το βακτήριο MRSA εμφανίζει αντίσταση στα αντιβιοτικά της μεθικιλίνης, της οποίας η δομή φαίνεται στην εικόνα 6, μέσω των πρωτεϊνών PBP2a και PBP2c που κωδικοποιούνται από τα γονίδια mecA και mecC, αντίστοιχα. Ένα μεταφερόμενο γενετικό στοιχείο γνωστό ως σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα mec (SCCmec) 20-65 kb, το οποίο έχει εισαχθεί μέσα στο γονίδιο orfX, μια RNA μεθυλοτρανσφεράση, φιλοξενεί το γονίδιο mecA ή mecC, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που δεσμεύει την πενικιλίνη (PBP2a). Τα χαρακτηριστικά του οπερονίου mec είναι τα εξής:

- Το οπερόνιο mec είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του σταφυλόκοκκου στη μεθικιλίνη.

- Βρίσκεται στο SCCmec, μια περιοχή του χρωμοσωμικού DNA που μπορεί να φτάσει έως και 67 kb σε μέγεθος.
- Το SCCmec μπορεί να περιέχει έως και 100 γονίδια (ORF).

Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι SCCmec (I, II, III, IV, V) με διαφορετικό μέγεθος (20,9 έως 66,9 kb) (Deurenberg et al, 2007). Η απόκτηση του SCCmec μπορεί να καταστήσει τα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά β-λακτάμης εξαιτίας της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Η εναλλακτική πρωτεΐνη PBP2a που δεσμεύει την πενικιλίνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* είναι υπεύθυνη για την μεγάλη ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να αποφύγει τις βακτηριοκτόνες επιδράσεις των β-λακταμών, επηρεάζοντας σημαντικά τις στρατηγικές θεραπείας και απαιτώντας εναλλακτικά σχήματα αντιβιοτικών. Ενώ υπάρχουν εκατοντάδες διαφορετικά στελέχη του *S. aureus*, η πλειοψηφία (πάνω από 90%) ανήκει σε μόλις τέσσερα κυρίαρχα συμπλέγματα κλώνων (CC5, CC8, CC398 και CC30). Αυτό δείχνει ότι η οριζόντια απόκτηση του SCCmec συνέβη περιορισμένες φορές ανάμεσα σε λίγους κυρίαρχους τύπους στελεχών. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί τουλάχιστον μία περίπτωση οριζόντιας μεταφοράς του SCCmec κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας. Εκτός από το SCCmec, τα περισσότερα στελέχη MRSA περιέχουν τουλάχιστον έναν εύκρατο βακτηριοφάγο. Οι μεταγωγικοί φάγοι μπορούν να μεταφέρουν έως και 45 kb βακτηριακού DNA ξενιστή και πιθανότατα ευθύνονται για τις περισσότερες οριζόντιες μεταφορές MGEs μεταξύ στελεχών *S. aureus* (Turner et al., 2019 ; Χίνη, 2007).

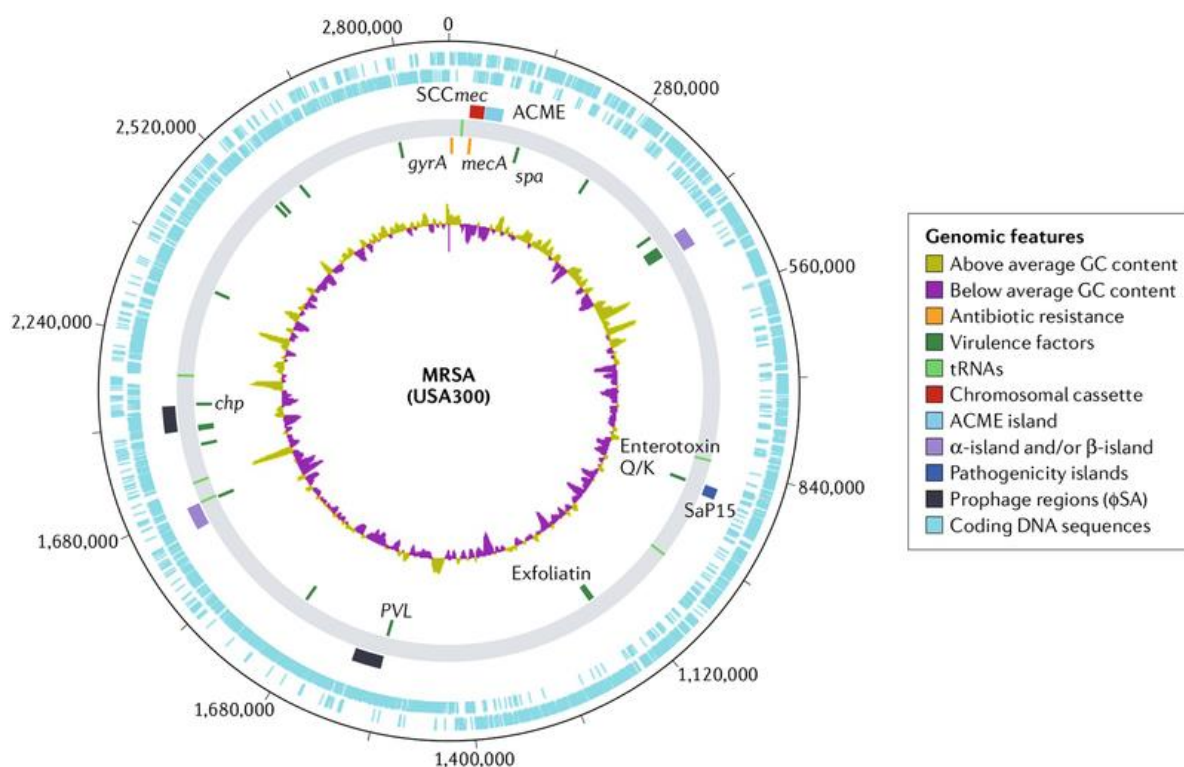


Methicillin

Εικόνα 6. Η χημική ένωση του αντιβιοτικού της μεθικιλίνης (Χίνη, 2007).

Επιπροσθέτως, γενετικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε βασικά γονίδια όπως τα *MprF*, *ClpP* και *DltB* που έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία σε αντιβιοτικά όπως η δαπτομυκίνη,

υπογραμμίζοντας τη σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικών παραγόντων στην αντίσταση στα αντιβιοτικά. Εκτός από την αντοχή στα φάρμακα, το βακτήριο MRSA εμφανίζει ένα ποικίλο γονιδιωματικό τοπίο, με διάφορα κλωνικά σύμπλοκα και τύπους *sra* που συμβάλλουν στην επιδημιολογική εξάπλωση και τη λοιμογόνο δράση, όπως αποδεικνύεται από στελέχη όπως το USA300 σε κοινοτικά περιβάλλοντα (Albarrag et al., 2020; Khan et al., 2020; Abebe & Birhanu, 2023).



Εικόνα 7. Κύρια γονιδιωματικά στοιχεία στον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (Turner et al., 2019).

Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται ο αντιπροσωπευτικός γονιδιωματικός χάρτης του στελέχους USA300 FPR3757 (REF.77). Το πιο εσωτερικό κυκλικό κομμάτι (κομμάτι 1) αντιπροσωπεύει

περιεχόμενο GC. Προχωρώντας προς τα έξω, το κομμάτι 2 εμφανίζει επιλεγμένα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε πορτοκαλί χρώμα και παράγοντες λοιμογόνου δράσης με πράσινο χρώμα. Το κομμάτι 3 δείχνει τη θέση των tRNA. Το κομμάτι 4 εμφανίζει επιλεγμένα κινητά γενετικά στοιχεία, με χρωμοσωμικές κασέτες σε κόκκινο χρώμα, νησίδες ποικίλης παθογένειας σε αποχρώσεις του μπλε έως και του βιολετί και των προφάγων σε μαύρο. Οι εξωτερικές δύο διαδρομές (5 και 6) αντιπροσωπεύουν κωδικοποιητικές αλληλουχίες με μπλε χρώμα. PVL, Panton–Valentine λευκοσιδίνη (Turner et al., 2019).





1.2.5 Μετάδοση του MRSA και παράγοντες κινδύνου λοίμωξης

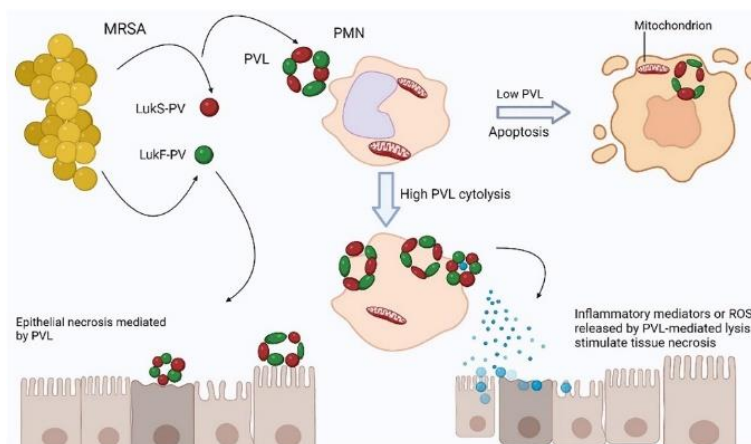
Η εξάπλωση του MRSA είναι μια σημαντική πρόκληση σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης, όπως τονίζεται από πρόσφατες μελέτες. Τα συμβάντα σιωπηρής μετάδοσης που εντοπίστηκαν μεταξύ των εργαζομένων στον τομέα της υγείας (HCPs) και των βρεφών στη μονάδα εντατικής θεραπείας νεογνών υπογραμμίζουν τη δυνατότητα μετάδοσης του MRSA και τονίζουν την ανάγκη για προσεκτικές στρατηγικές πρόληψης λοιμώξεων. Η κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας και των παραγόντων μολυσματικότητας των στελεχών MRSA που εμπλέκονται σε εστίες είναι κρίσιμη για αποτελεσματικά μέτρα ελέγχου (Madera et al., 2022). Επιπλέον, η προσαρμοστική απόκριση του MRSA στην υποθανατηφόρα έκθεση στο μπλε φως, που οδηγεί στη ρύθμιση της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης και της πάχυνσης του κυτταρικού τοιχώματος, παρέχει πληροφορίες για πιθανούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τη δυναμική μετάδοσης του MRSA. Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του MRSA είναι μέσω της άμεσης επαφής μεταξύ των επιφανειών του δέρματος (MedicineNet, 2024).

Το βακτήριο MRSA έχει τη δυνατότητα να προσβάλλει διάφορα μέρη του σώματος, όπως τη μύτη, το δέρμα και τις πληγές. Η μετάδοση μπορεί να γίνει και μέσω έμμεσης επαφής με μολυσμένα άτομα ή αντικείμενα. Πολλά βακτήρια, γνωστά και ως σταφυλόκοκκοι, ζουν φυσιολογικά στη μύτη των ανθρώπων. Περίπου το 33% του πληθυσμού φέρει μόνιμα *S. aureus* στη μύτη, ενώ άλλο 33% τα φέρει περιστασιακά. Το υπόλοιπο 33% δεν φέρει καθόλου. Εκτός από τη μύτη, τα βακτήρια αυτού του είδους μπορούν να αποικίσουν και άλλα σημεία, όπως το περίνεο, το δέρμα σε όλο το σώμα και τις τρίχες της κεφαλής. Άτομα με δερματικές παθήσεις όπως το έκζεμα είναι πιο πιθανό να φέρουν *S. aureus*. Αυτά τα άτομα, οι φορείς, μπορούν να

μεταδώσουν τα βακτήρια σε άλλους, ιδιαίτερα σε ασθενείς με τραύματα, ή και σε κλινήρη άτομα με καθετήρες. Το εύρος της μόλυνσης από MRSA δεν περιορίζεται μόνο στην ανθρώπινη ιατρική αλλά και στην Κτηνιατρική (Pantosti, 2012). Το συγκεκριμένο βακτήριο ήταν το πρώτο που απομονώθηκε από αγελάδα με μαστίτιδα (Devriese et al, 1972) και από γουρούνια (Stefani et al., 2012). Ζώα όπως οι σκύλοι, οι γάτες και τα άλογα έχουν γίνει ένα σημαντικό μέρος των περισσότερων οικογενειών, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες όπως οι ΗΠΑ και το Ηνωμένο Βασίλειο. Επομένως, υπάρχουν υψηλές πιθανότητες ανθρώπινης μόλυνσης με MRSA από αυτά τα ζώα. Οι παράγοντες μεταδοτικότητας του MRSA αποτελούν ένα ευρύ φάσμα όπως τοξίνες (αιμολυσίνες και λευκοκιδίνες), παράγοντες διαφυγής του ανοσοποιητικού που βρίσκονται στην επιφάνειά του (για παράδειγμα η κάψουλα και η πρωτεΐνη A) και ένζυμα που προάγουν την εισβολή στους ιστούς, όπως για παράδειγμα η υαλουρονιδάση, η οποία αποτελεί ένζυμο που καταλύει την αποικοδόμηση του υαλουρονικού οξέος και πιθανώς να συμμετέχει στην παθογένεση διευκολύνοντας τη διάσπαση της μεσοκυττάριας ουσίας του ξενιστή (Karakonstantis et al., 2019).

Οι παράμετροι επικινδυνότητας για λοιμώξεις από MRSA διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στην πρόγνωση όσο και στις στρατηγικές θεραπείας. Παράγοντες όπως η μεγαλύτερη ηλικία και η λοίμωξη από MRSA έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες θνησιμότητας σε ασθενείς με βακτηριαμία MRSA (S. Madera et al., 2022). Η πρόληψη και ο έλεγχος των MRSA λοιμώξεων βασίζονται στα παρακάτω:

-  **Απομόνωση:** Ασθενείς με MRSA απομονώνονται για να αποφευχθεί η μετάδοση.
-  **Υγιεινή:** Συχνό πλύσιμο χεριών με αντισηπτικό, χρήση γαντιών και σωστή χρήση προστατευτικού εξοπλισμού.
-  **Περιορισμός της χρήσης αντιβιοτικών:** Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών είναι δυνατόν να έχει ως συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων.
-  **Ανίχνευση φορέων:** Σε περίπτωση επιδημίας, μπορεί να γίνεται έλεγχος για να βρεθούν άτομα που φέρουν το βακτήριο χωρίς να είναι άρρωστα.



Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης του της νέκρωσης των ιστών από το βακτήριο MRSA (Shoaib et al., 2023).

Η νέκρωση των ιστών όπως φαίνεται στην εικόνα 8, προκαλείται από τη λευκοσιδίνη Panton-Valentine (PVL). Τα δύο συστατικά PVL που εκκρίνονται από τον *S. aureus*, LukS-PV και LukF-PV, σχηματίζουν συλλογικά ένα επταμερές που σχηματίζει πόρους στις μεμβράνες των πολυμορφοπυρηνικών λευκοκυττάρων (PMNs). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις PVL προκαλούν απόπτωση των πολυμορφοπυρηνικών λευκοκυττάρων (PMN) μέσω άμεσης δέσμησης στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις PVL προκαλούν λύση PMN (Shoaib et al., 2023).

1.2.6 Διάγνωση των λοιμώξεων από το βακτήριο MRSA

Τα κλινικά συμπτώματα των λοιμώξεων από MRSA μπορεί να ποικίλουν ευρέως, περιλαμβάνοντας ένα φάσμα παρουσιάσεων από ήπια έως σοβαρή. Οι ασθενείς μπορεί αρχικά να εμφανίσουν μη ειδικά σημεία όπως βήχα, πυρετό και αναπνευστική δυσχέρεια, τα οποία μπορούν να εξελιχθούν γρήγορα σε πιο σοβαρές επιπλοκές όπως σηπτικό σοκ. Οι αναφορές περιπτώσεων που συζητήθηκαν έριξαν φως στις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από MRSA, τονίζοντας τη σημασία της έγκαιρης αναγνώρισης και της κατάλληλης θεραπείας με αντιβιοτικά (Purrello et al., 2016).

1.2.7 Εργαστηριακές και απεικονιστικές εξετάσεις για λοιμώξεις από MRSA

Οι εργαστηριακές εξετάσεις διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ακριβή διάγνωση και διαχείριση των λοιμώξεων από το MRSA, απαραίτητες για την καθοδήγηση αποτελεσματικών θεραπειών. Οι δερματικές παθήσεις που προκαλούνται από τον MRSA, όπως ο έρπης ζωστήρας ή οι λοιμώξεις τραυμάτων, υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα ακριβών διαγνωστικών μεθόδων. Οι εργαστηριακές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων των εξετάσεων αίματος, της δειγματοληψίας ιστών (βιοψία) ή υγρών και της μοριακής ταυτοποίησης συγκεκριμένων γονιδίων όπως η *mecA*, είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβεβαίωση των λοιμώξεων από MRSA και τον προσδιορισμό των προτύπων αντιμικροβιακής ευαισθησίας (Ndedy et al., 2023; S.M. Purrello et al., 2016).

1.2.8 Θεραπευτικές μέθοδοι

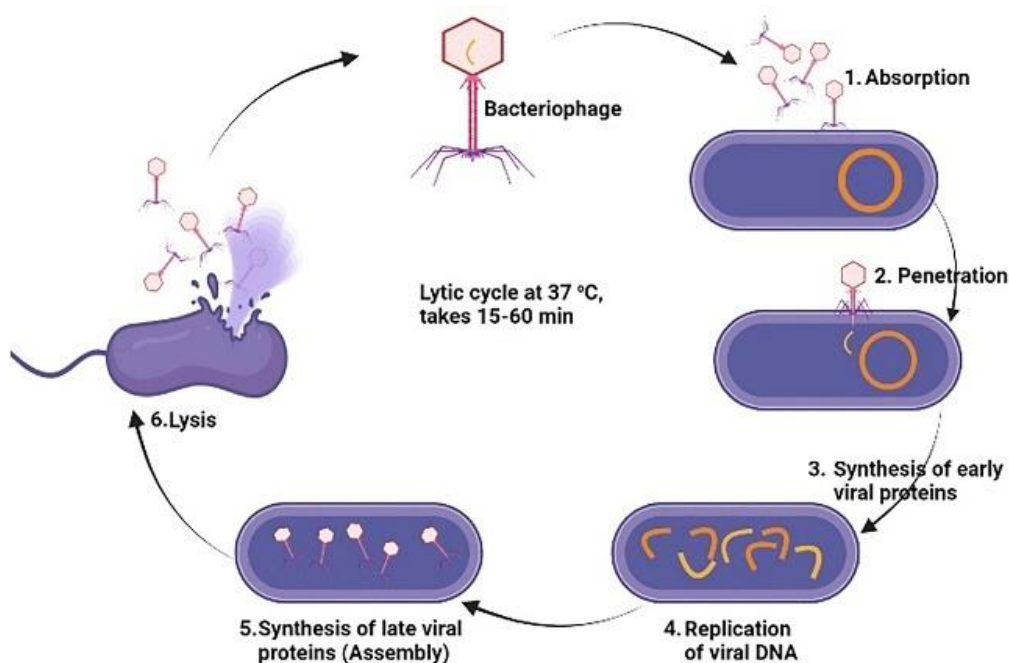
Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αποτελεί σημαντική πρόκληση στο θεραπευτικό τοπίο των λοιμώξεων από τον σταφυλόκοκκο τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη, επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα των παραδοσιακών αντιβιοτικών όπως η βανκομυκίνη και η δαπτομυκίνη. Η εμφάνιση μηχανισμών αντίστασης, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων εκροής και των γενετικών μεταλλάξεων, υπογραμμίζει την επείγουσα ανάγκη για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την καταπολέμηση του βακτηρίου. Εναλλακτικές θεραπείες όπως τα λιπογλυκοπεπτίδια, τα οποία είναι αλυσίδες λιπαρών οξέων που συνδέονται με τα γλυκοπεπτίδια και αποτελούν μια οικογένεια αντιβιοτικών έδειξαν βακτηριοκτόνο δράση. Αποτρέπουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και παρεμποδίζουν τη λειτουργία διαπερατότητας της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης. Επιπροσθέτως, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και η αντιβακτηριδιακή φωτοδυναμική θεραπεία (aPDT) διερευνώνται ως πολλά υποσχόμενες επιλογές για την αντιμετώπιση της αντοχής στα αντιβιοτικά στον MRSA (Purrello et al., 2016). Καθώς η αντοχή στη βανκομυκίνη συνεχίζει να αυξάνεται, η ανάπτυξη και η τυποποίηση της aPDT, με πιθανές εφαρμογές *in vivo*, υπόσχονται να ξεπεράσουν τους περιορισμούς των συμβατικών αντιβιοτικών (Priyanga Dharmaratne et al., 2020 ; Belkum & Rochas, 2018).

Αντιβιοτική θεραπεία

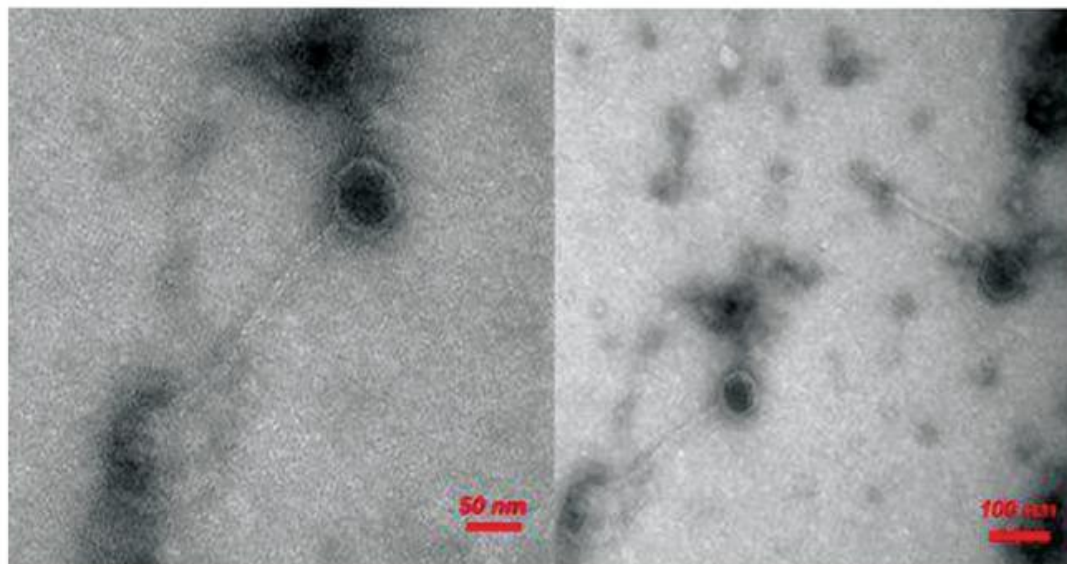
Η αντιβιοτική θεραπεία για λοιμώξεις από ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) είναι ένας σύνθετος και εξελισσόμενος τομέας, που απαιτεί προσαρμοσμένες προσεγγίσεις για την καταπολέμηση της αυξανόμενης πρόκλησης της αντοχής σε πολλά φάρμακα. Πρόσφατες μελέτες έχουν ρίξει φως σε εναλλακτικές θεραπείες, όπως τα λιπογλυκοπεπτίδια, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και νεότεροι παράγοντες όπως η κεφταρολίνη και η τεντιζολίδη, προσφέροντας ελπίδα στη διαχείριση λοιμώξεων από MRSA (Purrello et al., 2016). Μια έρευνα που διεξήχθη στην Αυστραλία σημείωσε ότι η αντοχή στην κεφταρολίνη και στην κεφαλοσπορίνη βρέθηκε στο 17% των καλλιιεργειών MRSA. Αν και αρκετά άλλα νέα φάρμακα έχουν εγκριθεί για χρήση, η βανκομυκίνη παραμένει η πιο αποτελεσματική. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης μεταξύ των κεφαλοσπορινών είναι η κεφταρολίνη και η κεφτομπιπρόλη. Οι τετρακυκλίνες είναι μια κατηγορία αντιβιοτικών αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών. Οι κινολόνες είναι από τα πιο κοινά αντιβακτηριακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τη θεραπεία μιας σειράς βακτηριακών ασθενειών τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους. Αυτά τα φάρμακα είναι δομικά γνωστά ως κινολόνες επειδή έχουν έναν δακτύλιο κινολίνης στη δομή τους (Shoaib et al., 2023).

Θεραπεία με Βακτηριοφάγους

Η φαγοθεραπεία, είναι ένας τύπος θεραπείας που χρησιμοποιεί ιούς για να σκοτώσει βακτηριακά παθογόνα. Λόγω της αυξανόμενης αντίστασης στα αντιβιοτικά, η θεραπεία με φάγους θεωρείται οικονομικά αποδοτική, εξαιρετικά ειδική και αποτελεσματική στον μηχανισμό δράσης της έναντι πολλαπλών βακτηρίων. Οι βακτηριοφάγοι (**βλέπε εικόνα 10**) προκαλούν μόνο βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα χωρίς να προκαλούν καμία βλάβη σε ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης τους παρουσιάζεται στην εικόνα 9 (Tkhilaishvili et al., 2020).



Εικόνα 9. Γενικός αντιβακτηριακός μηχανισμός βακτηριοφάγων έναντι του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη στελέχους *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Nasser et al., 2019).



Εικόνα 10. Μορφολογία του βακτηριοφάγου MRSA που προσδιορίζεται με TEM
(ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης) (Nasser et al., 2019).

Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία ως εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για την καταπολέμηση λοιμώξεων από MRSA θεωρείται πολλά υποσχόμενη θεραπεία. Πρόσφατες έρευνες έχουν διερευνήσει τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) που στοχεύουν σταφυλοκοκκικά αντιγόνα όπως το IsaA για την τόνωση των ανοσολογικών αποκρίσεων και την ενίσχυση της βακτηριακής κάθαρσης. Η παθητική ανοσοποίηση με ανθρώπινο αντι-IsaA, IgG1- mAb έχει δείξει αποτελεσματικότητα στη δέσμευση σε διάφορα στελέχη MRSA και στην ενίσχυση της δραστηριότητας των ουδετερόφιλων, βελτιώνοντας ενδεχομένως τα ποσοστά επιβίωσης σε μοντέλα ποντικών της βακτηριαμίας MRSA (Otto, 2010).

Κεφάλαιο 2. Είδη βιολογικών σωματικών υγρών

2.1 Εισαγωγή

Τα βιολογικά σωματικά υγρά αποτελούν το μέσον για των έλεγχο των εσωτερικών λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος. Αυτά τα υγρά, συμπεριλαμβανομένου του αίματος, των ούρων και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, περιέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση ασθενειών. Η κατανόηση των διαφόρων τύπων βιολογικών σωματικών υγρών και των δοκιμών που εφαρμόζονται για την ανάλυσή τους είναι υψίστης σημασίας για την ακριβή διάγνωση και τον κατάλληλο σχεδιασμό θεραπείας. Παρά τις τεχνολογικές εξελίξεις στις διαγνωστικές εξετάσεις, η συλλογή και η προετοιμασία αυτών των υγρών παραμένουν κρίσιμα βήματα για τη διασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων δοκιμών. Εξετάζοντας διεξοδικά τους τύπους και τις μεθόδους προετοιμασίας για τη δοκιμή βιολογικών σωματικών υγρών, οι επιστήμονες της υγειονομικής περίθαλψης μπορούν να ενισχύσουν την ικανότητά τους να παρέχουν αποτελεσματικές και στοχευμένες παρεμβάσεις υγειονομικής περίθαλψης.

2.2 Ορισμός των βιολογικών σωματικών υγρών

Τα βιολογικά σωματικά υγρά είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, χρησιμεύοντας ως μέσο μέσω του οποίου μεταφέρονται διάφορες ουσίες και αποβάλλονται τα απόβλητα. Αυτά τα υγρά περιλαμβάνουν αίμα, ούρα, σάλιο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ιδρώτα και δάκρυα, καθένα από τα οποία παίζει μοναδικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης. Το αίμα, για παράδειγμα, είναι ένα πολύπλοκο υγρό που μεταφέρει οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά, ορμόνες και απόβλητα σε όλο το σώμα, ενώ τα ούρα χρησιμεύουν ως μέσο εξάλειψης των μεταβολικών αποβλήτων. Το σάλιο βοηθά στην πέψη διασπώντας τα σωματίδια τροφής και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό προστατεύει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Ο ιδρώτας ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος και τα δάκρυα κρατούν

τα μάτια υγρά και απαλλαγμένα από ξένες ουσίες. (Brenner & Stein, 1987). Τα βιολογικά σωματικά υγρά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αξιολόγηση της υγείας ενός ατόμου και στη διάγνωση διαφόρων ιατρικών καταστάσεων. Για παράδειγμα, οι εξετάσεις αίματος μπορούν να αποκαλύψουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ατόμου, τη λειτουργία οργάνων και τη διατροφική κατάσταση. Οι εξετάσεις ούρων, από την άλλη πλευρά, μπορούν να βοηθήσουν στην ανίχνευση προβλημάτων που σχετίζονται με τα νεφρά, το ήπαρ και το ουροποιητικό σύστημα (DeLaet, 2020).

2.2.1 Κατηγορίες βιολογικών σωματικών υγρών στη διάγνωση ασθενειών

Αίμα

Το αίμα χρησιμεύει ως ένα πολύπλοκο και δυναμικό βιολογικό υγρό, πλούσιο σε πολύτιμες πληροφορίες ζωτικής σημασίας για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς. Το αίμα αποτελείται από συστατικά, όπως είναι τα ερυθροκύτταρα ή αλλιώς ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και το πλάσμα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι μεταφέρουν το οξυγόνο διαμέσου των πνευμόνων στους ιστούς, ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο ανοσοβιολογικό σύστημα, αφού είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση των μικροβίων που προκαλούν λοιμώξεις. Τα αιμοπετάλια είναι κυρίαρχα στην πήξη του αίματος και στην πρόληψη της υπερβολικής αιμορραγίας. Το πλάσμα, από την άλλη πλευρά, είναι το υγρό συστατικό του αίματος που μεταφέρει διάφορες ουσίες όπως ορμόνες, θεραπευτικά συστατικά και απόβλητα. Αναλύοντας τα επίπεδα διαφορετικών συστατικών του αίματος, οι επαγγελματίες υγείας μπορούν να ανιχνεύσουν ασθένειες όπως αναιμία, λοιμώξεις και διαταραχές πήξης, μεταξύ άλλων (Altman & Katz, 1961).

Ούρα

Τα ούρα είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό υγρό που παίζει σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της υγείας και τη διάγνωση λόγω της σύνθεσής τους και της ικανότητάς τους να αντικατοπτρίζουν συστηματικές καταστάσεις. Σύμφωνα με μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ούρων για την ταυτοποίηση πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης,

αποδεικνύοντας τις διαγνωστικές δυνατότητες αυτού του σωματικού υγρού (Chaudhary & Singh., 2017). Επιπλέον, κάποιες έρευνες τόνισαν τη σημασία της μέτρησης του ειδικού βάρους των ούρων στην αξιολόγηση της κατάστασης ενυδάτωσης μεταξύ των συλλογικών δρομέων, υπογραμμίζοντας την πολύπλευρη χρησιμότητα της ανάλυσης ούρων πέρα από την παραδοσιακή παθολογική διάγνωση. Η ανάλυση των συστατικών των ούρων, όπως των λιπαρών οξέων, των αμινοξέων και των σάκχαρα, μπορεί να προσφέρει μια ολοκληρωμένη εικόνα της μεταβολικής υπογραφής των ατόμων. Μελέτες έχουν εφαρμόσει με επιτυχία μεταβολικές προσεγγίσεις για την ανάλυση δειγμάτων ούρων και τον εντοπισμό μεταβολιτών που σχετίζονται με συγκεκριμένες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, η βιοψία σε ούρα έχουν αναδειχθεί ως ισχυρά διαγνωστικά εργαλεία για μη επεμβατική κλινική αξιολόγηση (M. Buszewska-Forajta et al., 2022 ; Batistelli, 2021). Για να εξασφαλιστούν ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα, η συλλογή και η προετοιμασία για ανάλυση ούρων πρέπει να διεξάγεται με τη μέγιστη προσοχή και ακρίβεια. Οι μέθοδοι συλλογής ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο της δοκιμής που εκτελείται - ένα δείγμα καθαρής σύλληψης μεσαίας ροής είναι κατάλληλο για ανάλυση ούρων ρουτίνας, ενώ μπορεί να απαιτείται 24ωρη συλλογή ούρων για τη μέτρηση συγκεκριμένων ουσιών. Η καθαριότητα και η επισήμανση των δοχείων είναι κρίσιμες πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την πρόληψη της μόλυνσης και τη διασφάλιση της σωστής ταυτοποίησης των δειγμάτων. Οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, συμπεριλαμβανομένης της ψύξης ή της προσθήκης συντηρητικών όταν χρειάζεται, συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος πριν από την ανάλυση. Επιπλέον, οι ασθενείς θα πρέπει να καθοδηγούνται σχετικά με τις κατάλληλες τεχνικές συλλογής για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων. Συνολικά, η τήρηση τυποποιημένων πρωτοκόλλων και μέτρων ποιοτικού ελέγχου είναι απαραίτητη για την απόκτηση ακριβών αποτελεσμάτων ανάλυσης ούρων (Walker et al., 1990).

Σάλιο

Το ανθρώπινο σώμα παράγει σάλιο, ένα διαυγές και υδαρές υγρό απαραίτητο για διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Το σάλιο εκκρίνεται κυρίως από τους σιελογόνους αδένες που

βρίσκονται στο στόμα, με περίπου 1-1,5 λίτρα να παράγονται ημερησίως. Αυτό το υγρό περιέχει ένα πολύπλοκο μείγμα ενζύμων, ηλεκτρολυτών και αντιμικροβιακών παραγόντων, με τη σύνθεσή του να αντικατοπτρίζει τη συνολική υγεία του ατόμου. Το σάλιο παίζει κρίσιμο ρόλο στα αρχικά στάδια της πέψης των τροφίμων, λιπαίνοντας τη στοματική κοιλότητα και βοηθώντας στη διαδικασία κατάποσης. Επιπλέον, το σάλιο αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως ένα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο στην υγειονομική περίθαλψη, με τους ερευνητές να διερευνούν τις δυνατότητές του για μη επεμβατική παρακολούθηση διαφόρων καταστάσεων υγείας (Malamud & Tabak, 1993). Το σάλιο εξυπηρετεί πολλαπλές λειτουργίες μέσα στο ανθρώπινο σώμα, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της στοματικής υγείας και βοηθώντας στη διαδικασία πέψης. Η κύρια λειτουργία του είναι να διευκολύνει τη μάσηση και την κατάποση με την υγρασία της τροφής, καθιστώντας ευκολότερο το σχηματισμό ενός bolus που μπορεί εύκολα να καταποθεί. Επιπλέον, το σάλιο περιέχει ένζυμα όπως η αμυλάση που ξεκινούν τη διάσπαση των υδατανθράκων στο στόμα, ξεκινώντας τη διαδικασία πέψης πριν η τροφή φτάσει στο στομάχι. Το σάλιο βοηθά ,επίσης, στον καθαρισμό του στόματος ξεπλένοντας τα σωματίδια τροφίμων και τα βακτήρια, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο τερηδόνας και ασθένειας των ούλων. Επιπλέον, διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες που βοηθούν στην καταπολέμηση επιβλαβών μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στη συνολική στοματική υγεία. Μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα του σάλιου ως εφικτή εναλλακτική λύση για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών όπως αυτών που προκαλούνται από MRSA, αναδεικνύοντας την ποιοτική ισοδυναμία με τις παραδοσιακές μεθόδους επιχρίσματος και τονίζοντας τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και βιωσιμότητας της χρήσης δειγμάτων σάλιου (Ghemrawi et al., 2024 ; Teixeira Silva et al., 2024).

Ρινικό Επίχρισμα

Οι εξετάσεις ρινικού επιχρίσματος είναι μη επεμβατικές και σχετικά απλές στη χορήγηση, γεγονός που τις καθιστά μια βολική επιλογή τόσο για τους αρρώστους όσο και για τους επαγγελματίες υγείας. Αυτές οι εξετάσεις είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στη διάγνωση αναπνευστικών ασθενειών όπως η γρίπη αλλά και βακτηριακές λοιμώξεις. Η αξιοπιστία των

εξετάσεων ρινικού επιχρίσματος στην ανίχνευση λοιμώξεων τις έχει καταστήσει απαραίτητα εργαλεία στον ιατρικό τομέα, επιτρέποντας την έγκαιρη διάγνωση και την κατάλληλη θεραπεία. Τα ρινικά επιχρίσματα χρησιμοποιούνται στη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων, όπως από τον MRSA, ανιχνεύοντας την παρουσία των βακτηρίων στις ρινικές διόδους. Επιπλέον, τα ρινικά επιχρίσματα παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο αλλεργίας, όπου συλλέγονται δείγματα για τον εντοπισμό αλλεργιογόνων που ευθύνονται για την πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων σε άτομα (Boado-Penas et al., 2022).

2.3 Προετοιμασία Δειγμάτων για Καλλιέργεια και Γονοτυπικές Μεθόδους

2.3.1 Αίμα

Προετοιμασία δείγματος για μεθόδους καλλιέργειας

Η λήψη δείγματος πραγματοποιείται με αποστειρωμένη βελόνα και σύριγγα ή ειδικό σύστημα λήψης αίματος και έπειτα αποθηκεύεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια αίματος (αιμοκαλλιέργειας). Πραγματοποιείται επώαση του δείγματος σε ειδικό θρεπτικό μέσο (π.χ., αίμα agar). Τέλος, παρακολουθούνται τα τριβλία για πιθανή ανάπτυξη αποικιών MRSA (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019).

Προετοιμασία δείγματος για εφαρμογή γονοτυπικών μεθόδων

Αρχικά με ειδική κατεργασία πραγματοποιείται εξαγωγή DNA από τις καλλιέργειες. Το δείγμα αίματος συλλέγεται σε σωλήνες που περιέχουν αντιπηκτικό (όπως EDTA) για να αποφευχθεί η πήξη. Πραγματοποιείται προσθήκη του αντιδραστήριου λύσης (lysis buffer) στο αίμα για να λυθούν τα κύτταρα. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει συχνά απορρυπαντικά που διασπούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Η πρωτεΐνάση K εισάγεται για να διασπαστούν οι πρωτεΐνες και να απελευθερωθεί το DNA. Το μείγμα επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία (συνήθως 55°C-60°C) για 1-2 ώρες. Ακολούθως, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου ώστε να γίνει διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Το δείγμα φυγοκεντρείται και το DNA βρίσκεται στην υδατική φάση (άνω στρώμα). Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο

και προστίθεται ψυχρής αιθανόλη ή ισοπροπανόλη. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση για να κατακρημνιστεί το DNA. Το μείγμα να επωάζεται στους -20 βαθμούς Κελσίου για 1 ώρα ή περισσότερο για να επιτευχθεί πλήρης κατακρήμνιση. Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντριση και συλλέγεται το κατακρημνισμένο DNA. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται πλύση του ιζήματος DNA με 70% αιθανόλη για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Φυγοκεντρείται ξανά το δείγμα και αφαιρείται η αιθανόλη. Όταν το ίζημα στεγνώσει διαλύεται το καθαρό DNA σε κατάλληλο buffer, όπως TE buffer (Tris-EDTA), ώστε να είναι κατάλληλο για αποθήκευση. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα κιτ εξαγωγής DNA, όπως τα κιτ πυριτικού άλατος και τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία απλοποιούν τη διαδικασία και περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και οδηγίες. Ακολουθεί η PCR για τον εντοπισμό του γονιδίου *mecA*, που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του *S. aureus* στη μεθικιλίνη (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019; Jorgensen et al., 2015; Castillo et al., 2011).

2.3.2 Ούρα

Προετοιμασία δείγματος για μεθόδους καλλιέργειας

Για την λήψη δείγματος γίνεται χρήση αποστειρωμένου δοχείου συλλογής ούρων. Συστήνεται η λήψη καθαρού μέσου ρεύματος για να ελαχιστοποιηθεί η επιμόλυνση. Στη συνέχεια αφού μεταφερθεί στο εργαστήριο, επωάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό, όπως το άγαρ κυστεΐνης λακτόζης. Τέλος μελετάται η πιθανή ανάπτυξη αποικιών *S. aureus* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019; Jorgensen et al., 2015; Castillo et al., 2011).

Προετοιμασία δείγματος για εφαρμογή γονοτυπικών μεθόδων

Με την προαναφερθείσα διαδικασία πραγματοποιείται εξαγωγή του DNA από τις καλλιέργειες. Ακολουθεί εφαρμογή της μεθόδου PCR (Polymerase Chain Reaction) για να ανιχνευθεί το γονίδιο *mecA*, που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του *S. aureus* στη μεθικιλίνη (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019; Jorgensen et al., 2015; Castillo et al., 2011).

2.3.3 Σάλιο και Ρινικό Επίχρισμα

Για τη λήψη δείγματος σάλιου χρησιμοποιείται αποστειρωμένο συλλεκτικό μέσο ή στυλεό. Το δείγμα λαμβάνεται από τον φάρυγγα ή άλλες στοματικές περιοχές. Όσον αφορά τη συλλογή του ρινικού επιχρίσματος χρησιμοποιείται αποστειρωμένο στυλεό και με περιστροφή του στυλεού στο ρινικό επιθήλιο συλλέγεται δείγμα (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019).

Προετοιμασία δείγματος για μεθόδους καλλιέργειας

Το δείγμα επωάζεται σε αίμα agar ή mannitol salt agar και μελετάται για ενδεχόμενη ανάπτυξη αποικιών *S. aureus* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019).

Προετοιμασία δείγματος για εφαρμογή γονοτυπικών μεθόδων

Με την παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται εξαγωγή του DNA από τις καλλιέργειες. Ακολουθεί εφαρμογή της PCR για να ανιχνευθεί το γονίδιο *mecA* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019; Jorgensen et al., 2015).

Κεφάλαιο 3. Ανίχνευση του MRSA

3.1. Εισαγωγή στις μεθόδους ανίχνευσης του MRSA

Η ακριβής ανίχνευση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου (MRSA) είναι υψίστης σημασίας σε κλινικά περιβάλλοντα, όπως επισημαίνεται σε διάφορες μελέτες. Ο αυξανόμενος επιπολασμός και αντίκτυπος του MRSA απαιτούν ακριβείς και ταχείες μεθόδους ταυτοποίησης για την καθοδήγηση αποτελεσματικών στρατηγικών θεραπείας. Η χρήση ενός συνδυασμού μοριακών τεχνικών, όπως η PCR σε πραγματικό χρόνο παράλληλα με τις παραδοσιακές μεθόδους μπορεί να ενισχύσει την ευαισθησία και την ειδικότητα στην ανίχνευση MRSA, οδηγώντας σε βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς. Η τυποποίηση των μεθόδων προσυμπτωματικού ελέγχου και η συνεχής παρακολούθηση της επιδημιολογίας του MRSA είναι απαραίτητες για την ενημέρωση των κλινικών πρακτικών λήψης αποφάσεων και ελέγχου των λοιμώξεων (Ermenlieva et al., 2016). Η ανάπτυξη αξιόπιστων και αποτελεσματικών πρωτοκόλλων ανίχνευσης MRSA, που ενσωματώνουν τόσο παραδοσιακές όσο και καινοτόμες μεθόδους, είναι σημαντική για την επιτυχή διαχείριση των ασθενών σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης (Judit Szabó, 2014).

3.1.2 Επισκόπηση των παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης MRSA

Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των βακτηρίων χωρίζονται σε δύο κύριες: α) φαινοτυπικές, οι οποίες στηρίζονται στα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών και β) γονοτυπικές μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην άμεση ανάλυση των γονιδίων που εδράζονται στα χρωμοσώματα. Ο φαινότυπος του MRSA μπορεί να είναι εξαιρετικά ετερογενής, γεγονός που δυσκολεύει την ανίχνευση με τις συμβατικές μεθόδους δοκιμής ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση, η χρήση δίσκου και η καλλιέργεια σε τριβλίο με άγαρ. Η ακρίβεια αυτών των μεθόδων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης, το μέσο καλλιέργειας, το pH, η συγκέντρωση άλατος και άλλοι παράγοντες. Επιπλέον, αυτές οι καλλιεργητικές μέθοδοι

απαιτούν 24 ώρες επώασης για την παροχή ακριβών αποτελεσμάτων (Thermo Fisher Scientific, 2015).

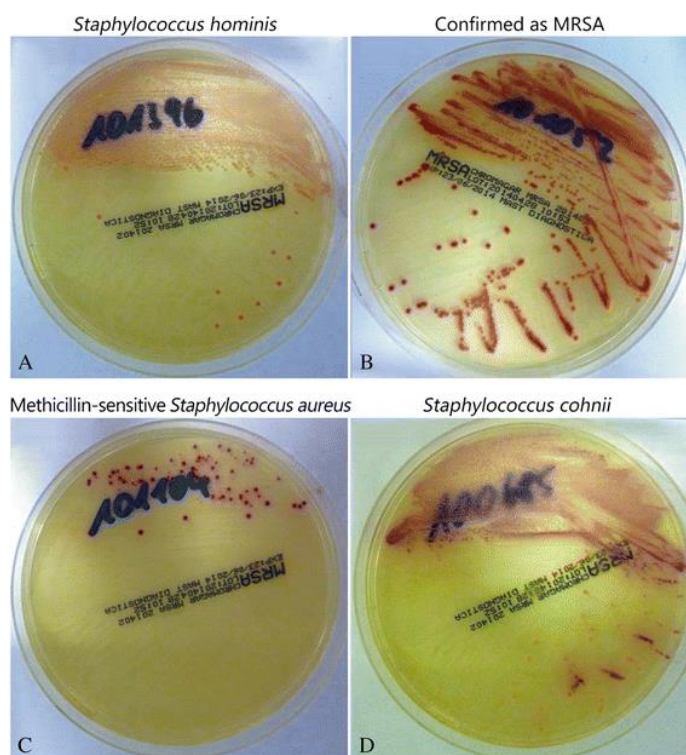
Κατά την ανασκόπηση των παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης MRSA, είναι προφανές ότι φαινοτυπικές προσεγγίσεις όπως η διάχυση δίσκου κεφοξιτίνης και οι δοκιμές συγκόλλησης λατέξ ήταν θεμελιώδεις για τον εντοπισμό της αντοχής στη μεθικιλίνη στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Αυτές οι μέθοδοι, ενώ είναι αξιόπιστες, συχνά συμπληρώνονται από πρόσθετες τεχνικές όπως η PCR για την ενίσχυση της ακρίβειας και της κάλυψης. Οι προκλήσεις που θέτει η εμφάνιση ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών του MRSA υπογραμμίζουν τη συνεχιζόμενη σημασία αυτών των καθιερωμένων μεθόδων ανίχνευσης σε κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια (Datta et al., 2011). Αν και οι νεότερες μοριακές τεχνικές προσφέρουν γρήγορα και ευαίσθητα αποτελέσματα, έρχονται με πρόσθετο κόστος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας, δίνοντας έμφαση στην οικονομική αποδοτικότητα και την αξιοπιστία των παλαιότερων προσεγγίσεων (Ermenlieva et al., 2016).

3.1.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης του MRSA

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια των βακτηρίων διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην ανίχνευση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου (MRSA), χρησιμεύοντας ως παραδοσιακά αλλά απαραίτητα εργαλεία στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Αυτές οι μέθοδοι (Datta et al., 2011), περιλαμβάνουν τεχνικές όπως η διάχυση δίσκου κεφοξιτίνης και οι δοκιμές συγκόλλησης λατέξ για ακριβή ταυτοποίηση MRSA. Παρά τις εξελίξεις στις μοριακές τεχνολογίες, οι οποίες προσφέρουν γρήγορα αποτελέσματα και βελτιωμένη ευαισθησία, οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια παραμένουν πολύτιμες για την αξιοπιστία και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητάς τους. Η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε καλλιέργειες, όπως τα εκλεκτικά χρωμογόνα μέσα άγαρ εξασφαλίζει αξιόπιστη ταυτοποίηση των στελεχών MRSA, συμβάλλοντας στην αποτελεσματική διαχείριση των ασθενών και στις στρατηγικές ελέγχου των λοιμώξεων (Ji, 2014).

Χρωμογενής Καλλιέργεια και Ανίχνευση MRSA

Η χρωμογενής καλλιέργεια (Chrom – agar) είναι μία μέθοδος ανίχνευσης βακτηρίων, όπως ο MRSA, που βασίζεται στη χρήση μέσων καλλιέργειας που περιέχουν χρωμογόνες ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις αντιδρούν με συγκεκριμένα ένζυμα που παράγονται από τα βακτήρια, προκαλώντας αλλαγές στο χρώμα της καλλιέργειας και επιτρέποντας την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Αρχικά λαμβάνονται κλινικά δείγματα από τον ασθενή, όπως ρινικά επιχρίσματα ή δείγματα από τραύματα. Τα δείγματα εμβολιάζονται σε χρωμογενή μέσα καλλιέργειας (πλάκες) που περιέχουν αντιβιοτικά για την καταστολή της ανάπτυξης μη ανθεκτικών βακτηρίων. Ακολουθεί επώαση των πλακών σε κατάλληλη θερμοκρασία (συνήθως 35-37°C) για 24-48 ώρες (Micheel et al., 2015).



Εικόνα 11. Μορφολογία αποικιών όπως παρατηρείται κατά τον έλεγχο CHROMagar MRSA. a) *Staphylococcus hominis*. b) Επιβεβαιωμένο ως MRSA. c) Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). d) *Staphylococcus cohnii* (Micheel et al., 2015).

Μετά την παρέλευση του παραπάνω χρονικού διαστήματος μελετώνται οι χρωματικές μεταβολές στις αποικίες βακτηρίων (**βλέπε εικόνα 11**). Οι αποικίες του MRSA εμφανίζονται σε συγκεκριμένο χρώμα (μπλε ή πράσινο) ανάλογα με το χρωμογόνο που χρησιμοποιείται. Πρόκειται για μία απλή τεχνική με εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα λόγω της χρήσης συγκεκριμένων χρωμογόνων ουσιών (Szabó, 2014).

Δοκιμασίες συγκόλλησης latex

Οι δοκιμασίες συγκόλλησης latex αντιπροσωπεύουν ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση του σταφυλόκοκκου MRSA, προσφέροντας μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδο για τον εντοπισμό της παρουσίας PBP2a, ενός βασικού δείκτη αντοχής στη μεθικιλίνη. Σωματίδια λατέξ, ευαισθητοποιημένα με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της PBP2a, αντιδρούν συγκεκριμένα με ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκους, προκαλώντας συγκόλληση που είναι ορατή δια γυμνού οφθαλμού. Ενώ οι νεότερες μοριακές τεχνικές έχουν κερδίσει την προσοχή για την ταχύτητα και την ακρίβειά τους, οι δοκιμασίες συγκόλλησης λατέξ παραμένουν σχετικές στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια για την αξιοπιστία και την απλότητά τους. Με τη συγκεκριμένη τεχνική οι επιστήμονες εκμεταλλεύονται τις βιοχημικές αντιδράσεις των βακτηρίων *S. aureus* ώστε να διαχωριστούν από τους αρνητικούς στην πηκτάση σταφυλόκοκκους. Οι δοκιμές συγκόλλησης με λατέξ έχουν το σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων φαινοτυπικών μεθόδων, καθώς δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στην εικόνα 12 φαίνεται μία δοκιμή συγκόλλησης latex με θετική αντίδραση για PBP2a σε βακτήριο MRSA (Arshad et al., 2013).



Εικόνα 12. Δοκιμή συγκόλλησης latex που δείχνει θετική αντίδραση για PBP2a σε MRSA (Arshad et al., 2013).

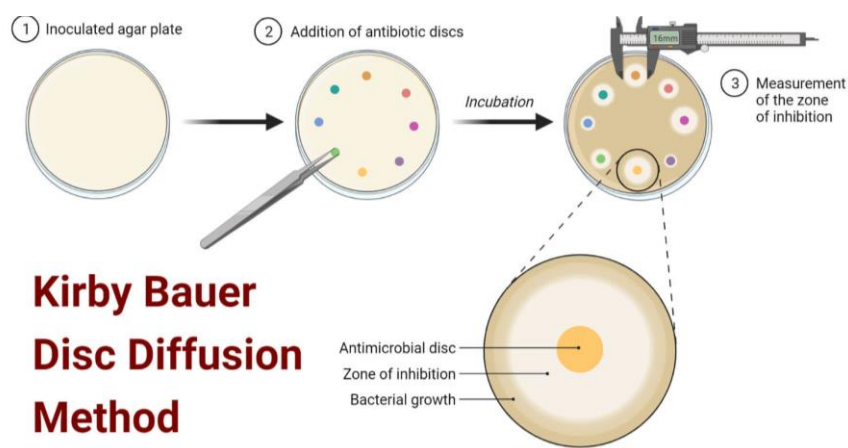
Δοκιμασίες ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Σε μεγάλο βαθμό εργαστήρια χρησιμοποιούν συνήθως ένα φάσμα αντιβιοτικών για να εξετάσουν την ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών των βακτηρίων. Εντούτοις, η ευαισθησία στα αντιβιοτικά δεν αποτελεί βοηθητικό παράγοντα στην μελέτη της επιδημιολογίας του MRSA, αφού είναι ανθεκτικός σε αυτά. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται αφενός στην ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών και αφετέρου στις πιθανές μεταλλάξεις των μικροβίων ή ακόμα και στην ανταλλαγή γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ανάμεσα σε πλασμίδια. Με αυτό τον τρόπο στελέχη, τα οποία δεν είναι όμοια είναι δυνατόν να έχουν παρόμοιους συνδυασμούς ανθεκτικότητας όποτε η ανίχνευση του MRSA να μην είναι δυνατή (Χίνη, 2007).

Διάχυση δίσκου κεφοξιτίνης

Μία άλλη μέθοδος είναι η διάχυση δίσκου κεφοξιτίνης. Χρησιμοποιείται στα εργαστήρια μικροβιολογίας για να αξιολογηθεί η ευαισθησία των βακτηρίων σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, σε αυτή την περίπτωση την κεφοξιτίνη. Η διαδικασία αυτή ανήκει στις μεθόδους

ευαισθησίας των αντιβιοτικών και είναι γνωστή και ως μέθοδος διάχυσης δίσκου ή μέθοδος Kirby-Bauer. Μια πλάκα άγαρ, συνήθως Muller-Hinton άγαρ, εμβολιάζεται με ένα ομοιόμορφο στρώμα βακτηριδιακού εναιωρήματος. Ένας δίσκος εμποτισμένος με κεφοξιτίνη τοποθετείται στην επιφάνεια της πλάκας. Η πλάκα επώάζεται σε κατάλληλες συνθήκες, συνήθως σε θερμοκρασία 35-37°C για 16-18 ώρες. Μετά την επώαση, μετράται η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από τον δίσκο της κεφοξιτίνης. Η ζώνη αυτή είναι η περιοχή γύρω από τον δίσκο όπου η ανάπτυξη των βακτηρίων έχει παρεμποδιστεί από το αντιβιοτικό. Αν η διάμετρος της ζώνης αναστολής είναι μεγαλύτερη από μία συγκεκριμένη τιμή, τα βακτήρια θεωρούνται ευαίσθητα στην κεφοξιτίνη. Στη περίπτωση που η διάμετρος είναι μικρότερη από μία συγκεκριμένη τιμή, τα βακτήρια θεωρούνται ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη ενώ αν είναι μεταξύ των ορίων για την ευαισθησία και την αντοχή, τα βακτήρια θεωρούνται ενδιάμεσα ευαίσθητα. Η διάχυση δίσκου κεφοξιτίνης είναι σημαντική ειδικά για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών *S. aureus*, όπως το βακτήριο MRSA, δεδομένου ότι η κεφοξιτίνη χρησιμοποιείται συχνά ως υποκατάστατο της μεθικιλίνης σε εργαστηριακές δοκιμές. Αυτή η μέθοδος (βλέπε εικόνα 13) είναι απλή, αξιόπιστη και χρησιμοποιείται ευρέως στα μικροβιολογικά εργαστήρια (Arshad et al., 2013; Sharma, 2022; Reynolds, 2024).



Εικόνα 13. Μέθοδος διάχυσης δίσκου Kirby Bauer για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (Sharma, 2022).

Τυποποίηση με άγαρ οξακιλλίνης (ODD)

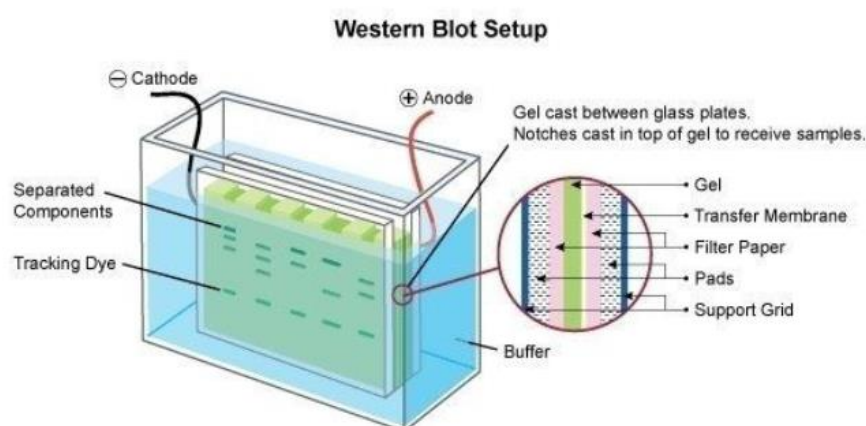
Η τυποποίηση με άγαρ οξακιλλίνης είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που εφαρμόζεται για την μέτρηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων, ειδικά των σταφυλόκοκκων, στην οξακιλλίνη, ένα αντιβιοτικό της ομάδας των β-λακταμών. Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως για την ανίχνευση των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus*. Μια πλάκα άγαρ περιέχει ένα συγκεκριμένο ποσό οξακιλλίνης (συνήθως 4 µg/ml). Η πλάκα εμβολιάζεται με ένα ομοιόμορφο στρώμα βακτηριακού εναιωρήματος, που είναι ρυθμισμένο σύμφωνα με το πρότυπο McFarland 0,5, το οποίο αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη πυκνότητα βακτηρίων. Οι πλάκες επωάζονται στους 35°C για 24 ώρες. Μετά την επώαση, εξετάζεται αν υπάρχει ανάπτυξη βακτηρίων στην πλάκα. Αν υπάρχει ανάπτυξη, τα βακτήρια θεωρούνται ανθεκτικά στην οξακιλλίνη. Αν δεν υπάρχει ανάπτυξη, τα βακτήρια θεωρούνται ευαίσθητα. Αν τα βακτήρια αναπτύσσονται στην πλάκα άγαρ που περιέχει οξακιλλίνη, τότε είναι ανθεκτικά στην οξακιλλίνη και πιθανόν ανθεκτικά και σε άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αν δεν υπάρχει ανάπτυξη στην πλάκα, τα βακτήρια είναι ευαίσθητα στην οξακιλλίνη (Sharma, 2022; Reynolds, 2024; Hardy Diagnostics, 2015).

Ταυτοποίηση με χρήση βακτηριοφάγων

Η ταυτοποίηση σταφυλόκοκκων με τη χρήση φάγων αποτελεί μία περίπλοκη βιολογικής διαδικασίας, όπου πολλαπλές βακτηριακές αποικίες σε ένα στρώμα πλάκας υποβάλλονται σε ένα εναιώρημα που περιέχει διαφορετικούς φάγους. Μετά από περίοδο επώασης 24 ωρών, οι αποικίες εξετάζονται. Καθώς οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται, τείνουν να μεταναστεύσουν μακριά από περιοχές όπου παρεμποδίζεται η ανάπτυξή τους. Πρόκειται μεν για μία αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του πληθυσμού και του τρόπου με τον οποίο εξαπλώνονται τα βακτηριακά στελέχη όμως δεν δύναται οι επιστήμονες να τη χρησιμοποιήσουν για την τυποποίηση του MRSA, επειδή η πλειονότητα των στελεχών εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη λύση των φάγων, ακόμη και όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Mizusawa & Carroll 2020).

Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot

Η ταυτοποίηση του MRSA μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική Western blot, η οποία ανιχνεύει συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα ανθεκτικά στελέχη. Οι κλινικές καλλιέργειες είναι η πηγή δειγμάτων βακτηρίων, που λαμβάνονται από μολυσμένα τραύματα, αίμα ή άλλους ιστούς. Για την απελευθέρωση των πρωτεϊνών, τα βακτήρια λύονται χρησιμοποιώντας απορρυπαντικά και ένζυμα. Στην εικόνα 14 φαίνεται μία συσκευή όπου εφαρμόζεται η ανοσοαποτύπωση.

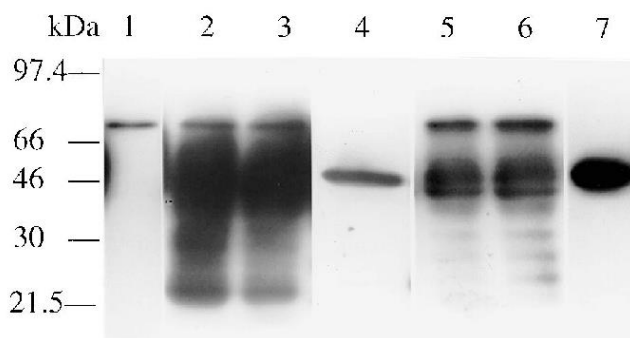


Εικόνα 14. Western Blotting (Ανοσοαποτύπωση): Ηλεκτροφόρηση πηκτής για πρωτεΐνες (Mizusawa & Carroll 2020).

Η ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου, παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS), διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθός τους. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση για την μετακίνηση των πεπτιδίων από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Για να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση αντισωμάτων, η μεμβράνη εμποτίζεται σε διάλυμα που περιέχει άσχετες πρωτεΐνες όπως γάλα ή BSA. Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με ένα πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη

PBP2a, την οποία κωδικοποιεί το γονίδιο *mecA* και χρησιμεύει ως διακριτικό χαρακτηριστικό του MRSA. Μετά την έκπλυση τυχόν μη δεσμευμένων πρωτογενών αντισωμάτων, εφαρμόζεται ένα δευτερεύον αντίσωμα. Αυτό το δευτερεύον αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτεύον αντίσωμα και συνδέεται με ένα ένζυμο, όπως το Horse Radish Peroxidase – HRP, ή μια φθορίζουσα ουσία. Μια χημική αντίδραση προκαλείται στη μεμβράνη όταν έρχεται σε επαφή με ένα κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός ή αλλοίωση του χρώματος. Η ανίχνευση των αποτελεσμάτων μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω φωτογραφικού φιλμ είτε μέσω συστήματος ανίχνευσης χημειοφωταύγειας.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική Western blot, μπορεί κανείς να επιτύχει αξιοσημείωτη ακρίβεια και ακρίβεια κατά τον εντοπισμό της παρουσίας της πρωτεΐνης PBP2a, έναν βασικό δείκτη αντοχής στη μεθικιλίνη (**βλέπε εικόνα 15**). Αυτή η μέθοδος όχι μόνο επιτρέπει τη μοριακή ανίχνευση του γονιδίου *mecA* μέσω PCR, αλλά επαληθεύει επίσης την πραγματική έκφραση της σχετικής πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο κίνδυνος εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που προέρχονται από αδρανοποιημένα γονίδια να ελαχιστοποιείται σημαντικά (Sekiguchi, 1995; Χίνη, 2007; Mizusawa & Carroll 2020).



Εικόνα 15. PBP2 στο υπερκείμενο του καλλιεργημένου διαλύματος MRSA.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση στυπώματος Western του TCA-καθιζήματος του υπερκείμενου που ελήφθη από το διάλυμα καλλιέργειας MRSA και το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-PBP2 χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα. Η λωρίδα 1, ημι-καθαρισμένη PBP2, δείχνει μια ζώνη 76 kDa που αντιστοιχεί στην PBP2. λωρίδα 2, υπερκείμενο MRSA (Sekiguchi, 1995).

Ενζυμική ηλεκτροφόρηση (MLEE)

Η πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (MLEE) είναι μια μέθοδος εφαρμόζεται για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας και της δομής του πληθυσμού βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών του MRSA. Συλλέγονται κλινικά δείγματα από ασθενείς με MRSA. Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα και μετά συλλέγονται για να απομονωθούν οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Τα ένζυμα εκχυλίζονται από τα βακτήρια. Συνήθως, αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει λύση των κυττάρων και καθαρισμό των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση την κινητικότητά τους σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι ζώνες των ενζύμων χρωματίζονται και αναλύονται. Κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια διαφορετική μορφή ενός ενζύμου που μπορεί να υπάρχει σε διαφορετικά στελέχη βακτηρίων. Τα προφίλ των ενζύμων συγκρίνονται μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων για να προσδιοριστούν οι γενετικές διαφορές και οι ομοιότητες. Η γενετική ποικιλομορφία μετράται και αναλύεται για να κατανοηθούν οι εξελικτικές σχέσεις και η εξάπλωση των στελεχών. Η τεχνική αυτή βοηθά στην κατανόηση της δομής του πληθυσμού των MRSA. Μέσω της ανάλυσης των προφίλ των ενζύμων, μπορούν να εντοπιστούν διαφορετικά γενετικά στελέχη και να κατανοηθεί η γενετική ποικιλομορφία του πληθυσμού. Επιπροσθέτως, η τεχνική αυτή είναι πολύτιμη για την ιχνηλάτηση επιδημιών MRSA. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί εάν τα στελέχη που απομονώνονται από διαφορετικούς ασθενείς ή περιοχές είναι γενετικά συγγενικά ή ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους. Ωστόσο, η τεχνική απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και τεχνογνωσία ενώ παράλληλα είναι χρονοβόρα και απαιτητική σε εργαστηριακούς πόρους (Fitzgerald et al., 2001; Koreen et al., 2004; Χίνη, 2007).

3.1.4 Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης MRSA

Οι γονοτυπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση του MRSA διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ταυτοποίηση των στελεχών και στην παρακολούθηση της εξάπλωσής τους. Αυτές οι προηγμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανάλυση γενετικού υλικού για τον προσδιορισμό της παρουσίας συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στα αντιβιοτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη γονοτυπική τεχνική που επιτρέπει την ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση του MRSA. Επιπλέον, η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση του βακτηριακού γονιδιώματος, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις γενετικές παραλλαγές και τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν το πιο σημαντικό κομμάτι στην ταχεία ανίχνευση του MRSA και επομένως στον γρήγορο σχεδιασμό μιας θεραπευτικής προσέγγισης.

Τυποποίηση του MRSA με ανάλυση πλασμιδίων

Η χρησιμότητα της ανάλυσης ενζύμων περιορισμού του πλασμιδικού DNA στην τυποποίηση του (MRSA) υπογραμμίζεται από την ικανότητά του να στις επιδημιολογικές έρευνες. Οι μέθοδοι μοριακής τυποποίησης, όπως η ανάλυση ενζύμων περιορισμού, προσφέρουν ανώτερη ανάλυση σε σύγκριση με τις παραδοσιακές φαινοτυπικές δοκιμασίες, διευκολύνοντας την ακριβή ταυτοποίηση και παρακολούθηση των επιδημικών στελεχών MRSA. Η ανίχνευση του MRSA με πλασμιδιακή ανάλυση εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι τα πλασμίδια μπορούν να υπάρχουν σε διάφορες μορφές, όπως υπερελικωμένα, ανοικτά με κυκλικό σχήμα, γραμμικά και ολιγομερή, οι οποίες κινούνται με διαφορετικό τρόπο κατά την ηλεκτροφόρηση (Hartstein, 1995) και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

A. Πρώτα συλλέγονται δείγματα από τα βακτήρια που θέλουμε να αναλύσουμε. Αυτά μπορεί να είναι απομονώματα από ασθενείς ή από επιδημιολογικά δείγματα.

B. Το επόμενο βήμα είναι η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια. Αυτό γίνεται με ειδικές τεχνικές που επιτρέπουν την εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA, διαχωρίζοντάς το από το χρωμοσωμικό DNA και άλλα κυτταρικά συστατικά.

Γ. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA υφίσταται πέψη με περιοριστικά ένζυμα, τα οποία κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Τα ένζυμα αυτά επιλέγονται με βάση τις γνωστές αλληλουχίες στόχων τους, και η κοπή τους παράγει θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους.

Δ. Τα κομμάτια DNA που παράγονται από την πέψη διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα θραύσματα μεταναστεύουν στο πήκτωμα με βάση το μέγεθός τους, δημιουργώντας ένα μοτίβο από ζώνες.

Ε. Τα μοτίβα που προκύπτουν συγκρίνονται μεταξύ τους. Κάθε στέλεχος MRSA έχει συγκεκριμένο μοτίβο ζωνών, το οποίο είναι χρήσιμο για την ταυτοποίηση του μικροβίου. Η ανάλυση αυτή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ επιδημιολογικά σχετικών και μη σχετικών στελεχών, καθώς και τον εντοπισμό χαρακτηριστικών πλασμιδίων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη.

ΣΤ. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης συγκρίνονται με γνωστά πρότυπα ή αναφορές από βιβλιοθήκες πλασμιδιακών μοτίβων. Αυτό βοηθά στον προσδιορισμό εάν το στέλεχος που εξετάζεται είναι γνωστό MRSA και, αν ναι, ποιος είναι ο επιδημιολογικός του σύνδεσμος.

Η ανίχνευση MRSA με τη παραπάνω μέθοδο είναι πολύ σημαντική. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι το βακτήριο MRSA δεν ανιχνεύεται πάντα με αυτή τη μέθοδο, καθώς περίπου το 50% των ευαίσθητων στη μεθικιλίνη στελεχών *S. aureus* δεν έχουν πλασμίδια (Hartstein, 1995; Χίνη, 2007).

Μέθοδος Restriction Enzyme Analysis, REA στην ανίχνευση και τυποποίηση του MRSA

Η Restriction Enzyme Analysis (REA) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του DNA, συμπεριλαμβανομένων των πλασμιδίων, με σκοπό τον χαρακτηρισμό και τη διάκριση βακτηριακών στελεχών, όπως ο MRSA. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί ένζυμα περιορισμού για να κόψει το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις και στη συνέχεια αναλύει τα θραύσματα που προκύπτουν.

Αρχικά, δείγματα βακτηρίων συλλέγονται από κλινικές ή περιβαλλοντικές πηγές και καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα για να εξασφαλιστεί επαρκής ποσότητα βακτηριακής μάζας. Το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται από τα καλλιεργημένα βακτήρια χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα απομόνωσης DNA, που συχνά περιλαμβάνουν λύση των κυττάρων και καθαρισμό του DNA με διαλύτες και φυγοκέντρηση.

Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA υποβάλλεται σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Αυτά τα ένζυμα κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, δημιουργώντας θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους. Τα ένζυμα επιλέγονται με βάση την ικανότητά τους να κόβουν το DNA σε χαρακτηριστικές θέσεις που παράγουν διακριτά μοτίβα θραυσμάτων. Ακολουθώς, τα

κομμάτια DNA, τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια της πέψης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, τα θραύσματα κινούνται μέσω του πηκτώματος με βάση το μέγεθός τους και συγκεκριμένα τα μικρότερα θραύσματα κινούνται ταχύτερα.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρωματίζεται για να γίνουν ορατά τα θραύσματα DNA. Τα μοτίβα των ζωνών που προκύπτουν συγκρίνονται με πρότυπα ή με γνωστά μοτίβα από άλλες βακτηριακές απομονώσεις. Η σύγκριση αυτή επιτρέπει τον χαρακτηρισμό και τη διάκριση των βακτηριακών στελεχών (Hartstein, 1995).

Η REA επιτρέπει την ταυτοποίηση των πλασμιδίων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη. Τα χαρακτηριστικά μοτίβα ζωνών που προκύπτουν από την πέψη με περιοριστικά ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών στελεχών MRSA. Πρόκειται είναι για πολύτιμη τεχνική για την ανάλυση του πλασμιδιακού DNA, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά και τη γενετική τους ποικιλομορφία εντούτοις Η ικανότητα διαφοροποίησης των στελεχών τύπου MRSA είναι χαμηλή περιορίζοντας σημαντικά τη χρήση της ως επιδημιολογική μέθοδο (Bard, J. 2017; Sambrook & Russel, 2001).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την πολλαπλή αντιγραφή συγκεκριμένων περιοχών DNA, καθιστώντας δυνατή την ενίσχυση των τμημάτων αυτών. Αυτή η τεχνική έχει επηρεάσει σημαντικά τον τομέα της μοριακής διάγνωσης, διευκολύνοντας την ανίχνευση χαμηλών ποσοτήτων γενετικού υλικού με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Όσον αφορά την ανίχνευση του MRSA, η PCR στοχεύει ειδικά γονίδια που είναι χαρακτηριστικά για τα στελέχη του MRSA, της το γονίδιο *mecA* που σχετίζεται με την αντοχή στη μεθικιλίνη. Με την ενίσχυση και ανίχνευση αυτών των γονιδίων-στόχων, η PCR μπορεί να καθορίσει γρήγορα και με ακρίβεια την παρουσία του MRSA σε κλινικά δείγματα. Σε σύγκριση με της παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας, η PCR προσφέρει ταχύτερα αποτελέσματα και βελτιωμένη

ευαισθησία, καθιστώντας την σημαντικό εργαλείο για την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση του MRSA σε κλινικές συνθήκες (Staněk, 2013).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι PCR που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του MRSA, καθένας με τα δικά του πλεονεκτήματα και εφαρμογές.

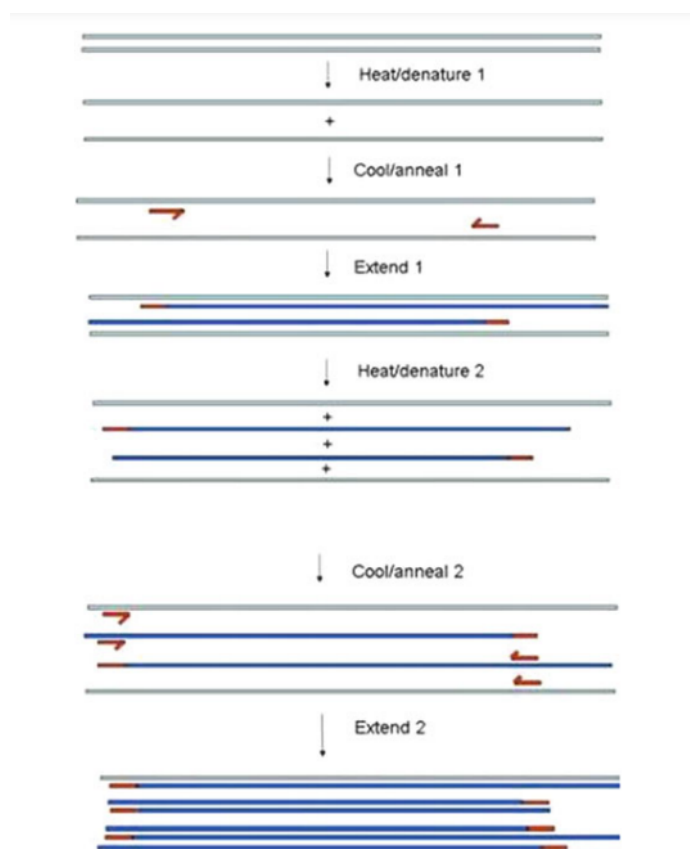
Κλασσική PCR (Conventional PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια σημαντική μοριακή τεχνική στη μικροβιολογία, έχει επαναστατήσει την γρήγορη και ακριβή ανίχνευση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (MRSA) σε κλινικά περιβάλλοντα. Η PCR παρουσιάζει εξαιρετική ακρίβεια και ευαισθησία στην ανίχνευση σοβαρού πυρετού με σύνδρομο θρομβοπενίας, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία της στη διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων. Στην περίπτωση του MRSA, η PCR ανιχνεύει το γονίδιο *mecA*, υπεύθυνο για την αντοχή στη μεθικιλίνη. Κλινικά δείγματα λαμβάνονται από τον ασθενή (π.χ. από το δέρμα, τη μύτη) και το DNA απομονώνεται χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτ (Hue-Roye & Vege, 2008). Το απομονωμένο DNA προστίθεται σε ένα μείγμα που περιλαμβάνει:

- Εκκινητές (primers) ειδικούς για το γονίδιο *mecA*.
- dNTPs (δεοξυνουκλεοτιδικά τριφωσφορικά).
- DNA πολυμεράση.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).

Πρώτα, το DNA αποδιατάσσεται (Denaturation) με θέρμανση της 94-95°C. Στη συνέχεια, ψύχεται της 50-60°C για να δεσμευτούν οι εκκινητές στα ειδικά σημεία του γονιδίου *mecA*. Ακολουθεί θέρμανση της 72°C για τη σύνθεση του νέου κλώνου DNA από την DNA πολυμεράση. Αυτοί οι κύκλοι επαναλαμβάνονται 25-35 φορές και τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη και ανιχνεύονται με φθορισμό (Hue-Roye & Vege, 2008). Κατά τη μιτωτική κυτταρική διαίρεση, το γονιδίωμα αντιγράφεται για κάθε νέο σωματικό κύτταρο, διπλασιάζοντας την ποσότητα του DNA και μοιράζοντας το ισομερώς στα νέα κύτταρα. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί πολλά δισεκατομμύρια αντίγραφα του

γονιδιώματος στον οργανισμό. Μία απεικόνιση της διαδικασίας φαίνεται στην εικόνα 16 (Hue-Roye & Vege, 2008; Firoozeh et al., 2020).



Εικόνα 16. Σχηματικό διάγραμμα PCR. Σε κάθε κύκλο προκύπτει διπλάσια ποσότητα του DNA στόχου. Τα μόρια DNA στόχου πολλαπλασιάζονται εκθετικά και ο τελικός αριθμός προκύπτει από τη σχέση 2^n , όπου «n» είναι οι κύκλοι PCR που έχουν διεξαχθεί.

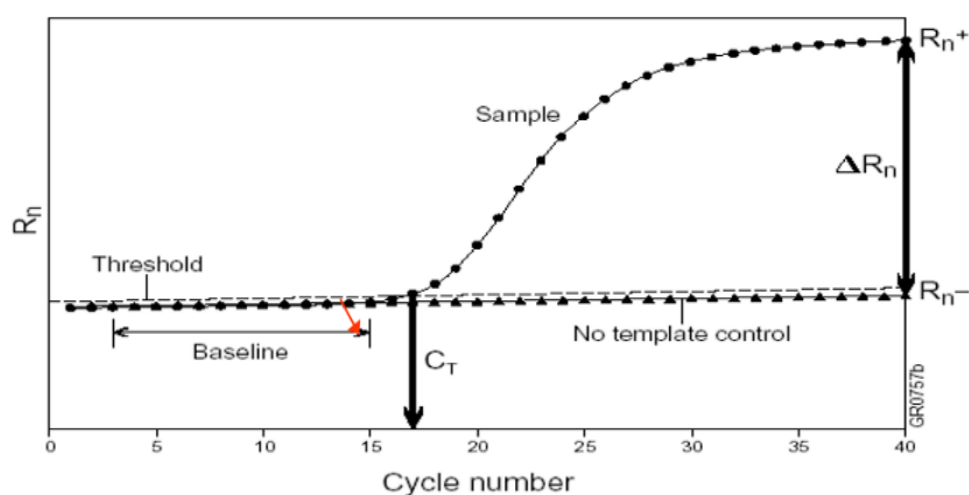
PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative PCR ή qPCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου, δίνει τη δυνατότητα της ανίχνευσης και της ποσοτικοποίησης του DNA σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιεί φθορίζουσες ουσίες (probes) ή χρωστικές

για την παρακολούθηση της ενίσχυσης του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Απομόνωση DNA από το δείγμα.
- Χρήση ειδικών εκκινητών και ανιχνεύσεων για το γονίδιο *mecA*.
- Εκτέλεση της qPCR με ταυτόχρονη καταγραφή του φθορίζοντος σήματος.
- Ανάλυση των αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο.

Σε αυτή τη μέθοδο PCR, ο εξοπλισμός καταγράφει την αύξηση της φθορισμού σε κάθε κύκλο, επιτρέποντας την παρακολούθηση της ποσότητας του DNA σε κάθε φάση της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας υπάρχει ένα σημείο, γνωστό ως κύκλος ποσοτικοποίησης (C_q), στο οποίο η ένταση του φθορισμού είναι σαφώς μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης και με βάση το οποίο είναι δυνατόν να γίνει η εύρεση της ακριβούς ποσότητας της προσδιοριζόμενης ουσίας. Για αυτό τον σκοπό κατασκευάζεται μία καμπύλη βαθμονόμησης με διαλύματα, τα οποία έχουν προκύψει από διαδοχικές αραιώσεις και γνωρίζουμε της συγκεντρώσεις της (Kralik & Ricchi, 2017).



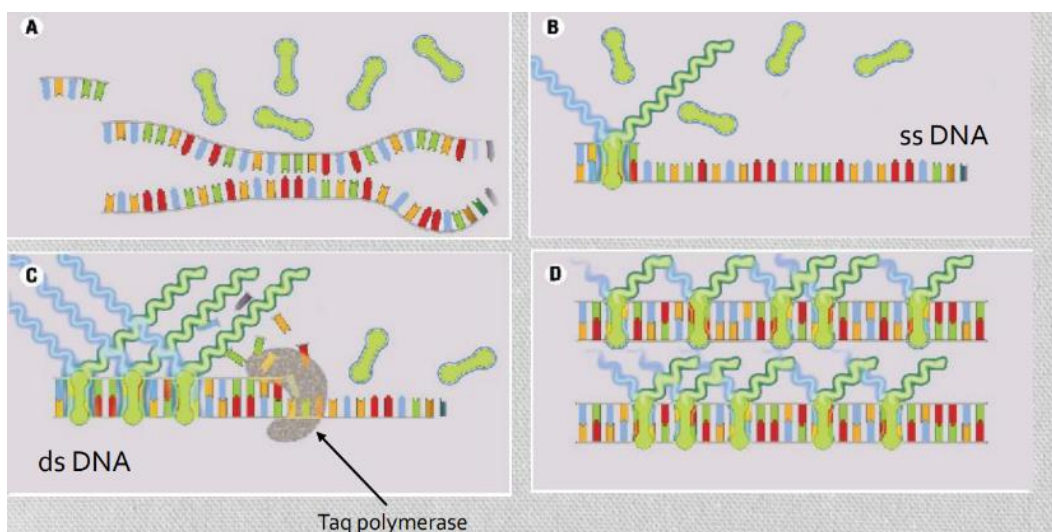
Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της PCR όπου φαίνεται η εξάρτηση του φθορισμού από τον αριθμό των κύκλων. (Kralik & Ricchi, 2017)

Η εικόνα 17 δείχνει ένα διάγραμμα που απεικονίζει τη συγκεκριμένη στιγμή κατά την οποία κάθε δείγμα φθάνει στην εκθετική φάση, που αναφέρεται ως ο κύκλος κατωφλίου (CT). Αυτή η φάση αναγνωρίζεται μέσω της ανίχνευσης της σήματος φθορισμού (Kralik & Ricchi, 2017).

Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές PCR πραγματικού χρόνου περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου: η μέθοδο των φθορίζοντων χρωστικών και η μέθοδος των φθορίζοντων ανιχνευτών (probes).

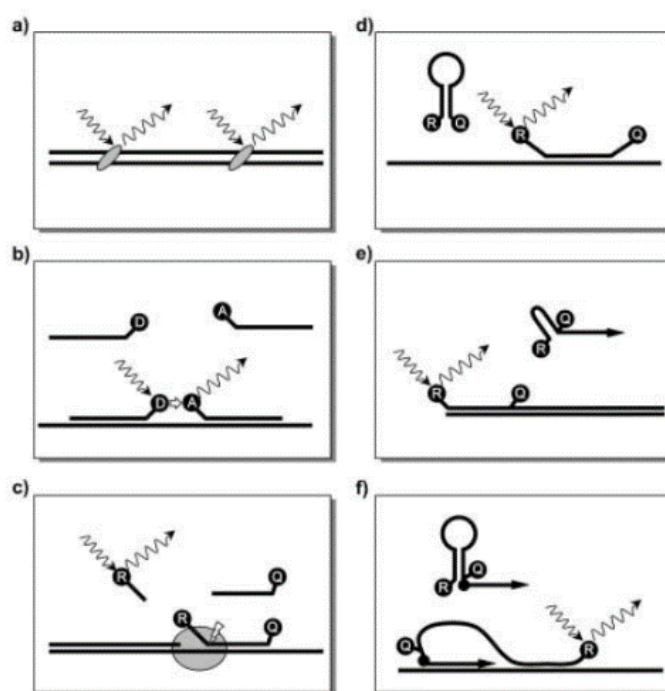
Στην πρώτη μέθοδο, χρησιμοποιούνται ειδικές χρωστικές που έχουν την ιδιότητα του φθορισμού κατά την σύνδεση του με δίκλωνο DNA (dsDNA). Παράδειγμα χαρακτηριστικό τέτοιου είδους χρωστικής είναι η SYBR Green I. Η χρωστική απορροφά το μπλε φως και εκπέμπει πράσινο φως όταν δεσμεύεται στο DNA (βλέπε εικόνα 18). Ωστόσο, μπορεί να δένεται και σε μη ειδικά προϊόντα PCR, της διμερή εκκινητών, δημιουργώντας ψευδείς θετικές ενδείξεις. (Wilhelm & Pingoud, 2003; Houghton & Cockerill, 2006).



Εικόνα 18. Τρόπος δράσης της χρωστικής SYBR Green I (Houghton & Cockerill, 2006).

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικούς φθορίζοντες ανιχνευτές που δένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του στόχου DNA. Οι πιο γνωστοί τύποι ανιχνευτών είναι οι TaqMan probes και οι Molecular Beacons. Αυτή η μέθοδος προσφέρει υψηλή ειδικότητα, καθώς οι ανιχνευτές

συνδέονται μόνο σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, μειώνοντας τον κίνδυνο ψευδών θετικών ενδείξεων (βλέπε εικόνα 19). Η ανίχνευση του σήματος γίνεται σε κάθε κύκλο της qPCR. (Houghton & Cockerill, 2006).



Εικόνα 19. Τρόποι ανίχνευσης με qPCR. D: δότης A: αποδέκτης. α) SYBR Green I β) υβριδισμός με χρήση ανιχνευτών γ) Οι ανιχνευτές TaqMan. Ο κύκλος δείχνει την υδρόλυση του TaqMan ανιχνευτή από την πολυμεράση Taq δ) μοριακός «φάρος» ε) Sunrise εκκινητής. στ) Εκκινητής Scorpion (Houghton & Cockerill, 2006).

Επιπλέον, η qPCR είναι πιο ασφαλής τεχνική αφού είναι δυνατόν να αποφευχθούν επιμολύνσεις αφού δεν απαιτείται επιπλέον ενασχόληση με τα δείγματα μετά την ενίσχυση (Houghton & Cockerill, 2006).

Το Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay της εταιρείας Cepheid είναι ένα in vitro διαγνωστικό τεστ που ανιχνεύει γρήγορα και ταυτόχρονα δύο στελέχη του *S. aureus*, το MSSA και το MRSA απευθείας από θετικές καλλιέργειες αίματος. Η τεχνική βασίζεται στη qPCR και δίνει αποτελέσματα σε εξήντα λεπτά. Επιπλέον, το GenomEra MRSA/SA AC Assay είναι μια

δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των γονιδίων του MRSA. Για την ακρίβεια ανιχνεύει τα γονίδια *mecA* και *mecC* που είναι υπεύθυνα για την αντίσταση του βακτηρίου στη μεθικιλίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Becker et al., 2006; Χίνη, 2007).

Multiplex PCR

Η Multiplex PCR επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών γονιδίων στόχων σε μία αντίδραση. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ανίχνευση του MRSA, καθώς μπορεί να ενισχύσει ταυτόχρονα το γονίδιο *mecA* και άλλα γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη και τον τύπο του σταφυλόκοκκου. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Απομόνωση DNA από το δείγμα.
- Χρήση πολλαπλών εκκινητών που στοχεύουν διάφορα γονίδια (π.χ., *mecA*, *sra*, *pvl*).
- Εκτέλεση της Multiplex PCR.
- Ανάλυση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση.

Αυτοί οι τύποι PCR επιτρέπουν την ακριβή, ευαίσθητη και αποτελεσματική ανίχνευση του MRSA, βοηθώντας στην επιδημιολογική παρακολούθηση και τη διαχείριση των λοιμώξεων (Strommenger et al., 2003; McClure et al., 2006).

Δυαδική Τυποποίηση με DNA-Ανιχνευτές (DNA probes)

Η δυαδική τυποποίηση στελεχών με χρήση ειδικών σε στελέχη DNA-ανιχνευτών είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την τυποποίηση του MRSA. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη χρήση ειδικών αλληλουχιών DNA που μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένα γονίδια ή γενετικούς δείκτες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη.

Πρωτίστως, δείγματα βακτηρίων συλλέγονται από βιολογικά υγρά όπως ρινικό επίχρισμα και καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα για να εξασφαλιστεί επαρκής ποσότητα βακτηριακής μάζας.

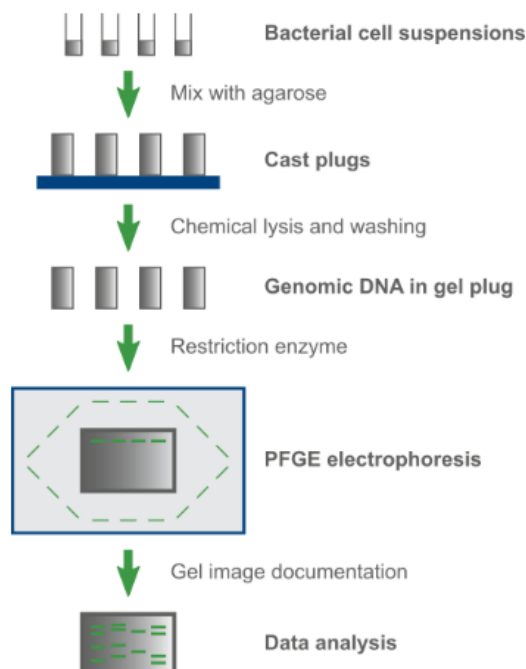
Το DNA απομονώνεται από τα καλλιεργημένα βακτήρια χρησιμοποιώντας τυπικά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA. Οι DNA-ανιχνευτές είναι συνθετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικές προς τις συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους του MRSA, όπως το γονίδιο *mecA* που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Οι DNA-ανιχνευτές επισημαίνονται με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες για εύκολη ανίχνευση. Το απομονωμένο DNA από τα δείγματα αναμειγνύεται με τους DNA-ανιχνευτές και το μείγμα επωάζεται υπό συνθήκες που επιτρέπουν τον υβριδισμό των ανιχνευτών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του βακτηριακού DNA (Strommenger et al., 2003). Μετά τον υβριδισμό, τα δείγματα πλένονται για να απομακρυνθούν οι μη ειδικά δεσμευμένοι ανιχνευτές. Τα σήματα από τους επισημασμένους DNA-ανιχνευτές ανιχνεύονται και αναλύονται χρησιμοποιώντας κατάλληλο εξοπλισμό, όπως φθορίζοντες ανιχνευτές ή ραδιογραφικά φιλμ. Οι DNA-ανιχνευτές έχουν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση ακόμα και μικρών ποσοτήτων DNA του MRSA. Η μέθοδος αυτή είναι σχετικά γρήγορη, καθώς οι ανιχνευτές μπορούν να δώσουν αποτελέσματα μέσα σε λίγες ώρες. Η χρήση πολλαπλών ανιχνευτών επιτρέπει τη δυαδική τυποποίηση των στελεχών MRSA, καθορίζοντας την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων γενετικών δεικτών (McClure et al., 2006).

Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) παραμένει μια μέθοδος ακρογωνιαίου λίθου στη μοριακή επιδημιολογία, προσφέροντας υψηλή διακριτική ισχύ στην πληκτρολόγηση στελεχών ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus*. Η ικανότητα της τεχνικής να αναλύει μεγάλα θραύσματα DNA παρέχει λεπτομερή γενετική συγγένεια μεταξύ των απομονωμένων, βοηθώντας στις έρευνες επιδημιών και στα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων. Η διαδικασία PFGE (**βλέπε εικόνα 20**) για την ανίχνευση του MRSA έχει τα ακόλουθα βήματα:

- Δείγματα βακτηρίων συλλέγονται από κλινικές ή περιβαλλοντικές πηγές και καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα για να εξασφαλιστεί επαρκής ποσότητα βακτηριακής μάζας.

- Τα καλλιεργημένα βακτήρια ενσωματώνονται σε μικρά πώματα άγαρ για να διατηρηθούν οι δομές του DNA κατά την επεξεργασία.
- Τα κύτταρα λύνονται σε άγαρ, απελευθερώνοντας το γονιδίωμα τους. Ακολουθεί καθαρισμός του DNA από πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά συστατικά.
- Το απομονωμένο DNA υποβάλλεται σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε μεγάλα τμήματα. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ένζυμο SmaI για το γονιδίωμα του *S. aureus*.



Εικόνα 20. Διαδικασία της PFGE

(Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing, <https://www.applied-maths.com/applications/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge-typing>).

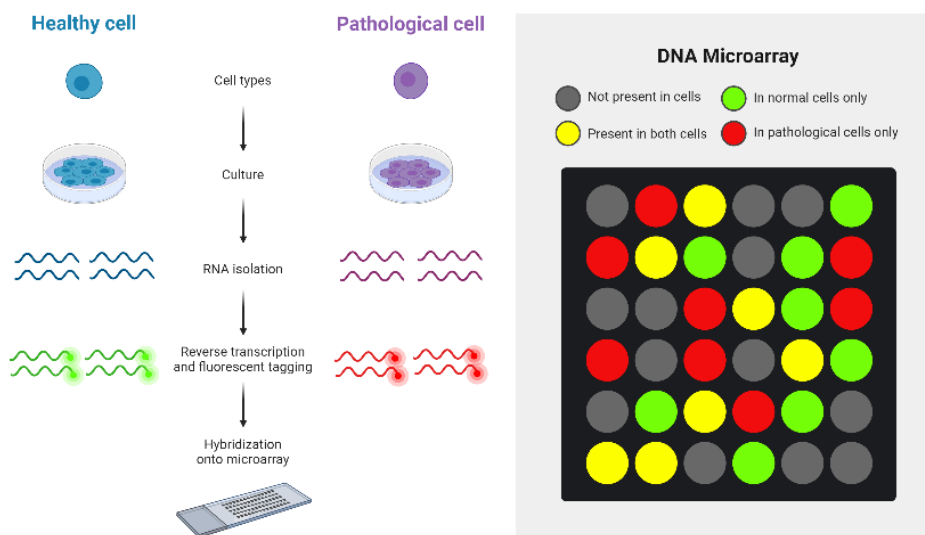
- Τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με PFGE, όπου το ηλεκτρικό πεδίο αλλάζει κατεύθυνση περιοδικά για να διευκολύνει τη μετακίνηση των μεγάλων μορίων DNA μέσα από το πήκτωμα αγαρόζης. Η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες έως ημέρες, ανάλογα με την ανάλυση που απαιτείται.

- Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρωματίζεται για να γίνουν ορατές οι ζώνες DNA. Τα μοτίβα ζωνών αναλύονται και συγκρίνονται με βάση την παρουσία και τη θέση των ζωνών (Tenover et al., 1995; McDougal et al., 2003).

Η PFGE κατηγοριοποιεί αποτελεσματικά τα στελέχη MRSA σε ομάδες με βάση τα γενετικά δακτυλικά αποτυπώματα. Επιπλέον, η ευελιξία της PFGE στην ανίχνευση επιδημιολογικών δεσμών μεταξύ στελεχών MRSA ανθρώπων και ζώων, υπογραμμίζει τη σημασία της στην επιτήρηση και κατανόηση της μετάδοσης του MRSA (Naji et al., 2024).

Ανίχνευση με μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

Τα DNA microarrays, όπως φαίνονται στην εικόνα 21, χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση και ανάλυση γενετικού υλικού. Κατά την εξέταση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*, οι μικροσυστοιχίες DNA προσφέρουν έναν γρήγορο και ακριβή τρόπο αναγνώρισης συγκεκριμένων γονιδίων που συνδέονται με την αντοχή στα αντιβιοτικά.



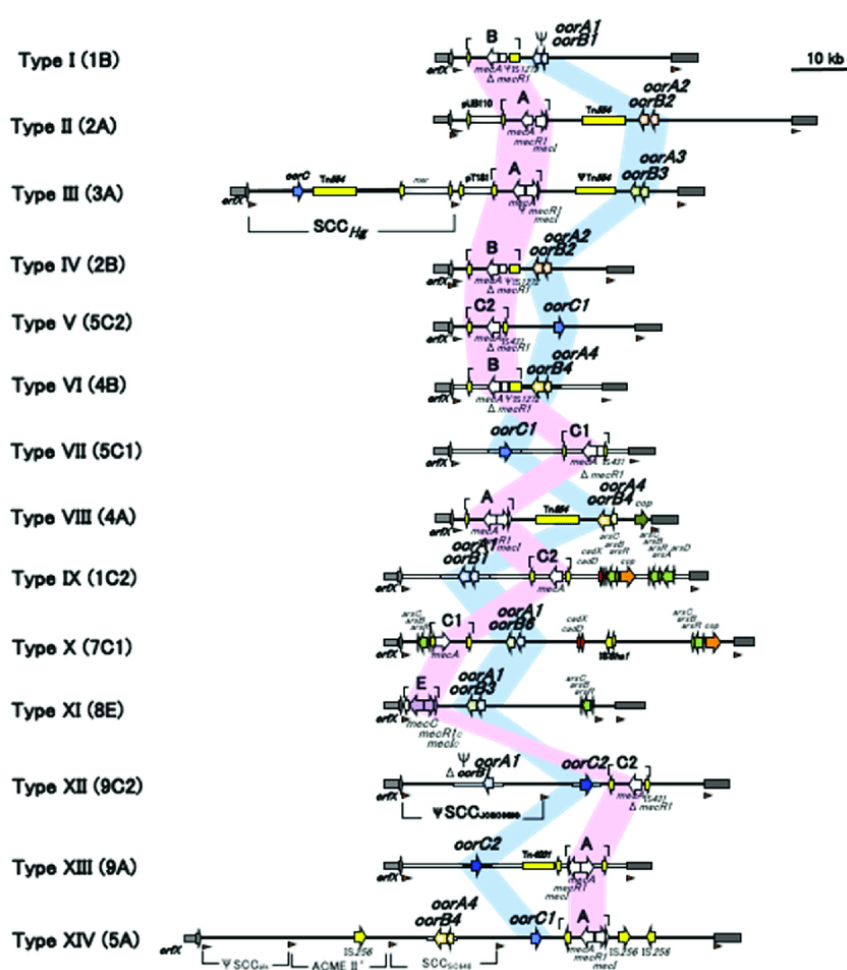
Εικόνα 21. Απλή ρύθμιση και βήματα για ανίχνευση με DNA μικροσυστοιχίες (Graves, 2024).

Όπως, σε κάθε προαναφερθείσα τεχνική έτσι και σε αυτή συλλέγεται δείγμα από τον ασθενή είτε από μια πληγή είτε λαμβάνεται ρινικό επίχρισμα ή αίμα. Το DNA του MRSA απομονώνεται από το δείγμα με τη χρήση τεχνικών απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. Το απομονωμένο γενετικό υλικό του επισημαίνεται με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες, οι οποίες θα επιτρέψουν την ανίχνευσή του στις μικροσυστοιχίες. Στη συνέχεια, το επισημασμένο DNA τοποθετείται πάνω στις μικροσυστοιχίες, όπου υβριδίζεται (συνδέεται) με τα συμπληρωματικά αλληλουχίες DNA που είναι προσαρτημένες στην επιφάνειά τους. Η ένταση του φθορισμού ή της ραδιενέργειας στις διάφορες θέσεις της μικροσυστοιχίας μετριέται και αφού συγκεντρωθούν τα δεδομένα, αναλύονται για να προσδιοριστούν τα υπάρχοντα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά καθώς και άλλοι γενετικοί δείκτες του MRSA. Αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ ακριβείς και μπορούν να ανιχνεύσουν πολλαπλούς παθογόνους μικροοργανισμούς ταυτόχρονα, αλλά είναι περίπλοκες και δαπανηρές (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Diep & Otto 2008).

Η τυποποίηση του χρωμοσώματος με σταφυλοκοκκική κασέτα (SCCmec)

Η τυποποίηση του χρωμοσώματος σταφυλοκοκκικής κασέτας mec (SCCmec) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη μοριακή επιδημιολογία του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου, προσφέροντας πληροφορίες σχετικά με την ποικιλομορφία και τους μηχανισμούς αντοχής αυτών των παθογόνων. Η τυποποίηση του χρωμοσώματος με σταφυλοκοκκική κασέτα (SCCmec) είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος για την ανίχνευση και την κατηγοριοποίηση των στελεχών MRSA. Η SCCmec είναι μια κινητή γενετική μονάδα που μεταφέρει το γονίδιο mecA, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Δείγματα MRSA συλλέγονται και καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα. Το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τα καλλιεργημένα βακτήρια. Η PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την τυποποίηση της SCCmec. Χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές (primers) που στοχεύουν τις διαφορετικές περιοχές της SCCmec για την αναγνώριση των διαφορετικών τύπων. Συγκεκριμένες περιοχές-στόχοι περιλαμβάνουν τα γονίδια mecA, ccr (cassette chromosome recombinase) και άλλες περιοχές που είναι χαρακτηριστικές των διαφορετικών τύπων SCCmec, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 22. Τα προϊόντα της PCR

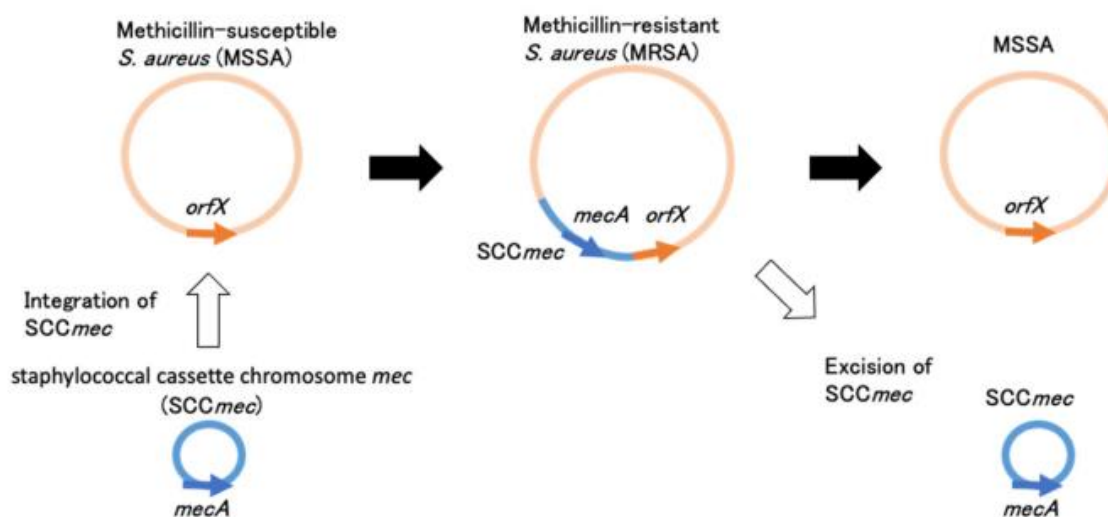
αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση της παρουσίας των αναμενόμενων ζωνών. Η ανάλυση των ζωνών καθορίζει τον τύπο της SCCmec (π.χ., τύπος I, II, III, IV, V). Η γνώση του SCCmec τύπου μπορεί να συσχετιστεί με συγκεκριμένα προφίλ αντοχής στα αντιβιοτικά και να κατευθύνει τη θεραπευτική αγωγή (Ghosh et al., 2016).



Εικόνα 22. Σχηματική σύγκριση των τρεχόντων τύπων SCCmec (Uehara, 2022).

Τα συστατικά του SCCmec είναι ένα σύμπλοκο γονιδίων mec (mec gene complex). Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από το mecA, το οποίο όπως έχει προαναφερθεί ,κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PBP2a, η οποία μειώνει τη δέσμευση της μεθικιλίνης και άλλων

β-λακταμικών αντιβιοτικών. Στο σύμπλοκο ανήκει και το γονίδιο *mecC*, που είναι ομόλογο του *mecA* και δύναται να προσφέρει ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Το SCCmec συνίσταται, επίσης, από δομικά γονίδια και ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες είναι οι *mecR1* και *mecI*, που ρυθμίζουν την έκφραση του *mecA*. Τα γονίδια *ccrAB* και/ή *ccrC* κωδικοποιούν τις κασσετάσες και είναι ένζυμα που επιτρέπουν την ενσωμάτωση και την εξαγωγή του SCCmec από το χρωμόσωμα του σταφυλόκοκκου μέσω ανασυνδυαστικών γεγονότων. Η αλληλουχία θέσης ένταξης (Integration Site Sequence, ISS) είναι ένα συγκεκριμένο σημείο στο χρωμόσωμα του σταφυλόκοκκου που λειτουργεί ως στόχος για την ανασυνδυαστική ένταξη του SCCmec, διευκολύνοντας την ενσωμάτωση της κασέτας στο γονιδίωμα του βακτηρίου. Γενικά, το SCCmec είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη και άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά στα στελέχη MRSA, καθιστώντας τη θεραπεία των λοιμώξεων πιο δύσκολη. Στην εικόνα 23 παρουσιάζεται ο τρόπος εισαγωγής του SCCmec στο MRSA.

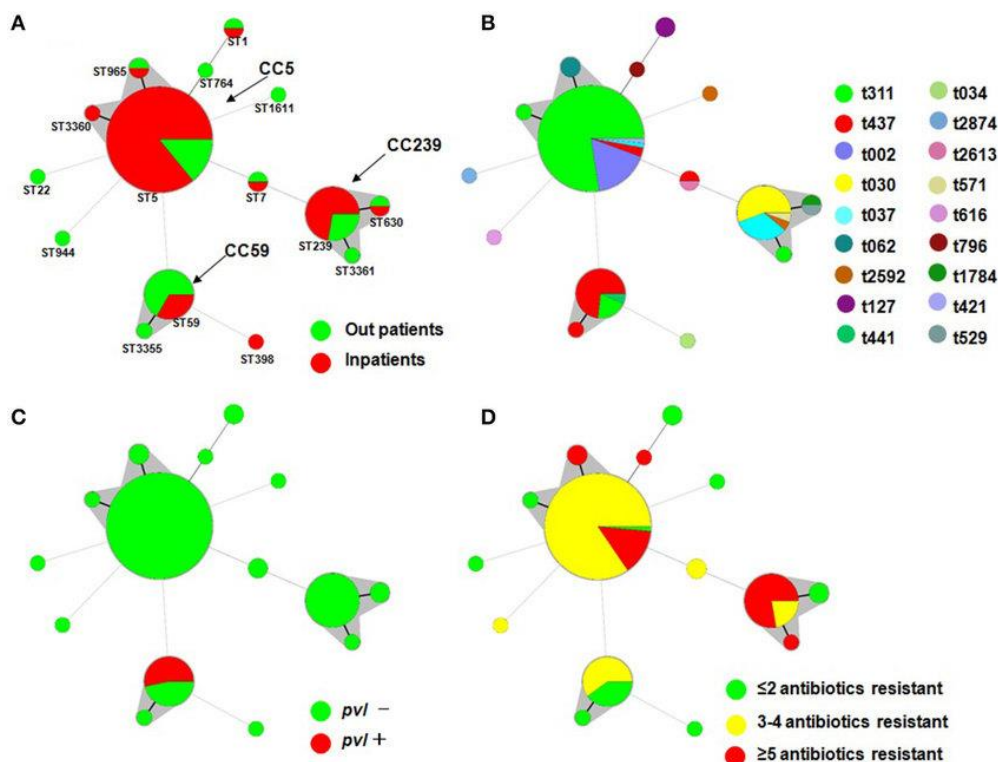


Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση της εκτομής και της ενσωμάτωσης του SCCmec στον MRSA (Uehara, 2022).

Μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία της ανίχνευσης των τύπων και υποτύπων SCCmec για την οριοθέτηση του μεταβαλλόμενου τοπίου των στελεχών που σχετίζονται με την κοινότητα (CA-MRSA) και τα στελέχη που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (HA-MRSA) (Uehara, 2022; Oliveira & Lencastre, 2002; Chongtrakool et al., 2006).

Τυποποίηση με MLST (Multilocus Sequence Typing)

Η MLST είναι μια μέθοδος για τον μοριακό χαρακτηρισμό των βακτηριακών στελεχών, που προτάθηκε το 1998 για παγκόσμια χρήση. Αρχικά εφαρμόστηκε στη *Neisseria meningitidis*, η οποία είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που αποτελεί σημαντική αιτία βακτηριακής μηνιγγίτιδας και άλλων σοβαρών λοιμώξεων, όπως η σηψαιμία.. Η MLST ήταν εφικτό να εφαρμοστεί εξαιτίας της βαθύτερης κατανόησης της βακτηριακής εξέλιξης και βιολογίας πληθυσμών, της μείωσης του κόστους της αλληλούχισης DNA και στην εξέλιξη των τεχνολογικών μέσων. Ο κύριος κορμός της μεθόδου είναι η δημιουργία βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες DNA που είναι ελεύθερα προσβάσιμες (**βλέπε εικόνα 24**). Αυτές οι βάσεις δεδομένων επιτρέπουν τη σύγκριση βακτηριακών στελεχών από διαφορετικά εργαστήρια χωρίς την ανάγκη ανταλλαγής στελεχών ή αντιδραστηρίων.



Εικόνα 24. Ανάλυση MST στελεχών MRSA βάσει δεδομένων MLST (Kong et al., 2017).

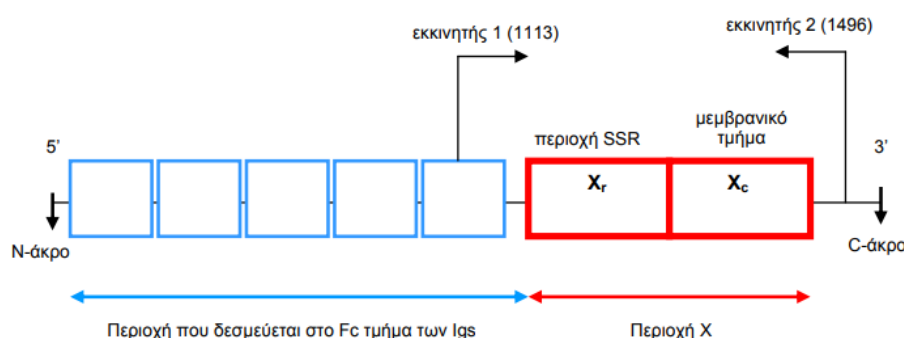
Στην εικόνα 24 κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα ST. Το μέγεθος κάθε κύκλου αντιστοιχεί στον αριθμό των απομονώσεων. Οι σχέσεις μεταξύ των στελεχών υποδεικνύονται από τις συνδέσεις μεταξύ των απομονώσεων και τα μήκη των κλάδων που τις συνδέουν. Μαύρες γραμμές που συνδέουν ζεύγη STs υποδεικνύουν ότι διαφέρουν σε ένα αλληλόμορφο (παχιές γραμμές), δύο αλληλόμορφα (λεπτές γραμμές) ή τρία έως επτά αλληλόμορφα (διακεκομμένες γραμμές, αναφορά στους ST22-ST5, ST944-ST5, ST59-ST5, ST7-ST5, ST1611-ST5, ST1-ST764, ST398-ST59 και ST7-ST239). Γκριζες ζώνες περικλείουν STs που ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (τα κλωνικά συμπλέγματα ορίστηκαν από αυτή τη συλλογή και το CC5 ήταν κυρίαρχο). Τέσσερα γραφήματα MST δημιουργήθηκαν ξεχωριστά βάσει των ακόλουθων συσχετίσεων: (A) ST έναντι ασθενών (B) ST έναντι spa (C) ST έναντι pvl και (D) ST έναντι πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα (Kong et al., 2017).

Όσον αφορά τον βακτηριόκοκκο *S. aureus*, η MLST περιλαμβάνει την αλληλούχιση μιας εσωτερικής περιοχής περίπου 450 βάσεων από επτά γονίδια μεταβολισμού. Για την τυποποίηση του MRSA, χρησιμοποιούνται συνήθως επτά γονίδια. Αυτά είναι τα ακόλουθα: *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate dehydrogenase), *glpF* (glycerol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acetyltransferase), *tpi* (triosephosphate isomerase), και *yqiL* (acetyl-CoA acetyltransferase). Απομονώνεται το γονιδιωματικό DNA από τα καλλιεργημένα βακτήρια. Το DNA των επτά επιλεγμένων γονιδίων ενισχύεται μέσω PCR (Feil & Enright, 2004). Τα προϊόντα αλληλουχούνται για να προσδιοριστούν οι αλληλουχίες DNA κάθε γονιδίου. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες συγκρίνονται με μια βάση δεδομένων που περιέχει γνωστές αλληλουχίες για τα γονίδια αυτά. Κάθε μοναδική αλληλουχία γονιδίου αποδίδεται ένας αριθμός αλληλουχίας (allele number). Ο συνδυασμός των αριθμών αλληλουχίας των επτά γονιδίων δίνει έναν μοναδικό αριθμό αλληλουχίας (Sequence Type, ST), που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του βακτηριακού στελέχους. Τα στελέχη που έχουν το ίδιο αλληλικό προφίλ βρίσκονται στον ίδιο βακτηριακό κλώνο, αντιθέτως τα βακτηριακά στελέχη που διαθέτουν πέντε από τα επτά αλληλόμορφα γονίδια όμοια βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα βακτηριακών κλώνων. Είναι εξαιρετικά απίθανο να έχουν στελέχη πανομοιότυπη αλληλουχία τυχαία, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας αλληλόμορφων. Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι καθίσταται δυνατή η σύγκριση των ευρημάτων σε διαφορετικά ερευνητικά εργαστήρια (Χίνη, 2007; Enright et al., 2000).

Spa typing

Η τυποποίηση *sprA* είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την τυποποίηση και επιδημιολογική μελέτη των στελεχών του *S. aureus* συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών (MRSA). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση της πολυμορφίας της περιοχής του γονιδίου *sprA*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη A της επιφάνειας του βακτηρίου. Το 1996, μελετητές εισήγαγαν μια νέα μέθοδο που περιλάμβανε το συνδυασμό της μελέτης τυποποίησης 58 στελεχών *S. aureus* με τη μέθοδο λυσιτυπίας, σηματοδοτώντας την πρώτη παρουσίαση αυτής της συγκεκριμένης προσέγγισης (Frenay et al,

1996). Το DNA εξάγεται από τα βακτήρια χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεθόδους εξαγωγής. Η περιοχή του γονιδίου *spr*, όπως φαίνεται την εικόνα 25, η οποία είναι η αλληλουχία ενός τμήματος μεταβλητού μεγέθους (100-400 bp) του γονιδίου της πρωτεΐνης A, ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (primers) που στόχευσαν τις συντηρημένες περιοχές του γονιδίου.



Εικόνα 25. Δομή του γονιδίου *spr*, που κωδικοποιεί το πεπτίδιο A (Χίνη, 2007).

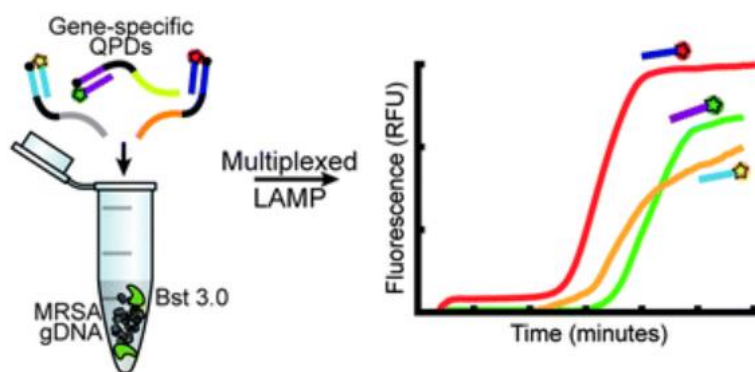
Τα προϊόντα της PCR αλληλουχούνται για να προσδιοριστεί η αλληλουχία των επαναλαμβανόμενων μονάδων της περιοχής *spr*. Η αλληλούχιση μπορεί να γίνει με κλασικές μεθόδους αλληλούχισης (Sanger sequencing) ή με νεότερες τεχνολογίες. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν αναλύονται με τη χρήση ειδικού λογισμικού και βάσεων δεδομένων, όπως το Ridom SpaServer, για την ταυτοποίηση των τύπων *spr*. Κάθε μοναδική αλληλουχία επαναλαμβανόμενων μονάδων καταχωρείται ως ένας μοναδικός *spr* τύπος. Το *spr* typing είναι μια αξιόπιστη μέθοδος που παράγει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα και είναι πιο απλή και ταχύτερη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους τυποποίησης όπως το PFGE. Τέλος, οι τύποι *spr* είναι αναγνωρισμένοι σε διεθνές επίπεδο και δίνουν τη δυνατότητα της σύγκρισης των δεδομένων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.

Ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP)

Η ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου (LAMP) αντιπροσωπεύει μια μοριακή διαγνωστική τεχνική αιχμής με σημαντική συμβολή στην ανίχνευση του MRSA. Η ικανότητα ταχείας ενίσχυσης του LAMP επιτρέπει την ταχεία παραγωγή ενισχυμένων αντιγράφων DNA, προσφέροντας μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές μεθόδους. Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές και την DNA πολυμεράση Bst για την ενίσχυση του DNA-στόχου σε σταθερή θερμοκρασία, απλοποιώντας τη διαδικασία και ενδεχομένως μειώνοντας τους χρόνους διεκπεραίωσης. Ενώ καθιερωμένες μέθοδοι όπως η PCR παραμένουν διαδεδομένες, η διερεύνηση των εφαρμογών της LAMP στο πλαίσιο της ανίχνευσης MRSA, θα μπορούσε να ενισχύσει τη διαγνωστική αποτελεσματικότητα, ιδιαίτερα σε σενάρια όπου η ταχύτητα και η ακρίβεια είναι υψίστης σημασίας. Αρχικά, τα κλινικά δείγματα συλλέγονται συνήθως από περιοχές όπως ρινικά επιχρίσματα, τραύματα ή άλλα σημεία που υπάρχουν υποψίες ότι έχουν μολυνθεί. Το γενετικό υλικό (DNA) εξάγεται από τα δείγματα χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους απομόνωσης. Γενικά, τα εμπορικά προσβάσιμα κιτ εξαγωγής DNA είναι κατάλληλα για αυτήν την εργασία (Soroka et al., 2021). Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής LAMP εξαρτάται από την προσεκτική κατασκευή των εκκινητών. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *mecA* χρησιμεύει ως ο πρωταρχικός στόχος για την ανίχνευση του MRSA λόγω της εμπλοκής του στην αντίσταση στη μεθικιλίνη. Ένα τυπικό σετ εκκινητών LAMP περιλαμβάνει τέσσερις κύριους εκκινητές, αποτελούμενους από δύο εσωτερικούς και δύο εξωτερικούς εκκινητές, που είναι ικανοί να αναγνωρίζουν έξι διακριτά τμήματα εντός του γονιδίου στόχου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικοί εκκινητές, γνωστοί ως εκκινητές βρόχου, για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της μεθόδου. Η αντίδραση LAMP είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων. Λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, συγκεκριμένα σε σταθερό εύρος θερμοκρασίας 60-65°C. Το μείγμα αντίδρασης αποτελείται κυρίως από εκκινητές που σχεδιάστηκαν ειδικά για το γονίδιο *mecA*, dNTPs, τα οποία λειτουργούν ως τα θεμελιώδη συστατικά για τη σύνθεση του DNA. Ακόμη, χρησιμοποιείται μια πολυμεράση με ισχυρή ικανότητα μετατόπισης κλώνων, όπως η Bst

πολυμεράση και τέλος απαραίτητο στοιχείο για την σωστή λειτουργία της DNA πολυμεράσης είναι το μαγνήσιο. Η δράση της πολυμεράσης διευκολύνεται από το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο δημιουργεί το βέλτιστο περιβάλλον για τη λειτουργία της (Chaouch , 2021).

Το δείγμα DNA αναμιγνύεται με όλα τα συστατικά και στη συνέχεια το μίγμα επωάζεται σε σταθερή θερμοκρασία (60-65°C) για περίπου 30-60 λεπτά. Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για την ανίχνευση της παρουσίας του ενισχυμένου προϊόντος DNA. Μια προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση χρωστικών που υφίστανται αλλαγή χρώματος όταν ενισχύεται το DNA. Μια άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές που εκπέμπουν φθορίζον σήμα όταν υπάρχει DNA. Το ενισχυμένο DNA διαχωρίζεται και ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης (**βλέπε εικόνα 26**) (Chaouch , 2021).



Εικόνα 26. Επίδειξη ποσοτικής τριπλής LAMP δοκιμασίας βασισμένη σε ανιχνευτές για την ανίχνευση του MRSA. (Nanayakkara & White, 2019).

Στη συνέχεια λαμβάνονται τα αποτελέσματα και έχουμε τις εξής περιπτώσεις:

Α. Η ταυτοποίηση του προϊόντος LAMP επιβεβαιώνει την ύπαρξη του γονιδίου *mecA*, υποδηλώνοντας την παρουσία MRSA.

B. Η απουσία του προϊόντος LAMP σημαίνει την ανυπαρξία του γονιδίου *mecA*, υποδηλώνοντας την απουσία MRSA στο δείγμα (Nanayakkara & White, 2019; Chaouch, 2021; Yang et al., 2013).

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Για δεκαετίες, οι ερευνητικές ομάδες έχουν επικεντρωθεί στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων στα νουκλεϊκά οξέα, με την ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού αλληλουχίας γονιδίων DNA και RNA. Η πρόοδος αυτών των μεθόδων ήταν σημαντική, ξεκινώντας με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ολιγονουκλεοτιδίων και τώρα καταλήγοντας στην ανάλυση εκατομμυρίων βάσεων (Heather & Chain, 2016).

Η τεχνολογία Sanger, η οποία ήταν η πρώτη προσέγγιση στον προσδιορισμό της αλληλουχίας γονιδίων, έχει πλέον αντικατασταθεί από τις πιο προηγμένες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS). Αυτές οι μέθοδοι NGS έχουν φέρει επανάσταση στην ανάλυση των γονιδιωμάτων των οργανισμών, επιτρέποντας την ταχεία εξέταση τόσο των αλληλουχιών RNA όσο και του DNA. Με το NGS, οι ερευνητές μπορούν να μελετήσουν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος που εμπλέκονται στην παραγωγή πρωτεϊνών ή στο σχηματισμό RNA (transcriptome), καθώς και στις αλληλεπιδράσεις τους. Αυτή η ανακάλυψη, που πρωτοστάτησε από την ερευνητική ομάδα του Sanger πριν από περίπου πενήντα χρόνια, έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας DNA. Με την πάροδο του χρόνου, αυτές οι μέθοδοι έχουν εξελιχθεί και η επιστημονική κοινότητα επωφελείται πλέον από τις πιο εξελιγμένες μεθόδους NGS. Αυτές οι μέθοδοι NGS χρησιμοποιούνται εκτενώς για τον προσδιορισμό αλληλουχίας DNA και RNA. Οι πρόοδοι που έγιναν στις παλαιότερες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας γονιδίων είχαν ως αποτέλεσμα την τρέχουσα μορφή αιχμής.

A. Η ανάγκη για βακτηριακή κλωνοποίηση θραυσμάτων DNA έχει εξαλειφθεί, καθώς οι τρέχουσες μέθοδοι επικεντρώνονται στη δημιουργία βιβλιοθηκών NGS χωρίς τη συμμετοχή κυττάρων.

Β. Προηγουμένως, ο αριθμός των αλληλουχιών που δημιουργήθηκαν ήταν σημαντικά μικρότερος, ενώ τώρα, χιλιάδες ή και εκατομμύρια αλληλουχίες μπορούν να παραχθούν ταυτόχρονα.

Γ. Η εφαρμογή ηλεκτροφόρησης δεν είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της γονιδιακής αλληλουχίας που λαμβάνεται στο τέλος της μεθόδου.

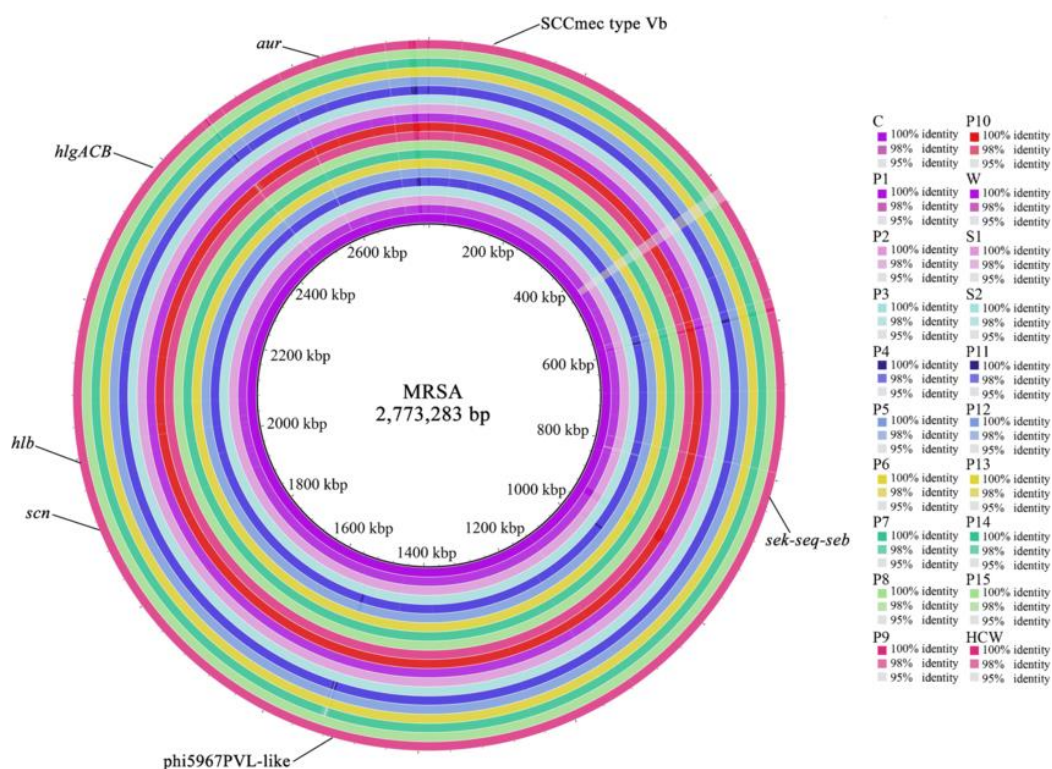
Δ. Οι τεχνολογίες NGS έχουν φέρει επανάσταση στη διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας δημιουργώντας έναν τεράστιο αριθμό αλληλουχιών, αποκαλύπτοντας τη νουκλεοτιδική τους σύνθεση και επιτρέποντας την ταχεία αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα των τεχνολογιών NGS είναι το περιορισμένο μήκος των άγνωστων αλληλουχιών, το οποίο θέτει προκλήσεις για τη συναρμολόγηση του γονιδιώματος και καθιστά αναγκαία τη δημιουργία καινοτόμων αλγορίθμων (van Dijk et al., 2014). Η διαδικασία για την εκτέλεση της μεθόδου είναι η εξής:

- ο Λήψη του κλινικού δείγματος από τον ασθενή, όπως ρινικό επίχρισμα ή δείγμα αίματος.
- ο Απομόνωση του γενετικού υλικού του βακτηρίου από το δείγμα.
- ο Το απομονωμένο DNA διασπάται σε μικρά τμήματα και αυτά εμπλουτίζονται με προσαρτητές (adapters) που επιτρέπουν τη δέσμευσή τους σε μια πλατφόρμα αλληλούχισης.
- ο Κάθε τμήμα DNA αλληλουχείται ταυτόχρονα και με αυτό τον τρόπο παίρνουμε μεγάλο όγκο δεδομένων αλληλούχισης μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, τα οποία αναλύονται με τη χρήση εργαλείων της βιοπληροφορικής. Τα δεδομένα συγκρίνονται με γνωστές βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως το *mecA*.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αλληλουχίσει ολόκληρα γονιδιώματα μέσα σε λίγες ώρες έως ημέρες, παρέχοντας ταχέα διάγνωση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες DNA και να ταυτοποιήσει ποικιλίες στελεχών με μεγάλη ακρίβεια (Köser et al., 2014).

Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) στην ανίχνευση MRSA

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική μετάδοσης και τις έρευνες επιδημίας. Όπως επισημαίνεται από τους ερευνητές, η WGS και η μέθοδος MLST έχουν συμβάλει στον εντοπισμό μοναδικών κλώνων MRSA μεταξύ συγκεκριμένων πληθυσμών, ρίχνοντας φως στα πρότυπα μετάδοσης και διευκολύνοντας στοχευμένες παρεμβάσεις. Επιπλέον, υπογραμμίζεται η χρησιμότητα του WGS στον χαρακτηρισμό απομονωμένων στελεχών MRSA από λοιμώξεις χειρουργικής περιοχής στη Γκάνα, αναδεικνύοντας την ικανότητα των μοριακών μεθόδων να αποσαφηνίζουν μοτίβα ανθεκτικότητας και γενετικές μεταλλάξεις εντός των στελεχών του MRSA (Egyir et al., 2022).



Εικόνα 27. Ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδιώματος των κλινικών και περιβαλλοντικών απομονώσεων του CA- MRSA. (Cheng et al., 2019)

Στην εικόνα 27 παρουσιάζεται κυκλικό γράφημα της γονιδιακής ποικιλομορφίας μεταξύ των 19 απομονώσεων CA-MRSA από την επιδημία και του μη σχετιζόμενου ελέγχου. Οι κυκλικοί χάρτες δημιουργήθηκαν με τον BLAST Ring IMAGE Generator, και κάθε γονιδίωμα ήταν χρωματισμένο σύμφωνα με την ταυτοποίηση κατά ζεύγη σε σχέση με το ελεγχόμενο στέλεχος C με την εξής σειρά (εσωτερικά προς εξωτερικά): C, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, W, S1, S2, P11, P12, P13, P14, P15, και HCW (Cheng et al., 2019).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με την NGS. Κλινικά δείγματα λαμβάνονται από ασθενείς που ενδέχεται να έχουν μολυνθεί με MRSA. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν ρινικά επιχρίσματα, επιχρίσματα από πληγές ή άλλα σωματικά υγρά (αίμα, ούρα). Το γενετικό υλικό απομονώνεται από τα δείγματα χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτ εκχύλισης DNA. Το εκχυλισμένο DNA διασπάται σε μικρότερα τμήματα και προετοιμάζεται για αλληλούχιση με τη προσαρμογή των adapters σε κάθε άκρο του DNA. Για τη διαδικασία της αλληλούχισης χρησιμοποιούνται προηγμένες πλατφόρμες όπως Illumina, PacBio ή Oxford Nanopore, για την ανάγνωση των βάσεων του DNA. Τα τμήματα DNA που έχουν επεξεργασθεί συναρμολογούνται και έτσι δημιουργείται μία συνεχής αλληλουχία βάσεων που αντιπροσωπεύει το πλήρες γονιδίωμα του MRSA. Τα δεδομένα που προκύπτουν αναλύονται με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων για να εντοπιστούν γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (*mecA*), καθώς και άλλα γονίδια ανθεκτικότητας και παθογένειας (Gordon et al., 2017; Köser et al., 2014).

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης MRSA

Οι ανοσολογικές μέθοδοι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανίχνευση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (MRSA), προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ανοσολογική απόκριση και την παθογένεση των λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτό το βακτήριο. Η χρήση ανοσολογικών δεικτών, όπως ο αριθμός των λεμφοκυττάρων CD3, CD4 και CD8 των T-κυττάρων, μαζί με φλεγμονώδεις δείκτες όπως η C-αντιδρώσα

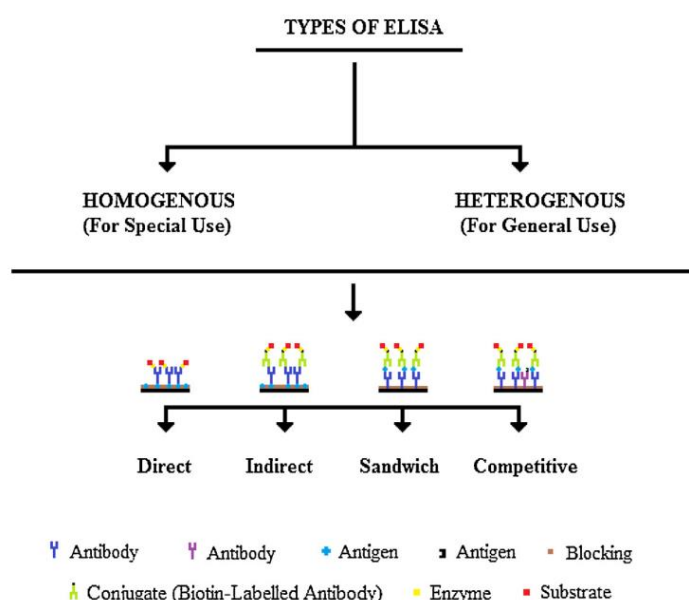
πρωτεΐνη υψηλής ευαισθησίας (hs-CRP) και η ιντερλευκίνη-6, παρέχει μια ολοκληρωμένη κατανόηση της ανοσολογικής κατάστασης του ξενιστή σε λοιμώξεις από MRSA. Μελέτες έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού του MRSA και των μεταβολών των ανοσολογικών παραγόντων σε έγκυες γυναίκες, υπογραμμίζοντας τη σημασία των ανοσολογικών αξιολογήσεων σε ευάλωτους πληθυσμούς. Η αξιοποίηση προηγμένων ανοσολογικών μεθόδων, όπως η κυτταρομετρία ροής και η ELISA, επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των ανοσολογικών αποκρίσεων στον MRSA, βοηθώντας στην έγκαιρη ανίχνευση και διαχείριση λοιμώξεων.

Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Η ανίχνευση ασθενειών επωφελείται σε μεγάλο βαθμό από την ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA). Συγκεκριμένα, στον τομέα της ανίχνευσης MRSA, η ακρίβεια της ορολογικής διάγνωσης ενισχύεται σημαντικά με τη προαναφερθείσα μέθοδο, στην οποία δεσμεύεται το αντιγόνο, τονίζοντας τη σημασία της ειδικότητας και της ευαισθησίας της. Η ευελιξία της ELISA στην προσαρμογή σε διάφορους βιοδείκτες και περιβάλλοντα υπογραμμίζει περαιτέρω τη σημασία του στη διάγνωση πολλών μολυσματικών ασθενειών. Η μέτρηση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης σε βιολογικά υγρά, καθοριστικής σημασίας για την καθοδήγηση των κλινικών γιατρών στη διάγνωση της νόσου, πραγματοποιείται με μεθόδους όπως η EIA/ELISA. Αυτές οι μέθοδοι, που συλλογικά αναφέρονται ως συνδεδεμένες με ένζυμα ανοσοδοκιμασίες, χρησιμοποιούν ένζυμα για να διευκολύνουν τη δέσμευση αντιγόνων και αντισωμάτων, με αποτέλεσμα μια αλλαγή χρώματος όταν εισάγεται ένα συζυγές ένζυμο και ένα υπόστρωμα (Stephenson et al., 2021). Τα αντισώματα και τα αντιγόνα παρουσιάζουν ένα αξιοσημείωτο επίπεδο εξειδίκευσης προς ορισμένα μόρια του σώματος, όπως πεπτίδια, ορμόνες, βιταμίνες και φάρμακα, ακόμη και όταν υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει την ακριβή μέτρηση αυτών των χημικών ενώσεων χωρίς τον κίνδυνο παρεμβολής. Στη μέθοδο ELISA, το αντιγόνο ακινητοποιείται σε μια στερεά φάση, η οποία μπορεί να είναι σωλήνες ή μικροπλάκες από πολυστυρένιο, πολυβινύλιο ή πολυπροπυλένιο. Η επιλεγμένη στερεά φάση είναι επιτακτικό να έχει την δυνατότητα να

απορροφά αποτελεσματικά τόσο το αντίσωμα όσο και το αντιγόνο, ενώ θα αποκλείει άλλες ουσίες.

Τα ένζυμα συνήθως είναι η β-γαλακτοσιδάση, η οξειδάση γλυκόζης, η υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση. Αυτή η διαδικασία διαρκεί συνήθως περίπου 30 έως 60 λεπτά για να ολοκληρωθεί. Για να σταματήσει η αντίδραση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιδραστήρια όπως το καυστικό νάτριο (NaOH), το υδροχλώριο (HCl) και το θειικό οξύ (H₂SO₄). Τα ευρήματα στη συνέχεια μετρώνται χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 400-600 nm. Οι μέθοδοι ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους: ομογενείς ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες και ετερογενείς ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες (**βλέπε εικόνα 28**). Στην περίπτωση ομογενών ενζυμικών ανοσοδοκιμασιών, τα ένζυμα απενεργοποιούνται κατά τη δέσμευση στο συγκεκριμένο αντίσωμα, εξαλείφοντας την ανάγκη για ένα στάδιο πλύσης για τον διαχωρισμό του αντιγόνου από το μέσο. Αυτή η τεχνική είναι ιδανική για τη μέτρηση χαμηλών συγκεντρώσεων χημικών ουσιών. Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι ετερογενούς ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση (Stephenson et al., 2021; Aydin, 2015).



Εικόνα 28. Είδη της μεθόδου ELISA (Aydin, 2015).

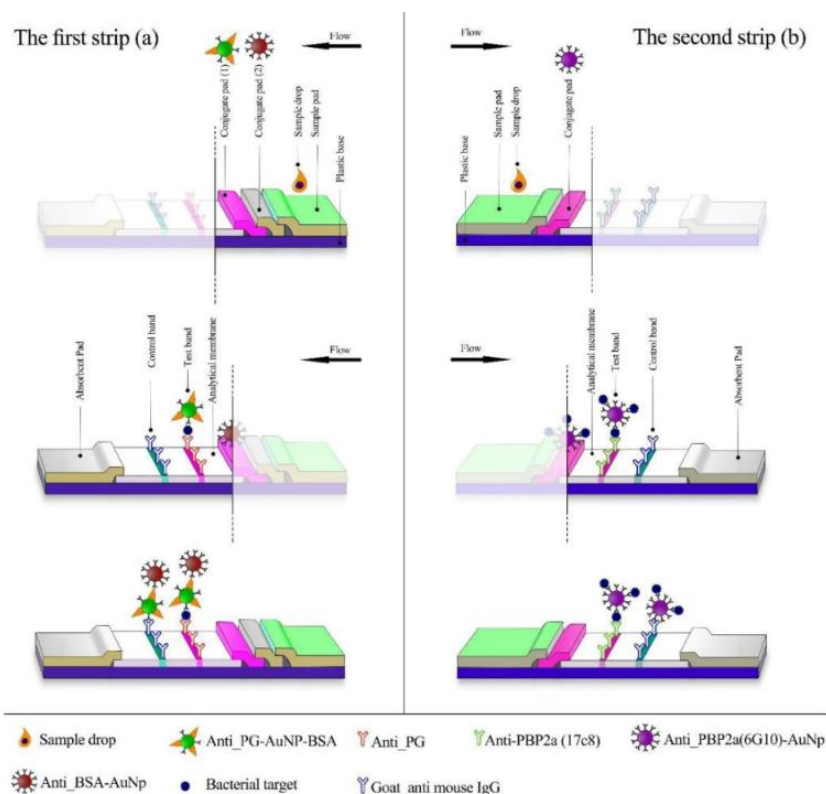
Η διαδικασία ELISA για την ανίχνευση του MRSA είναι η ακόλουθη:

Δείγματα όπως ρινικά επιχρίσματα, επιχρίσματα από πληγές ή αίμα συλλέγονται από ασθενείς που είναι ύποπτοι για μόλυνση από MRSA. Τα δείγματα υποβάλλονται σε επεξεργασία για την απομόνωση των στόχων πρωτεϊνών ή αντισωμάτων. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει λύση κυττάρων και καθαρισμό του δείγματος. Μικροπλάκες, οι οποίες είναι συνήθως 96 θέσεων επικαλύπτονται με αντιγόνα ή αντισώματα. Στην περίπτωση της ανίχνευσης πρωτεϊνών MRSA, οι πλάκες επικαλύπτονται με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες αυτές. Τα δείγματα προστίθενται στις επικαλυμμένες πλάκες και επωάζονται για να επιτραπεί η σύνδεση του στόχου (αντιγόνου ή αντισώματος) με τις επικαλυμμένες επιφάνειες. Οι πλάκες πλένονται αρκετές φορές για να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα μόρια και να μειωθεί η μη ειδική σύνδεση. Προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (π.χ., HRP - peroxidase). Αυτό το αντίσωμα θα συνδεθεί με το στόχο που δεσμεύθηκε στις πλάκες. Μετά την επώαση, οι πλάκες πλένονται ξανά για να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα-ένζυμο. Έπειτα, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο. Το ένζυμο καταλύει μια αντίδραση που παράγει χρώμα ή φθορισμό, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του στόχου στο δείγμα. Η ένταση του χρώματος ή του φθορισμού μετράται χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο πλάκας ή έναν ανιχνευτή φθορισμού. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση του στόχου (Aydin, 2015).

Δοκιμασίες πλευρικής ροής (LFIA)

Οι δοκιμασίες πλευρικής ροής προσφέρουν μια πολλά υποσχόμενη οδό στον τομέα των μεθόδων ανίχνευσης MRSA, παρέχοντας γρήγορα και φιλικά προς το χρήστη εργαλεία για επιτόπια διάγνωση. Η LFIA (Lateral Flow Immunoassay) είναι μια τεχνική ταχείας διάγνωσης που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση διαφόρων μικροοργανισμών και βιοδεικτών. Στην περίπτωση του MRSA, η LFIA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή γονιδιακών προϊόντων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη.

Τα κλινικά δείγματα για την ανίχνευση του MRSA μπορεί να περιλαμβάνουν ρινικά επιχρίσματα, επιχρίσματα από πληγές ή άλλους σωματικούς υγρούς. Τα δείγματα επεξεργάζονται και αραιώνονται κατάλληλα ώστε να είναι έτοιμα για την ανάλυση. Μια μικρή ποσότητα του δείγματος προστίθεται στο δείγμα εισόδου της κάρτας LFIA (βλέπε εικόνα 29). Το δείγμα κινείται μέσω της ταινίας LFIA λόγω τριχοειδούς δράσης. Καθώς το δείγμα κινείται κατά μήκος της ταινίας, συναντάει τα αντισώματα που είναι συνδεδεμένα με έγχρωμα νανοσφαιρίδια (Amini et al., 2023).



Εικόνα 29. Σχηματικό διάγραμμα του πολλαπλού συστήματος LFIA βασισμένο σε διπλό σύζευγμα AuNPs. α) Ταινία πεπτιδογλυκάνης (ταινία ειδική για *S. aureus*), β) Ταινία PBP2a (ταινία ειδική για MRSA) (Amini et al., 2023).

Αν το δείγμα περιέχει το στόχο (π.χ., το γονίδιο *mecA* ή την πρωτεΐνη PBP2a), αυτός θα δεσμευτεί στα αντισώματα που είναι συνδεδεμένα με τις νανοσφαίρες. Το σύμπλεγμα δείγματος-αντισώματος-νανοσφαιρών κινείται προς τη ζώνη δοκιμής όπου υπάρχουν αντισώματα στερεοποιημένα στη ταινία. Εάν το δείγμα περιέχει το στόχο, θα δημιουργηθεί μια γραμμή στην περιοχή δοκιμής ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης των έγχρωμων νανοσφαιριδίων. Μια δεύτερη γραμμή, που χρησιμεύει ως έλεγχος, θα εμφανιστεί αν η διαδικασία λειτουργεί σωστά, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή της απουσίας του στόχου στο δείγμα. Η παρουσία δύο γραμμών, μία στη ζώνη δοκιμής και μία στη ζώνη ελέγχου, υποδεικνύει ένα θετικό αποτέλεσμα για MRSA, ενώ η παρουσία μόνο της γραμμής ελέγχου υποδεικνύει ένα αρνητικό αποτέλεσμα. Η μέθοδος αυτή προσφέρει αποτελέσματα σε λίγα λεπτά, συνήθως μέσα σε 10-20 λεπτά. Οι LFIA ταινίες είναι φορητές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως κλινικές, νοσοκομεία και πεδία. Εντούτοις, παρέχει κυρίως ποιοτικά αποτελέσματα (θετικό ή αρνητικό) και δεν είναι πάντα κατάλληλη για την ακριβή ποσοτικοποίηση του στόχου (Amini et al., 2023).

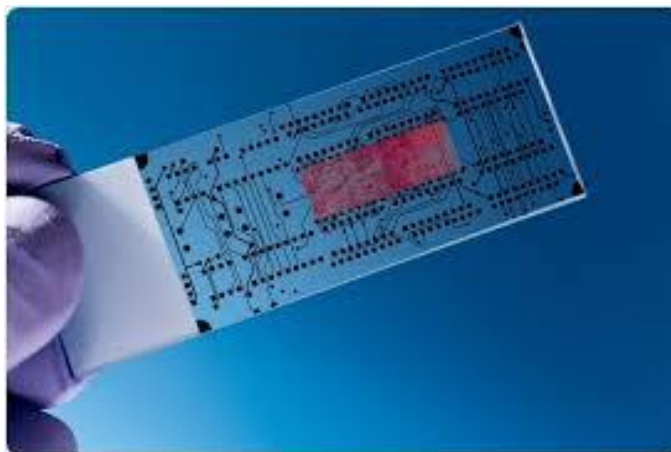
Η νανοτεχνολογία στην ανίχνευση MRSA

Η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας στην ανίχνευση χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (MRSA) ανθεκτικού στη μεθικιλίνη αποτελεί πολλά υποσχόμενη πρόοδο στην καταπολέμηση λοιμώξεων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Τα νανοσωματίδια, ιδιαίτερα τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs ή GNPs), έχουν επιδείξει ανώτερη αντιβακτηριακή δράση στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των παραδοσιακών αντιβιοτικών όπως η βανκομυκίνη έναντι κλινικών απομονωμένων στελεχών MRSA. Η σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού συζευγμένων με βανκομυκίνη (V-AuNPs) έχει δείξει συνεργιστικές βακτηριοκτόνες επιδράσεις σε όλα τα απομονωμένα στελέχη MRSA που δοκιμάστηκαν, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Επιπλέον, τα V-AuNPs εμφάνισαν ελάχιστη κυτταροτοξικότητα, υποδεικνύοντας τις δυνατότητές τους για κλινική εφαρμογή. Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση, όπως διερευνήθηκε σε ερευνητικές μελέτες σηματοδοτεί ένα κρίσιμο βήμα προς τη βελτίωση της ακρίβειας και της αποτελεσματικότητας των μεθόδων ανίχνευσης MRSA (Ahmed et al., 2023; Sambri, 2018).

Η αξιοποίηση της νανοτεχνολογίας στην ανίχνευση MRSA όχι μόνο ενισχύει τις διαγνωστικές δυνατότητες, αλλά υπογραμμίζει επίσης τη σημασία των διεπιστημονικών συνεργασιών για την προώθηση στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στις ευρύτερες συζητήσεις σχετικά με τις μεθόδους ανίχνευσης MRSA (Ahmed et al., 2023).

Μικρορευστά και Συσκευές Lab-on-a-Chip

Οι συσκευές lab-on-a-chip (**βλέπε εικόνα 30**) αντιπροσωπεύουν τεχνολογίες αιχμής που υπόσχονται σημαντικά στον τομέα της διαγνωστικής μικροβιολογίας, ιδιαίτερα στο πλαίσιο της ανίχνευσης χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA).



Εικόνα 30. Lab on a chip (LOC) είναι μια συσκευή που ενσωματώνει εργαστηριακές λειτουργίες σε νανοτσίπ (Cheriyedath, 2018).

Η εξέλιξη των παθητικά οδηγούμενων συστημάτων μικρορευστών αναδεικνύει τις δυνατότητες για ταχεία, συμπαγή και φορητά εργαστήρια σε τσιπ που μπορούν να φέρουν επανάσταση στις μεθόδους ανίχνευσης MRSA. Αξιοποιώντας την ώσμωση, την τριχοειδή δράση και την υδροστατική ροή, αυτές οι παθητικές τεχνικές μικρορευστών προσφέρουν αποτελεσματικό χειρισμό υγρών χωρίς εξωτερικές πηγές ενέργειας, ευθυγραμμιζόμενες με την ανάγκη για ταχεία και ακριβή ανίχνευση λοιμώξεων από MRSA (Narayanamurthy et al., 2020).

3.2 Τεχνικές φασματομετρίας στην ανίχνευση του MRSA

3.2.1 Εισαγωγή στη φασματομετρία

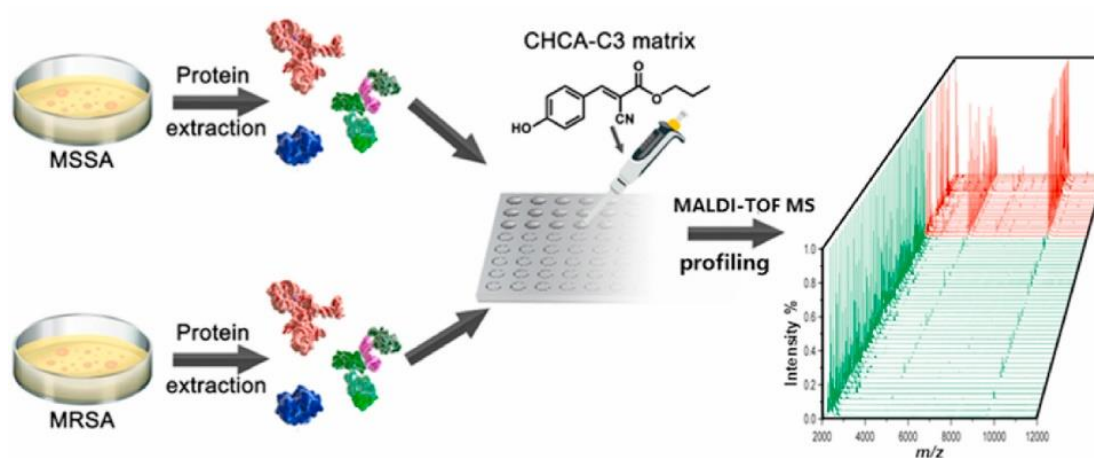
Η φασματομετρία, μια ισχυρή αναλυτική τεχνική, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανίχνευση του MRSA και στην καθοδήγηση αποτελεσματικών στρατηγικών θεραπείας. Χρησιμοποιώντας μεθόδους, όπως η φασματομετρία μάζας ανέπαφων κυττάρων σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης ιονισμού -ιονισμού εκρόφησης λέιζερ υποβοηθούμενης από μήτρα (MALDI-TOF-MS) και η υπέρυθη φασματομετρία FTIR, οι ερευνητές μπορούν να διακρίνουν τα στελέχη του βακτηρίου *S. aureus* MSSA και MRSA με εξαιρετική ακρίβεια. Αυτή η τεχνική υψηλής ανάλυσης όχι μόνο βοηθά στην έγκαιρη διάγνωση, αλλά συμβάλλει επίσης στη συνολική κατανόηση της παθογένειας και της συμπεριφοράς του MRSA.

3.2.2 Τεχνικές φασματομετρίας

MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση MRSA

Η φασματομετρία μάζας εκρόφησης / ιονισμού λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (MALDI-TOF MS) έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την ταχεία ταυτοποίηση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου (MRSA). Η μελέτη του Jiaxin Yu et al., 2022 παρουσιάζει ένα νέο μοντέλο μηχανικής μάθησης βασισμένο σε MALDI-TOF MS που ενισχύει σημαντικά την ακρίβεια και την ταχύτητα της πρόβλεψης MRSA. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη σύγκριση πρωτεϊνών από μικροβιακά κύτταρα με μια βάση δεδομένων για σκοπούς ανάλυσης. Η ικανότητα του MALDI-TOF MS να διακρίνει γρήγορα δείκτες MRSA, όπως η πρωτεΐνη UPF0337 SACOL1680, υπογραμμίζει τις δυνατότητές του για ιατρική ακριβείας και προσαρμοσμένες θεραπευτικές στρατηγικές. Η ενσωμάτωση του MALDI-TOF MS στις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης MRSA θα μπορούσε να φέρει επανάσταση στις διαγνωστικές ροές εργασίας, προσφέροντας ταχύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για τη

βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών και την καταπολέμηση της παγκόσμιας επιβάρυνσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά λοιμώξεων. Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται η μέθοδος στην ανίχνευση του MRSA.



Εικόνα 31. Η μέθοδος MALDI-TOF MS για τη διάκριση του ευαίσθητου στη μεθικιλίνη και του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (Gao et al., 2022).

Η φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης εκρόφησης / ιονισμού λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (MALDI-TOF MS) φέρνει επανάσταση στη μικροβιακή ταυτοποίηση αξιοποιώντας πρωτεομικές αρχές, μια κρίσιμη πτυχή στη σύγκριση νέων και παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης MRSA. Το MALDI-TOF MS προσφέρει ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση μικροοργανισμών, μειώνοντας τους χρόνους ανακύκλωσης και ενισχύοντας την έγκαιρη τροποποίηση των αντιβιοτικών (Gao et al., 2022; Madhavan et al., 2021).

Το δείγμα αναμιγνύεται με μια χημική μήτρα που απορροφά την ενέργεια του λέιζερ και βοηθά στην εξάχνωση και ιονισμό των μορίων του δείγματος. Η επιφάνεια του δείγματος βομβαρδίζεται με παλμούς λέιζερ, προκαλώντας την απελευθέρωση και ιονισμό των μορίων του δείγματος. Τα ιόντα στη συνέχεια επιταχύνονται σε ένα σωλήνα πτήσης και διαχωρίζονται

με βάση το λόγο μάζας-φορτίου (m/z). Τα ιόντα ανιχνεύονται και δημιουργείται ένα φάσμα που αντιπροσωπεύει την κατανομή μάζας των συστατικών του δείγματος. Αυτό το φάσμα συγκρίνεται με φάσματα από μια βάση δεδομένων αναφοράς για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Η διαδικασία ανάλυσης είναι ταχεία, επιτρέποντας την ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε λιγότερο από μία ώρα μετά την καλλιέργεια ενώ παράλληλα είναι εξαιρετικά ακριβής για την ταυτοποίηση πολλών διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Παρά τα πλεονεκτήματα της γρήγορης ανάλυσης και της πολυδιάστατης ανίχνευσης, η μέθοδος αυτή έχει υψηλό κόστος εξοπλισμού και απαιτεί εξειδικευμένη γνώση για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Schmitt et al., 2013; Clark et al., 2013).

Φασματομετρία υπέρυθρων για ανίχνευση MRSA

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη φασματοσκοπία και τη χρωματογραφία έχουν φέρει επανάσταση στις μεθόδους ανίχνευσης του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου. Συγκεκριμένα, η χρήση της υπέρυθρης φασματομετρίας έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση των στελεχών MRSA. Τα κύτταρα του MRSA παράγουν συγκεκριμένα βιοχημικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες, που μπορούν να ανιχνευθούν και να διαφοροποιηθούν από τα μοναδικά φάσματα απορρόφησης υπέρυθρου. Συγκρίνοντας τα φάσματα FTIR των στελεχών MRSA με αυτά των MSSA και άλλων βακτηρίων, μπορούν να εντοπιστούν διαφορές στα ληφθέντα φάσματα, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση του MRSA. Μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της φασματοσκοπίας υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier στην ανάλυση βιομορίων εντός των κυττάρων MRSA, ρίχνοντας φως στους μεταβολικούς μηχανισμούς και τις εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα σε λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η φασματομετρία FTIR προσφέρει έναν ταχύ τόπο ανάλυσης και παράλληλα απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, απλοποιώντας τη διαδικασία ανίχνευσης ενώ διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση του MRSA (Amiali et al., 2011).

3.3 Τεχνικές χρωματογραφίας στην ανίχνευση του MRSA

3.3.1 Εισαγωγή στη Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη σφαίρα των αναλυτικών μεθόδων, παίζοντας κεντρικό ρόλο στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό βακτηρίων, όπως ο MRSA. Αυτή η απαραίτητη τεχνική επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση σύνθετων μειγμάτων με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, καθιστώντας την βασικό εργαλείο για την αποσαφήνιση των μεταβολικών προφίλ και των πρωτεϊνικών συνθέσεων των στελεχών του συγκεκριμένου βακτηρίου. Η χρήση της φασματομετρίας μάζας υγρής χρωματογραφίας (LC-MS/MS) στην ανάλυση των μεταβολιτών του MRSA αποκάλυψε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το μεταβολισμό των αντιμικροβιακών παραγόντων και τη διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, η εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS) επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μοναδικών πρωτεϊνών σε στελέχη MRSA, τονίζοντας το ρόλο τους στη λοιμογόνο δύναμη και την αντοχή στα αντιβιοτικά.

3.3.2 Τεχνικές χρωματογραφίας

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για ανίχνευση MRSA

Η HPLC είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον διαχωρισμό, την ανάλυση και τον καθαρισμό ενώσεων σε μείγματα. Η κινητή φάση είναι ένα υγρό που ρέει μέσω της στήλης και μπορεί να αποτελείται από διαλύτη ή μείγμα διαλυτών όπως νερό, μεθανόλη ή ακετόνη. Η κινητή φάση θα επιλεγεί με βάση τη φύση του αναλύτη και το είδος της ανάλυσης. Η στατική φάση είναι κάποιο στερεό που παραμένει ακίνητο σε μια στήλη. Συνήθως αποτελείται από μικροσωματίδια πυριτίου ή πολυμερές υλικό επικαλυμμένο με χημικές ομάδες όπως το C18 για την αντίστροφη φάση.

Η αποσύνδεση των συστατικών του μείγματος βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν περισσότερο με τη στατική φάση θα υστερούν περισσότερο, ενώ οι ενώσεις που δεν αλληλεπιδρούν περισσότερο θα

περάσουν πιο γρήγορα από τη στήλη. Η αντλία παρέχει μια κινούμενη φάση στη στήλη υπό υψηλή πίεση, εξασφαλίζοντας σταθερή ροή και επαναληψιμότητα της ανάλυσης.

Η στήλη είναι το κεντρικό τμήμα του συστήματος HPLC όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Οι στήλες, ανάλογα με την εφαρμογή διατίθενται σε διάφορα μεγέθη και τύπους. Ο ανιχνευτής ανιχνεύει και μετρά τα συστατικά καθώς εξέρχονται από τη στήλη. Οι συνηθισμένοι ανιχνευτές είναι ανιχνευτές ορατών υπεριωδών ακτίνων (UV-Vis), ανιχνευτές φθορισμού και ανιχνευτές μάζας (MS).

Η έκλυση είναι η διαδικασία με την οποία τα συστατικά του μείγματος απομακρύνονται από το παχύ έντερο. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι έκλυσης: ισοκρατική έκλυση, στην οποία η σύνθεση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και η κλιμακωτή έκλυση, στην οποία η σύνθεση της κινητής φάσης αλλάζει σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός.

Ένα χρωματογράφημα είναι ένα γράφημα του σήματος ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου ή της ποσότητας εξόδου. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί στο συστατικό του μείγματος και η περιοχή κάτω από την κορυφή είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του συστατικού (Dong, 2006).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χαρακτηρίζεται ως μια ισχυρή τεχνική για την ανίχνευση ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*, προσφέροντας ενισχυμένη ειδικότητα και ευαισθησία ζωτικής σημασίας για την καταπολέμηση στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Χρησιμοποιώντας HPLC, οι ερευνητές μπορούν να διαχωρίσουν και να αναλύσουν αποτελεσματικά πολύπλοκα μείγματα μεταβολιτών ή πρωτεϊνών MRSA, επιτρέποντας την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση. Οι δυνατότητες υψηλής ανάλυσης της HPLC διευκολύνουν τη διαφοροποίηση του MRSA από τον ευαίσθητο στη μεθικιλίνη *S. aureus* μέσω μοναδικών μεταβολικών προφίλ. Η ενσωμάτωση του HPLC με συστήματα φασματομετρίας μάζας ενισχύει την ακρίβεια ανίχνευσης και την ερμηνεία των δεδομένων, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την παθογένεια του MRSA (Snyder et al., 2010; Meyer, 2013).

Αέρια χρωματογραφία για ανίχνευση MRSA

Η αέρια χρωματογραφία (GC) αναδεικνύεται ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για την ανίχνευση ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (MRSA) λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ικανότητάς της να αναλύει πτητικές ενώσεις. Στον τομέα των μεθόδων ανίχνευσης MRSA παράλληλα με τη φασματομετρία και τη χρωματογραφία, η GC προσφέρει ξεχωριστά πλεονεκτήματα. Αξιοποιώντας την GC, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν μοναδικούς πτητικούς βιοδείκτες που σχετίζονται με λοιμώξεις από MRSA, διευκολύνοντας την ταχεία και ακριβή διάγνωση. Η ισχύς διαχωρισμού της GC επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση συγκεκριμένων ενώσεων ενδεικτικών της παρουσίας MRSA, ενισχύοντας τη διαγνωστική αποτελεσματικότητα και τους χρόνους απόκρισης.

Η κινητή φάση στην GC είναι ένα αδρανές αέριο, συνήθως ήλιο, άζωτο ή υδρογόνο, το οποίο μεταφέρει το δείγμα μέσω της στήλης. Η επιλογή του αέριου φορέα εξαρτάται από την εφαρμογή και τις ιδιότητες των αναλυτών. Η στατική φάση είναι ένα λεπτό στρώμα υγρού ή στερεού υλικού που επικαλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης ή υποστηρίζεται από ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα. Η φύση της στατικής φάσης καθορίζει τον διαχωρισμό των ενώσεων βάσει της κατανομής τους μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.



Εικόνα 32. Εξοπλισμός αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας Μάζας (GC-MS) (Royal Society of Chemistry).

Το δείγμα εγχέεται στο σύστημα GC (**βλέπε εικόνα 32**), συνήθως σε αέρια μορφή ή ως υγρό που εξατμίζεται άμεσα στο σημείο έγχυσης. Η υποδοχή στην οποία εισάγεται το δείγμα θερμαίνεται για να εξασφαλίσει την πλήρη εξάτμιση του δείγματος πριν εισέλθει στη στήλη. Η στήλη είναι ο σωλήνας μέσω του οποίου ρέει η κινητή φάση και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών. Υπάρχουν δύο βασικά είδη στηλών: οι πλήρεις στήλες, που περιέχουν σωματίδια επικαλυμμένα με τη στατική φάση, και οι τριχοειδείς στήλες (capillary columns) που έχουν ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης επικαλυμμένο στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης, προσφέροντας υψηλότερη ανάλυση και ταχύτερους χρόνους διαχωρισμού.

Η στήλη τοποθετείται μέσα σε έναν φούρνο με ελεγχόμενη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία μπορεί να είναι σταθερή (ισοθερμική) ή να αυξάνεται σταδιακά (κλιμακωτή), ανάλογα με τις απαιτήσεις του διαχωρισμού. Ο ανιχνευτής καταγράφει τις ενώσεις καθώς εξέρχονται από τη στήλη και μετατρέπει το σήμα τους σε ηλεκτρικό σήμα. Κάθε κορυφή (peak) στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ένα συστατικό του δείγματος. Συνήθεις ανιχνευτές περιλαμβάνουν τον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και τον ανιχνευτή μάζας (MS).

Το χρωματογράφημα είναι η διαγραμματική απεικόνιση του σήματος του ανιχνευτή ως προς τον χρόνο. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία ένωση, και η περιοχή κάτω από την κορυφή είναι ανάλογη της ποσότητας της ένωσης (Skoog et al., 2017).

3.4 Επιπρόσθετες τεχνικές ανίχνευσης

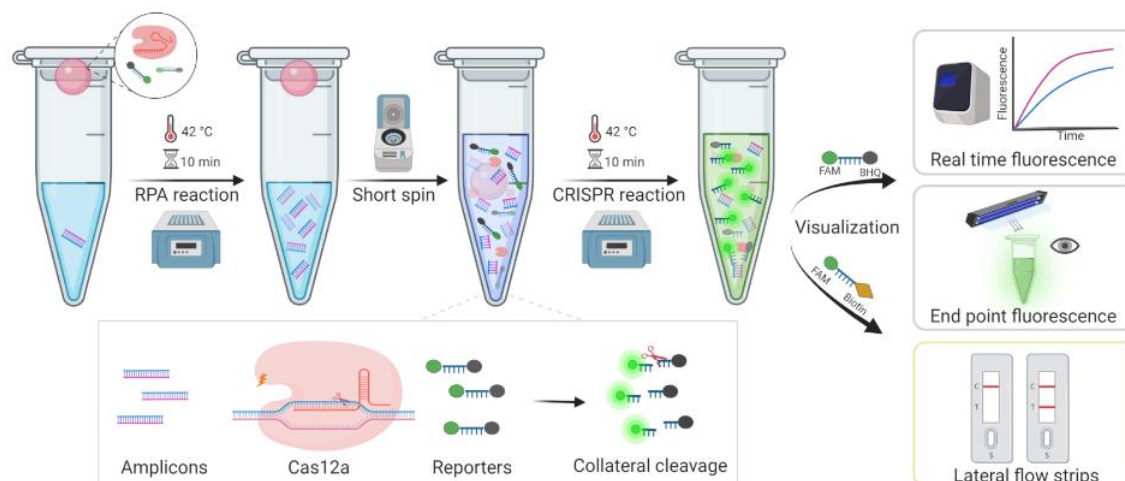
3.4.1 Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

Ο φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) αναδεικνύεται ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για την ανίχνευση του MRSA, προσφέροντας γρήγορα και ακριβή αποτελέσματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Αυτή η μέθοδος, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ακρίβειας σε διάφορους οργανισμούς που ελέγχθηκαν, συμπεριλαμβανομένου του MRSA, και μπορεί να μειώσει σημαντικά τους χρόνους ανακύκλωσης για τον εντοπισμό λοιμώξεων στην

κυκλοφορία του αίματος. Αυτή η μοριακή μέθοδος, στηρίζεται σε φθορίζοντες ανιχνευτές DNA που συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες του γονιδιώματος-στόχου και παρέχει μια άμεση απεικόνιση του παθογόνου. Το συμβατικό πρωτόκολλο υβριδισμού *in situ* φθορισμού χρησιμοποιεί τον μηχανισμό CRISPR (Clustered regularly interspace palindromic repeats), που αναφέρεται επίσης ως κανονικά ομαδοποιημένες αναδρομικές επαναλήψεις. Το CRISPR είναι ένας βακτηριακός μηχανισμός που προσφέρει μια ταχύτερη και πιο ακριβή εναλλακτική λύση στους oligo-tracers για την ανίχνευση του DNA συγκεκριμένων κυττάρων. Αποτελεί ένα πρωτεϊνικό σύστημα γνωστό ως Cas9, βοηθά στον αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων ενσωματώνοντας ένα τμήμα του γενετικού υλικού ενός εισβολέα στο δικό του DNA. Αυτό επιτρέπει στα βακτήρια να αναγνωρίσουν και να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά τον εισβολέα. Όταν το σύστημα dCas9/sgRNA-SG I χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το sgRNA (μονό οδηγό RNA), αποκτά την ικανότητα να επεξεργάζεται ειδικά το DNA-στόχο. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης αποκάλυψαν ότι το σύστημα dCas9/sgRNA-SG I που βασίζεται σε DNA-FISH δεν είναι μόνο γρήγορο, απλό και οικονομικό, αλλά και εξαιρετικά ευαίσθητο, με ικανότητα ανίχνευσης MRSA σε ελάχιστη συγκέντρωση 10 cfu/mL. (Guk et al., 2017).

3.4.2 Βιοαισθητήρες για ανίχνευση MRSA

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων μαγνητικής χαλάρωσης (C-MRS) με βάση το CRISPR/Cas12a παρουσιάζει μια νέα προσέγγιση που συγχωνεύει τεχνολογίες αιχμής για ανίχνευση MRSA υπερευαίσθητου και χωρίς ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων στα τρόφιμα, προσφέροντας σημαντική πρόοδο στις γρήγορες και ακριβείς δοκιμές. Η ενσωμάτωση της παράπλευρης δραστηριότητας του CRISPR/Cas12a, όπως φαίνεται στην εικόνα 33, επιτρέπει την ανίχνευση του MRSA σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα χωρίς να διακυβεύεται η ευαισθησία, ξεπερνώντας τις προκλήσεις που σχετίζονται με τη μεταφερόμενη μόλυνση (Wei et al., 2023).



Εικόνα 33. Η ροή εργασίας της συνολικής διαδικασίας για την ταχεία ανίχνευση του MRSA βασισμένη στη δοκιμασία RPA-CRISPR/Cas12a σε έναν σωλήνα εντός 20 λεπτών. (Li et al., 2022)

Οι βιοαισθητήρες αντιπροσωπεύουν μια τεχνολογία αιχμής στον τομέα της μικροβιακής ανίχνευσης, προσφέροντας σημαντικές εξελίξεις όσον αφορά στην ταχύτητα, στην ευαισθησία και στην ειδικότητα. Διάφοροι τύποι βιοαισθητήρων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του MRSA. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, για παράδειγμα, επιτρέπουν την ανίχνευση συγκεκριμένων βιοδεικτών ή γενετικών αλληλουχιών που σχετίζονται με τον MRSA με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Από την άλλη, οι οπτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν μεθόδους ανίχνευσης με βάση το φως για τον εντοπισμό παθογόνων MRSA, παρέχοντας παρακολούθηση και ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (Li et al., 2022).

Κεφάλαιο 4. Εφαρμογές μεθόδων ανίχνευσης του MRSA σε δείγματα βιολογικών υγρών

4.1 Σκοπός της έρευνας

Ο σκοπός της μελέτης του MRSA είναι κυρίως η ανίχνευση της παρουσίας αυτού του ανθεκτικού βακτηρίου σε βιολογικά υγρά, όπως αίμα, ούρα. Η ανίχνευση του MRSA είναι απαραίτητη για την πρόληψη και τη διαχείριση λοιμώξεων, καθώς η ανθεκτικότητα σε πολλούς τύπους αντιβιοτικών καθιστά δύσκολη τη θεραπεία. Η κατανόηση της σημασίας του παθογόνου μικροοργανισμού στην υγειονομική περίθαλψη είναι ζωτικής σημασίας λόγω των υψηλών ποσοστών νοσηρότητας και θνησιμότητας, ιδίως σε ευάλωτους πληθυσμούς ασθενών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης περιλαμβάνουν καλλιέργεια σε ειδικά μέσα που προάγουν την ανάπτυξη βακτηρίων, αλυσιδωτή πολυμεράση (PCR) για την ανίχνευση γενετικού υλικού MRSA, μεθόδους ανοσοχημικής ανίχνευσης που βασίζονται σε αντιδράσεις αντισωμάτων και προηγμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν σύγχρονα τεχνολογικά μέσα. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την έγκαιρη ανίχνευση του MRSA να οδηγήσει σε ταχεία δράση για τη θεραπεία ασθενών και την πρόληψη της εξάπλωσης του MRSA σε κοινότητες και νοσοκομεία.

4.2 Ερευνητικές μέθοδοι ανίχνευσης του MRSA

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση και ταυτοποίηση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι πολλές και ταχέως εξελισσόμενες. Στόχος τους είναι η πιο γρήγορη και με υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα ανίχνευση ώστε να προταθεί η κατάλληλη θεραπεία στους ασθενείς. Στην ενότητα αυτή θα αναλυθούν κάποιες ερευνητικές μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση και τυποποίηση του MRSA.

Εκ των προαναφερθέντων μεθόδων η PCR θεωρείται ότι είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος. Συγκεκριμένα, οι Anwar et al., το 2020 πραγματοποίησαν έρευνα σε διάφορα νοσοκομεία στη Σουλαϊμάνια σε 46 ασθενείς με διαβήτη τύπου II που παρουσίασαν λοιμώξεις στο διαβητικό

πόδι μεταξύ Απριλίου και Ιουλίου 2019. Έγινε χρήση φαινοτυπικών και γονοτυπικών μεθόδων για την ανίχνευση του MRSA. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι διάχυσης δίσκου οξακιλλίνης και σεφοξιτίνης για τη φαινοτυπική ανίχνευση και η ανάλυση των γονιδίων *mecA* και *PVL* για τη γονοτυπική ανίχνευση. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν δύο γονίδια (*mecA* και *PVL*) για να αναλυθούν με μοριακές τεχνικές. Η επανενεργοποίηση των βακτηρίων και η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα απομονωμένα στελέχη θετικών στην κοαγκουλάση *S. aureus* (MRSA και MSSA) σύμφωνα με τις συστάσεις των κατασκευαστών του Αυτοματοποιημένου κιτ εξαγωγής DNA (MagCore® Nucleic Acid Extraction Kit RBC bioscience-Ταϊβάν). Χρησιμοποιήθηκαν δύο σετ εκκινητών (primers) σε αυτή τη μελέτη, σχεδιασμένα από την MacroGen/Κορέα, και για τους δύο εκκινητές εμπρόσθιους και αντίστροφους, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Ουσιαστικά, η μελέτη περιλαμβάνει την ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων με μοριακές τεχνικές, ακολουθώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα για την εξαγωγή και ανάλυση DNA.

Gene Name	Nucleotides	Base Pair Size	References
<i>mecA-1</i> <i>mecA-2</i>	5-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3 5- CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA-3	310 bp	26
<i>LUK-PV-1</i> <i>LUK-PV-2</i>	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433 bp	21

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων *mecA*, *PVL* (Anwar et al., 2020).

Gene Cycles	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	
Time and temperature <i>mecA</i>	94 °C/4 minutes	94°C/30 seconds	60°C/30 seconds	72°C/30 seconds	72°C/5 minutes	30
Time and temperature <i>PVL</i>	94 °C/4 minutes	94°C/40 seconds	58°C/30 seconds	72°C/30 seconds	72°C/5 minutes	30

Πίνακας 3. Οι συνθήκες της real time PCR (Anwar et al., 2020).

Η παρουσία των γονιδίων *mecA* και *PVL* καθορίστηκε μεταξύ όλων των απομονωμένων στελεχών του *S. aureus*. Η multiplex PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των *mecA* και *PVL* σε όλα τα απομονωμένα στελέχη *S. aureus* χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές όπως στον πίνακα 2, αλλά με διαφορετικές συνθήκες PCR, οι οποίες απεικονίζονται στον πίνακα 4.

Gene Cycles	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	
Time and temperature <i>mecA</i> and <i>PVL</i> gene	95 °C/5 minutes	94°C/45 seconds	58°C/45 seconds	72°C/30 seconds	72°C/5 minutes	30

Πίνακας 4. Συνθήκες αλληλούχισης των γονιδίων *mecA* και *PVL* με multiplex PCR (Anwar et al., 2020).

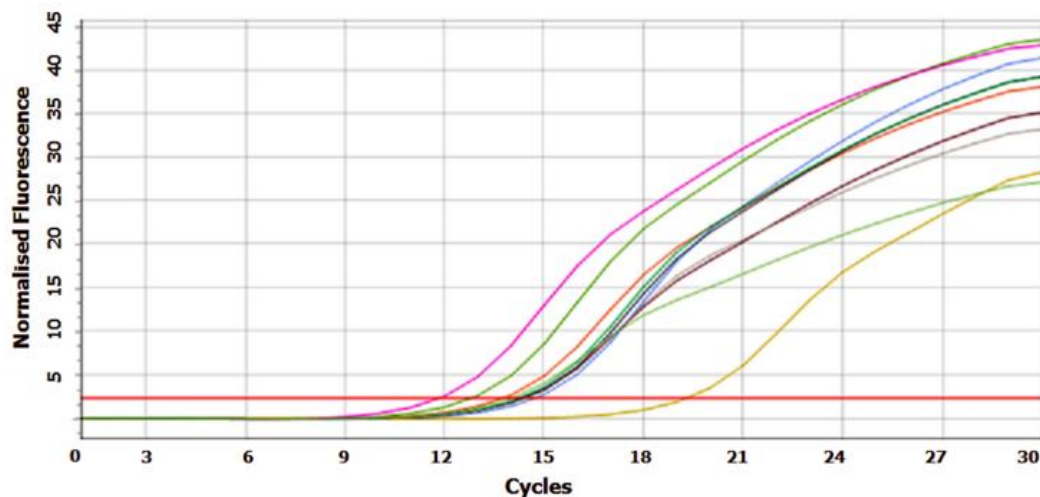
Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε ως εξής:

1. **Συλλογή Δειγμάτων:** Τα δείγματα από τις λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι συλλέχθηκαν με τη χρήση στυλεών από τους ασθενείς που παρουσίαζαν σημάδια και συμπτώματα λοίμωξης .
2. **Μεταφορά και Αποθήκευση:** Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο μέσα σε 2 ώρες ή αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 4 ώρες πριν την επεξεργασία .
3. **Καλλιέργεια και Αναγνώριση:** Τα δείγματα καλλιεργήθηκαν και αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας τις τυπικές καλλιεργητικές τεχνικές και ακολούθησε η κατάψυξη για μοριακή ανάλυση .
4. **Δοκιμή Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά:** Η ευαισθησία στα αντιβιοτικά δοκιμάστηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου Kirby–Bauer.

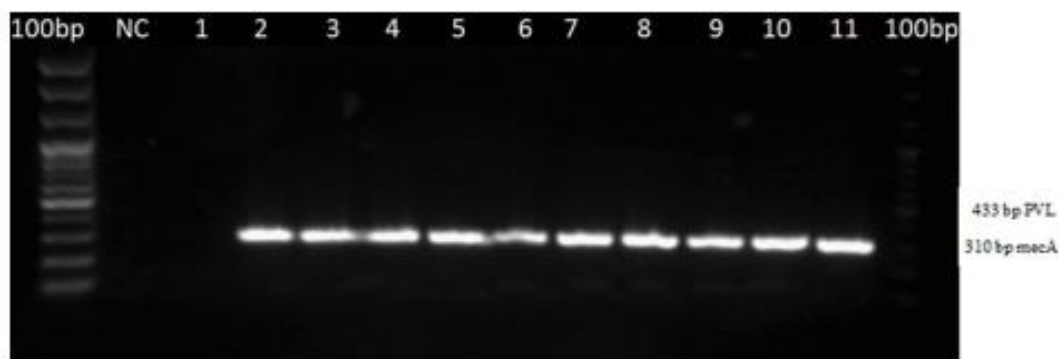
Στη μελέτη των Anwar et al., 2020 διερευνήθηκαν 46 δείγματα με στυλεό από λοιμώξεις διαβητικού ποδιού (DFI). Οι συμμετέχοντες ήταν 29 άνδρες (63%) και 17 γυναίκες (37%), με αναλογία ανδρών προς γυναίκες 1,7:1. Η ηλικία των συμμετεχόντων κυμαινόταν από 41 έως 82 ετών, με μέσο όρο 57,4 ετών (\pm SD8.6). Η πλειονότητα των δειγμάτων συλλέχθηκε από εξωτερικά ιατρεία (33, 71,7%), ενώ τα υπόλοιπα (13, 28,3%) από νοσηλεύόμενους ασθενείς.

Συνολικά, απομονώθηκαν 62 βακτήρια σύμφωνα με τη μορφολογία αποικίας από 43 ασθενείς με θετική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα έναν μέσο όρο 1,4 οργανισμών ανά δείγμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι Gram-θετικοί οργανισμοί (36, 58%) ήταν πιο διαδεδομένοι από τους Gram-αρνητικούς οργανισμούς (26, 42%). Το πιο κοινό απομονωμένο είδος μεταξύ των Gram-θετικών βακτηρίων ήταν ο *S. aureus* (24, 38,7%), βασισμένο στη μορφολογία αποικίας σε άγαρ αίματος και άγαρ άλατος μαννιτόλης. Από τα 24 απομονωμένα στελέχη *S. aureus*, παρατηρήθηκε μικτή λοίμωξη σε εννέα (37,5%), ενώ 15 (62,5%) ήταν μονομικροβιακές. Η πλειονότητα των απομονώσεων *S. aureus* προήλθε από εξωτερικούς ασθενείς (17, 70,8%), ενώ επτά (29,2%) αναφέρθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς (p value: 0,0223). Η ανάλυση των γονιδίων *mecA* και *PVL* με PCR επιβεβαίωσε την παρουσία του MRSA στα δείγματα. Η μοριακή ανίχνευση θεωρείται πιο αξιόπιστη από τις φαινοτυπικές μεθόδους, αν και αυτές εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω του χαμηλότερου κόστους και της ευκολότερης διαθεσιμότητας. Το γονίδιο *mecA* αναλύθηκε με qPCR για όλα τα απομονωμένα στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου. Μεταξύ όλων των απομονωμένων στελεχών, 10 (41,6%) ήταν θετικά για το *mecA*.

Η εικόνα 34 απεικονίζει θετικά αποτελέσματα στο διάγραμμα ενίσχυσης (πράσινος κύκλος). Η πλειονότητα των στελεχών θετικών στο *mecA* προήλθε από ασθενείς της κοινότητας (60%), ενώ τα υπόλοιπα στελέχη θετικά στο *mecA* (40%) προήλθαν από νοσηλευόμενους ασθενείς. Το γονίδιο *PVL* αναλύθηκε με qPCR για όλα τα απομονωμένα στελέχη του *S. aureus* και κανένα από τα στελέχη δεν βρέθηκε θετικό για αυτό το γονίδιο. Και τα δύο γονίδια (*mecA* και *PVL*) αναλύθηκαν με multiplex PCR για όλα τα 24 απομονωμένα στελέχη *S. aureus*. Η ενίσχυση του γονιδίου *mecA* έδειξε ένα θραύσμα 310 bp σε 10 (41,6%) δείγματα και δεν παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα για το *PVL* (βλέπε εικόνα 35).



Εικόνα 34. Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου *mecA* (Anwar et al., 2020).



Εικόνα 35. multiplex PCR γονιδίων *mecA* και PVL.

DNA 100bp, NC, αρνητικός έλεγχος, ζώνη I, αρνητικό δείγμα για τα γονίδια *mecA* και PVL, ζώνες 2-11, δείγματα με θετικό *mecA* και αρνητικό PVL (Anwar et al., 2020).

Η μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το βακτήριο MRSA είναι σημαντικός παθογόνος οργανισμός στις λοιμώξεις διαβητικού ποδιού. Με τη χρήση φαινοτυπικών μεθόδων, όπως οι δοκιμές δίσκου κεφοξιτίνης και οξακιλλίνης, το 45.8% και το 37.5% των απομονωμένων *S. aureus* ταυτοποιήθηκαν ως MRSA αντίστοιχα. Η γενετική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι το 41.6%

των απομονώσεων είχαν το γονίδιο *mecA*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (Anwar et al., 2020).

Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Daeschlein et al., 2006 οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος της multiplex PCR είναι κατάλληλη για την ταχεία αναγνώριση αρνητικών δειγμάτων για το βακτήριο MRSA απευθείας από ρινικά επιχρίσματα, αλλά τα θετικά αποτελέσματα χρειάζονται επιβεβαίωση με τη μέθοδο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στόχος τους ήταν η σύγκριση της μεθόδου καλλιέργειας με την μέθοδο της PCR. Για αυτό τον σκοπό λήφθηκαν 251 ρινικά επιχρίσματα από το ιατρικό προσωπικό και εξετάστηκαν άμεσα για MRSA χρησιμοποιώντας ένα σύστημα multiplex PCR παράλληλα με συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας. Οι δύο μέθοδοι προσδιόρισαν το 3,2% (8/251) των δειγμάτων ως θετικά για MRSA ενώ ένα δείγμα ήταν θετικό μόνο με καλλιέργεια και τρία ήταν θετικά μόνο με PCR. Η PCR προσδιόρισε σωστά 215 από τα 239 (90%) αρνητικά δείγματα επιχρισμάτων, αλλά ένα δείγμα με καλλιέργεια δεν ανιχνεύθηκε και επομένως θεωρήθηκε ψευδώς αρνητικό. Η συγκριτική ευαισθησία της καλλιέργειας σε σύγκριση με την PCR ήταν 75% (9/12) έναντι 91,6% (11/12). Παρά το γεγονός ότι η PCR είχε χαμηλή θετική προγνωστική αξία (31,4%), η αρνητική προγνωστική αξία της ήταν υψηλή (99,5%) , όπως φαίνονται στον πίνακα 5.

Parameter	PCR	(95%CI)	Culture	(95%CI)
Sensitivity	91.7%	(64.6–98.5)	75.0%	(46.8–91.1)
Specificity	90.0%	(85.5–93.2)	100%	(98.8–100)
PPV	31.4%	(18.6–48.0)	100%	(98.7–100)
NPV	99.5%	(97.4–99.9)	98.8%	(96.4–99.6)
Accuracy	90.0%	(85.7–93.2)	98.8%	(96.3–99.5)

Πίνακας 5. Διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου PCR και της συμβατικής καλλιέργειας

PPV (Positive Predictive Value): Θετική προγνωστική αξία **NPV (Negative Predictive Value):** Αρνητική προγνωστική αξία **95%CI (95% Confidence Interval):** 95% Διάστημα εμπιστοσύνης (Daeschlein et al., 2006).

Η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης και η μέθοδος Western blot είναι συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε υπερκείμενα καλλιεργειών του *S. aureus*, όπως η λευκοκιδίνη Panton–Valentine (PVL). Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί 23 σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs) ως ξεχωριστές ορολογικές οντότητες. Οι πιο κοινές είναι οι SE-A και SE-B.

Η SEA βρίσκεται πιο συχνά σε τρόφιμα και επιφάνειες προετοιμασίας τροφίμων, ενώ η SEB βρίσκεται συνήθως στο δέρμα ασθενών που έχουν μολυνθεί με *S. aureus*. η χρήση μιας απλής δοκιμασίας ELISA, η οποία θα είχε δώσει αποτέλεσμα σε λιγότερο από 3 ώρες, εξοικονομώντας σημαντικό χρόνο και χρήματα και για τα δύο μέρη. Εκτός από δείγματα τροφίμων και υπερκείμενα, η ELISA μπορεί επίσης να ανιχνεύσει SEBs σε διάφορα μέσα. Μόλις αποκλειστούν οι MRSA και MSSA, συνήθως εκτελείται μια δοκιμασία για τις τοξίνες Panton-Valentine Leukocidin (PVL) και PBP2a που συνδέονται με τον κοινοτικά επίκτητο MRSA. Οι τοξίνες PVL-S δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη των κυττάρων άμυνας του ξενιστή με συνεργιστική δράση δύο εκκριτικών πρωτεϊνών, που ονομάζονται LukS-PV και LukF-PV, οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο γονίδια ενός προφάγου που είναι ενσωματωμένος στο χρωμόσωμα του *S. aureus*. Η PVL σχετίζεται κυρίως με κοινοτικά επίκτητες μολύνσεις MRSA και διακρίνεται από τον νοσοκομειακό MRSA από τη μη πολυανθεκτικότητα και τη μεταφορά του στοιχείου τύπου IV του χρωμοσωμικού κασσετικού στοιχείου του σταφυλόκοκκου (SCCmec τύπος IV).

Η εργασία των Rojary et al., 2014 χρησιμοποιώντας dot ELISA και 3 μονοκλωνικά αντισώματα που δημιουργήθηκαν κατά της ανασυνδυασμένης PVL-S (35 KDa) έδειξε ότι μια απλή δοκιμασία ELISA μπορεί να έχει την ίδια ευαισθησία με την PCR, με τις δύο μεθόδους να επιδεικνύουν όριο ανίχνευσης (LOD) 101 CFU/mL. Συγκεκριμένα στην εργασία ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Σχεδίαση εκκινητών και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):
 - Οι εκκινητές (primers) σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Genrunner.
 - Οι αλληλουχίες γονιδίων ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI.

- Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με $1\times$ pfu buffer, 2 mM $MgSO_4$, 200 μ M dNTPs, 10 picomole από κάθε εκκινητή, 50 ng πρότυπο DNA και μία μονάδα pfu DNA πολυμεράσης.
- Η θερμοκυκλική διαδικασία περιλάμβανε την αρχική αποδιάταξη για 4 λεπτά στους $94^\circ C$, ακολουθούμενη από 30 κύκλους αποδιάταξης για 30 δευτερόλεπτα στους $94^\circ C$, προσκόλληση στους $57^\circ C$ για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση για 1 λεπτό στους $72^\circ C$, και τελική επέκταση για 10 λεπτά στους $72^\circ C$.

- Τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν σε 2% άγαρ με βρωμιούχο αιθίδιο.

2. Κλωνοποίηση

- Το προϊόν PCR καθαρίστηκε και χωνεύτηκε με BamHI και HindIII.
- Το προϊόν εισήχθη σε φορέα pRSET A που είχε προ-χωνευτεί με BamHI και HindIII.
- Το συζευγμένο προϊόν μετασχηματίστηκε σε βακτηριακά κύτταρα E. coli BL21(DE3)-pLysS.

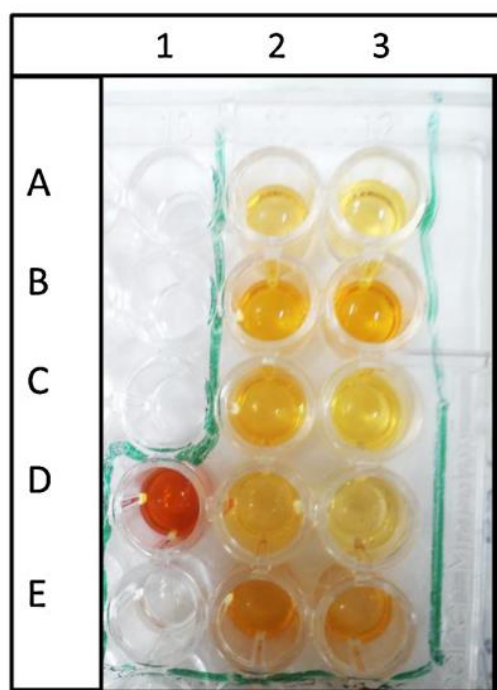
3. Έκφραση και καθαρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος:

- Τα διαμολυσμένα κύτταρα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο καλλιεργήθηκαν όλη τη νύχτα στους $37^\circ C$ σε LB ζωμό με 100 μ g/ml αμικιλίνη.
- Προστέθηκε 1 mM IPTG και τα κύτταρα επώαστηκαν στους $37^\circ C$ για 5 ώρες με έντονη ανάδευση.
- Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, λύθηκαν, και τα πρωτεϊνικά προϊόντα υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και Western blot.
- Το ανασυνδυασμένο πρωτεϊνικό προϊόν καθαρίστηκε υπό συνθήκες αποδιάταξης χρησιμοποιώντας ουρία και χηλική ρητίνη Ni-NTA, ακολουθώντας τις συστάσεις του κατασκευαστή.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός

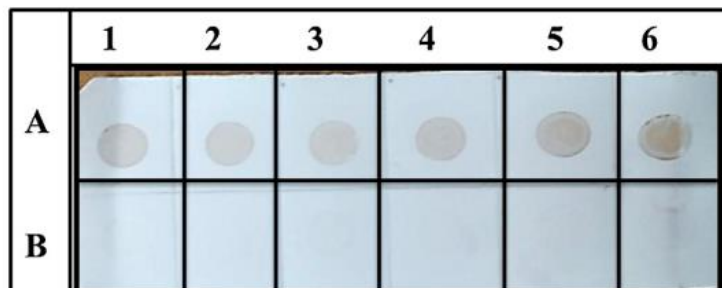
Η συγκέντρωση του καθαρισμένου πρωτεϊνικού προϊόντος προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο Lowry χρησιμοποιώντας λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA) ως πρότυπο.

Με την προαναφερθείσα διαδικασία κατέστη δυνατή η επιτυχής έκφραση και καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LukS-PV, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων (**βλέπε εικόνα 36**) και την εφαρμογή της μεθόδου dot-ELISA για την ανίχνευση του τοξίνης PVL σε στελέχη *S. aureus*, όπως για παράδειγμα φαίνεται στην εικόνα 37 (Poojary et al., 2014).



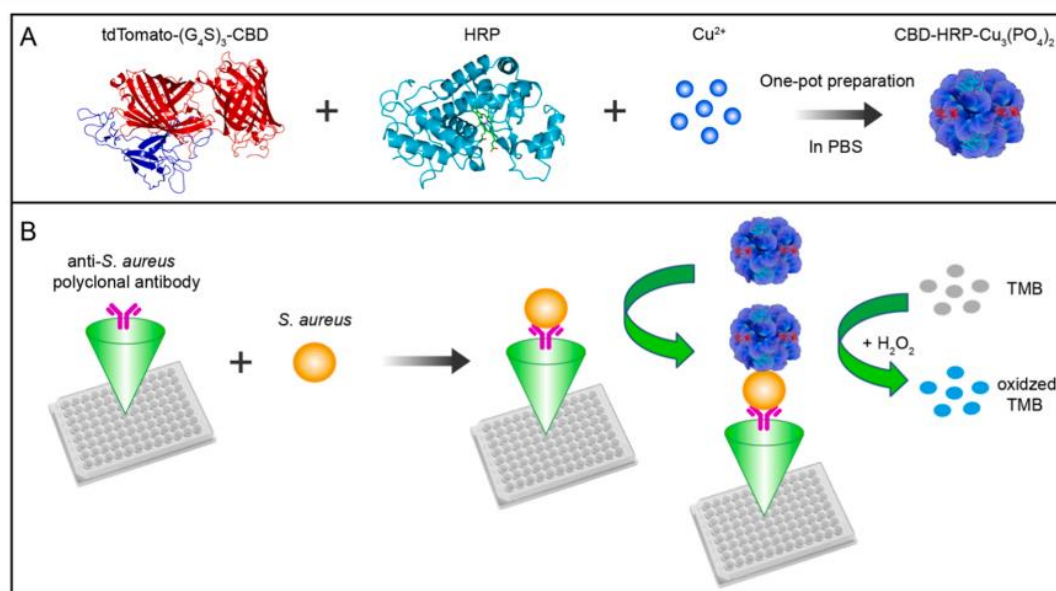
Εικόνα 36. Πλάκα ELISA που δείχνει την αντιδραστικότητα τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Τα αντισώματα είναι τα MAb1, MAb9, MAb10 κατά της πρωτεΐνης r-luk-S ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) σε διπλά πηγάδια: Ζώνη A1, B1, C1, E1, αρνητικός έλεγχος (PBS). Λωρίδα D1, θετικός έλεγχος. Ζώνη A2 & A3, MAb 9. Λωρίδα B2 & B3, MAb 9. Ζώνη C2 & C3, MAb 10. Ζώνη D2 & D3, MAb 10. Ζώνη E2 & E3, MAb 1. (Poojary et al., 2014).



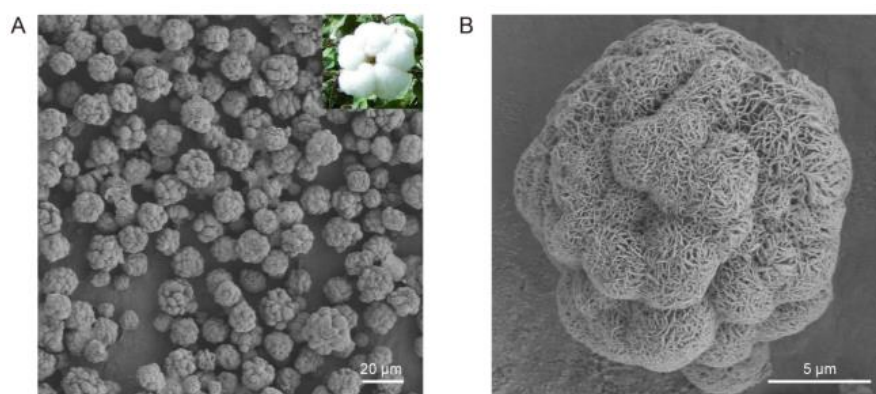
Εικόνα 37. Dot-blot ELISA που δείχνει την αντιδραστικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος MAb1 κατά των θετικών και αρνητικών στελεχών *S. aureus* για PVL (Poojary et al., 2014).

Μία πρόσφατη μελέτη των Yin et al., 2022 όμως έρχεται να φέρει επανάσταση στην ανίχνευση του *S. aureus* χρησιμοποιώντας τόσο τη νανοτεχνολογία όσο και τη μέθοδο ELISA. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου ανίχνευσης της παρουσίας του MRSA χρησιμοποιώντας μια βιο-υβριδική νανοαρχιτεκτονική προσέγγιση με ενισχυμένη ειδικότητα και ευαισθησία. Οι ερευνητές ανέπτυξαν ένα υβριδικό νανολουλούδι που αποτελείται από έναν τομέα σύνδεσης του κυτταρικού τοιχώματος (CBD), υπεροξειδάση HRP και $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Αυτό το υβριδικό νανολουλούδι συντέθηκε μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται νανοαρχιτεκτονική. Αρχικά, ένα συγκεκριμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του βακτηρίου επιστρώθηκε στα πηγάδια μιας πλάκας 96 πηγαδιών. Αυτό το αντίσωμα λειτουργεί για να ενώνεται ειδικά με τα βακτήρια *S. aureus* από τα δείγματα. Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη υβριδικών νανολουλουδιών CBD-HRP- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του αντισώματος, του *S. aureus* και του υβριδικού νανολουλουδιού σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλεγμα (βλέπε εικόνα 38).



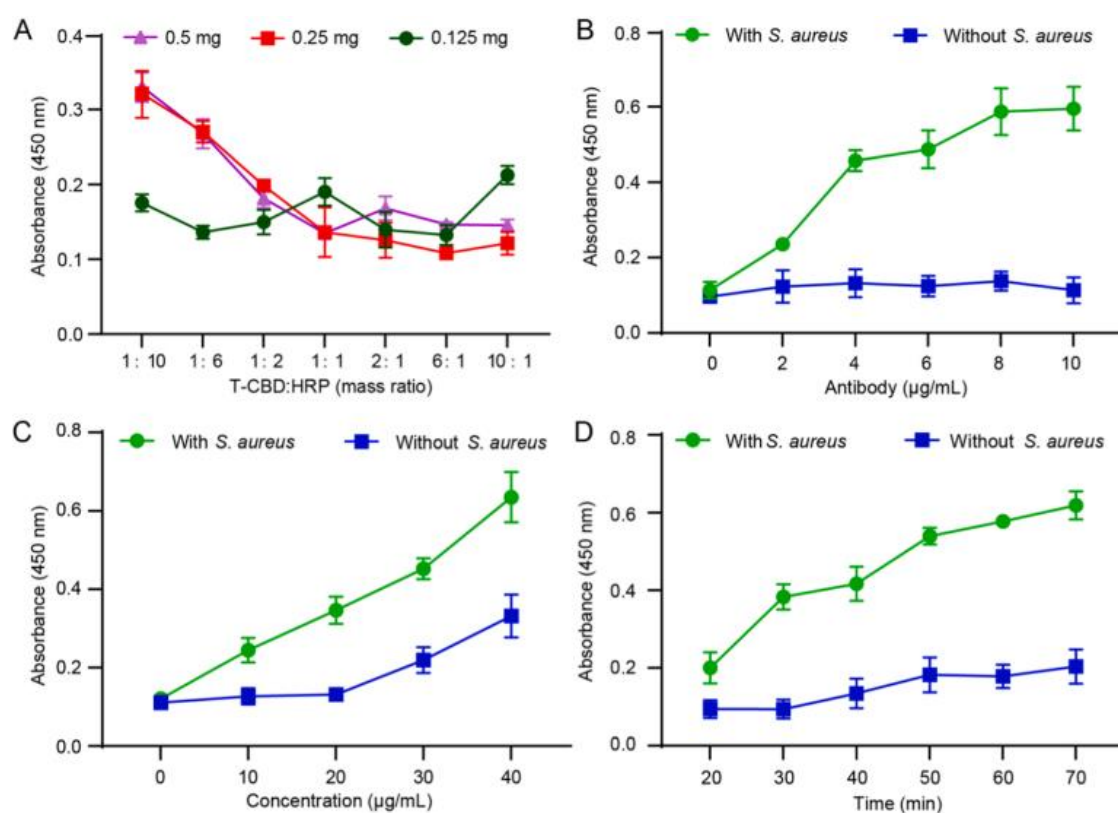
Εικόνα 38. Σχηματικό διάγραμμα ανίχνευσης *S. aureus*. (Α) Προετοιμασία νανολουλουδιών CBD-HRP-Cu₃(PO₄)₂. (Yin et al., 2022).

Η HRP στο υβριδικό νανολουλούδι καταλύει μια χρωματομετρική αντίδραση, η οποία μπορεί να μετρηθεί για να υποδείξει την παρουσία και την ποσότητα του βακτηρίου (βλέπε εικόνα 39).



Εικόνα 39. Χαρακτηρισμός των υβριδικών νανοανθών CBD-HRP-Cu₃(PO₄)₂. (Α) Εικόνες SEM των υβριδικών νανοανθών CBD-HRP-Cu₃(PO₄)₂. Στην επάνω δεξιά γωνία βρίσκεται η εικόνα ώριμου καρπού βαμβακιού. (Β) Μεγεθυμένη άποψη των υβριδικών νανοανθών CBD-HRP-Cu₃(PO₄)₂. (Yin et al., 2022).

Η μελέτη διαπίστωσε ότι αυτή η μέθοδος ELISA με βάση τα νανολουλούδια παρουσίασε υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία για την ανίχνευση του σταφυλόκοκκου. Οι ειδικές ιδιότητες σύνδεσης του CBD και οι καταλυτικές ιδιότητες της HRP συνέβαλαν στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Yin et al., 2022).



Εικόνα 40. Βελτιστοποίηση των συνθηκών ανίχνευσης ELISA με βάση τα νανοάνθη.

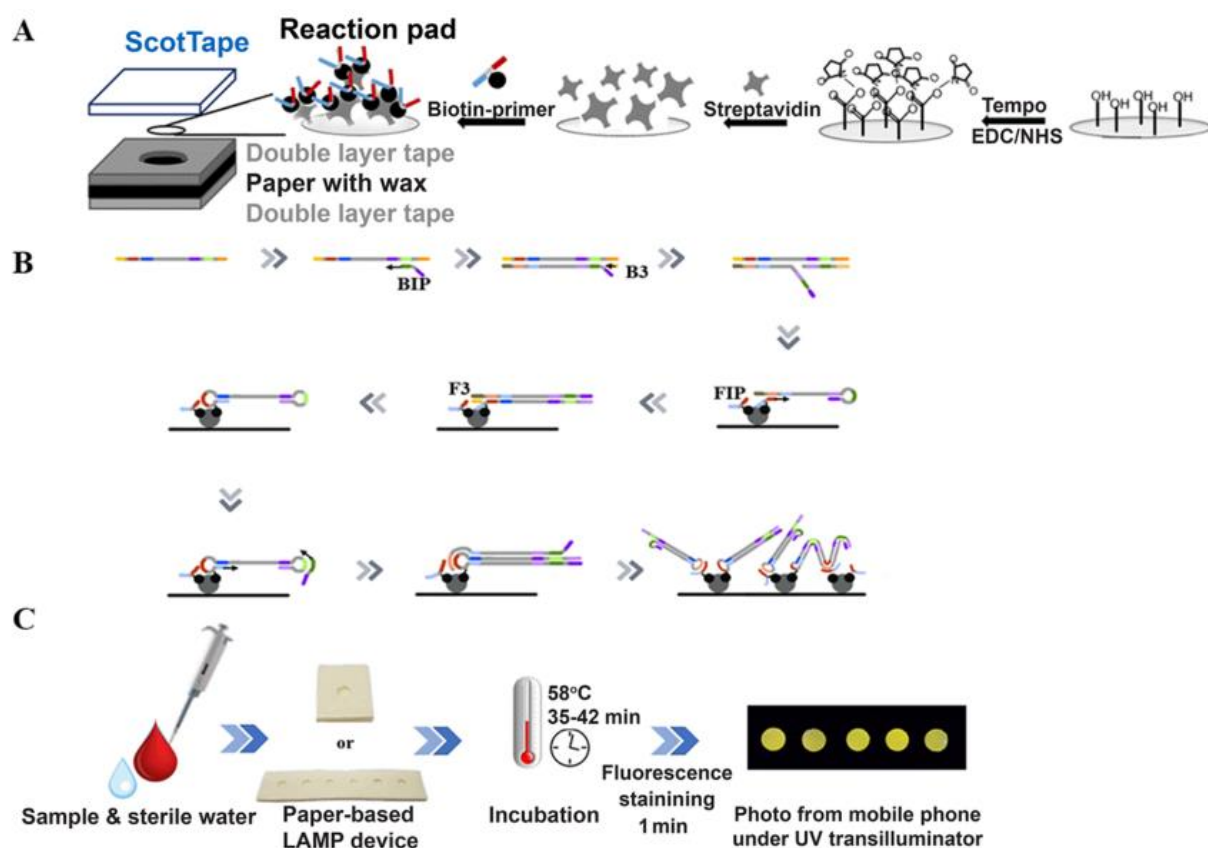
(Α) Η συνολική ποσότητα της εγκλωβισμένης πρωτεΐνης και η αναλογία CBD προς HRP κατά τη διαδικασία παρασκευής των νανοανθών. (Β) Η συγκέντρωση του αντισώματος που επικαλύπτεται στις πλάκες 96 θέσεων. (Γ) Η προστιθέμενη συγκέντρωση των νανοανθών. (Δ) Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης (Yin et al., 2022).

Οι επιστήμονες κατάφεραν να πακετάρουν τις πρωτεΐνες CBD και HRP μέσα σε ένα νανολουλούδι χρησιμοποιώντας μια απλή μέθοδο συν-καθίζησης ενός δοχείου (one-pot co-precipitation). Το νανολουλούδι αυτό έχει δύο σημαντικές λειτουργίες, την αναγνώριση του βακτηρίου και ενίσχυση του σήματος που παράγεται κατά τον εντοπισμό. Ο συνδυασμός αυτού του νανολουλουδιού με τη γνωστή μέθοδο ELISA φαίνεται να παρέχει έναν απλό, γρήγορο και ευαίσθητο τρόπο για τον εντοπισμό του *S. aureus*. Η νέα μέθοδος έχει ευρεία γραμμική απόκριση, που σημαίνει ότι μπορεί να ανιχνεύσει το βακτήριο σε συγκεντρώσεις από 101 έως 106 CFU/mL (**βλέπε εικόνα 40**) (Yin et al., 2022).

Μία διαφορετική προσέγγιση για την ανίχνευση του MRSA χρησιμοποιήθηκε στην ακόλουθη ερευνητική εργασία των Choopara et al, 2021, στην οποία πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της Ισοθερμικής Ενίσχυσης με Βρόγχους (LAMP). Η LAMP είναι μια ισοθερμική τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που επιτρέπει την ενίσχυση του DNA σε σταθερή θερμοκρασία χωρίς την ανάγκη για θερμική κυκλοφορία όπως στην PCR. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα επιθέματα της αντίδρασης. Το χαρτί που χρησιμοποιήθηκε για τα επιθέματα οξειδώθηκε και επεξεργάστηκε με διάφορα χημικά για την ενίσχυση των ιδιοτήτων δέσμευσης ενώ παράλληλα προστέθηκε στρεπταβιδίνη και ακολούθησε ξήρανση. Έπειτα, προστέθηκαν οι ειδικοί εκκινητές για τον MRSA στα επιθέματα και ξηράθηκαν. Τα μίγματα αντίδρασης LAMP περιελάμβαναν εκκινητές, MgSO₄, DNA πολυμεράση Bst, dNTPs, βεταΐνη, buffer Thermopol και SYBR Green I για την ανίχνευση του φθορισμού. Το βακτηριακό DNA εξήχθη χρησιμοποιώντας μέθοδο βρασμού. Στα επιθέματα αντίδρασης προστέθηκαν δείγματα DNA μαζί με αποστειρωμένο νερό και επωάστηκαν στους 58°C για 15-40 λεπτά. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την παρακολούθηση του φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

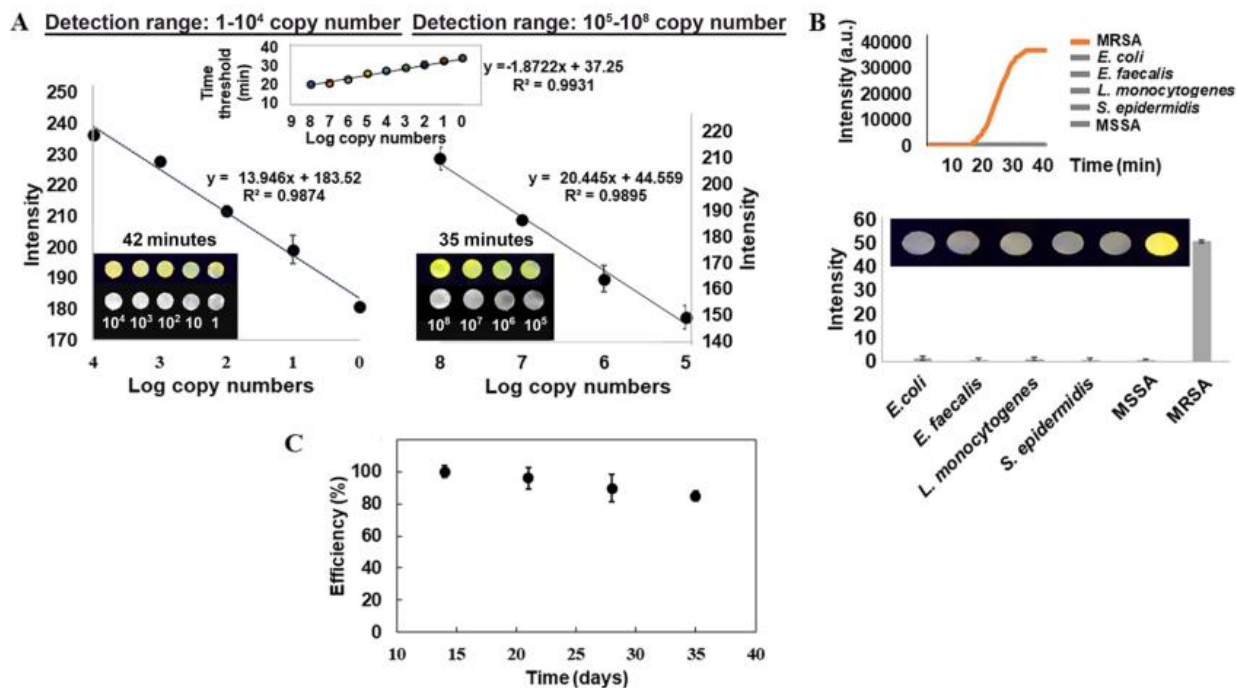
Η μέθοδος LAMP ανίχνευσε με επιτυχία τον MRSA ενισχύοντας το στοχευμένο γονίδιο παράγοντας ένα ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού και η επικύρωση της πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τόσο εργαστηριακά στελέχη όσο και κλινικά δείγματα αίματος, δείχνοντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (**βλέπε εικόνα 41**). Η μέθοδος LAMP που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη προσφέρει ένα απλό, ταχύ και χαμηλού κόστους εργαλείο για την ανίχνευση

του MRSA στο σημείο της περίθαλψης, με τη δυνατότητα ευρείας εφαρμογής σε κλινικές
διαγνωστικές και σε περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους (Choopara et al., 2021).



Εικόνα 41: Σχηματικό διάγραμμα μιας χάρτινης συσκευής LAMP.

(A) Σχεδιασμός της συσκευής και ακινητοποίηση του MRSA_FIP (βιοτινυλιωμένου), (B) Βήματα αντίδρασης LAMP πάνω στο χαρτί, και (C) επισκόπηση των βημάτων χρήσης της χάρτινης συσκευής LAMP. (Choopara et al., 2021).



Εικόνα 42. Όριο ανίχνευσης και ειδικότητα των χάρτινων επιθεμάτων LAMP για το βακτήριο MRSA (Choopara et al., 2021).

Στην εικόνα 42 παρουσιάζονται τα εξής αποτελέσματα: (Α) Αναλύσεις ποσοτικής παλινδρόμησης που προέκυψαν από τις αναγνώσεις έντασης φθορισμού των χάρτινων συσκευών LAMP χρησιμοποιώντας δεκαπλά διαλύματα DNA MRSA USA300 (10 ag έως 1 ng) ως πρότυπο, (Β) αναλύσεις ειδικότητας των χάρτινων συσκευών LAMP έναντι της πραγματικού χρόνου LAMP ως αναφοράς, χρησιμοποιώντας 1 ng από κάθε ένα από τα *E. coli*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. epidermidis* και *S. aureus Newman* (MSSA) ως αρνητικούς μάρτυρες και MRSA USA300 ως θετικό μάρτυρα και (C) σταθερότητα των χάρτινων συσκευών LAMP στην ανίχνευση 0.15 pg DNA MRSA USA300 για έως 35 ημέρες. Στο (Α), οι φωτογραφίες είναι φωτογραφίες φθορισμού (επάνω σειρά), ακολουθούμενες από τις φωτογραφίες φθορισμού μετατραπείσες σε ασπρόμαυρες (δεύτερη σειρά), και η τρίτη σειρά κάτω από τις φωτογραφίες φθορισμού και τις ασπρόμαυρες φωτογραφίες αντιπροσωπεύει

αριθμό αντιγράφων. Μετά τις αναλύσεις ποσοτικής παλινδρόμησης πραγματικού χρόνου που προσδιόρισαν τον κατάλληλο χρόνο επώασης για λογαριθμικούς αριθμούς αντιγράφων, χρησιμοποιήσαμε 42 λεπτά ως χρόνο επώασης για αριθμούς αντιγράφων $1-10^4$ και 35 λεπτά ως χρόνο επώασης για αριθμούς αντιγράφων 10^5-10^8 . Στο (B), εμφανίζεται μόνο φωτογραφία φθορισμού. Δεδομένου ότι ο MRSA είναι ένας διαδεδομένος ανθεκτικός στα φάρμακα παθογόνος οργανισμός σε νοσοκομεία και κοινότητες, η ευαισθησία και η πρακτικότητα της χάρτινης συσκευής MRSA για επιτόπια ανίχνευση είναι απαραίτητες. Τα πρωτόκολλα χρήσης είναι απλά, το αποτέλεσμα είναι γρήγορο (<1 ώρα), και το όριο ανίχνευσης είναι υπερευαίσθητο (έως και 1 αντίγραφο *mecA*). Μετά από 5 λεπτά βρασμού για την προετοιμασία του δείγματος DNA, η μόνη απαίτηση για τον χρήστη είναι μία θερμαντική συσκευή ή υδατόλουτρο. Επιπλέον, αυτό το χάρτινο επίθεμα LAMP για MRSA είχε διάρκεια ζωής σε θερμοκρασία δωματίου 35 ημέρες ή και περισσότερο υπό αποθήκευση σε θερμοκρασίες κάτω των $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η μετατροπή μιας εικόνας φθορισμού σε δεδομένα έντασης επέτρεψε επίσης την ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων του MRSA. Συνολικά, αποδείχτηκε ότι το πρωτότυπο χάρτινο επίθεμα LAMP για το βακτήριο MRSA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της θεραπείας σε επιτόπιο έλεγχο κάτι που το καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό (Choorpara et al., 2021).

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Η εξέλιξη της ανθεκτικότητας του *S. aureus* στη μεθικιλίνη παρουσιάζει ένα διαχρονικό πρόβλημα που απαιτεί συνεχείς προσπάθειες για την κατανόηση και την αντιμετώπισή του. Η μέθοδοι της καλλιέργειας και οι βιοχημικές δοκιμασίες παραμένουν αξιόπιστες μέθοδοι ανίχνευσης του MRSA, αν και συχνά απαιτούν πολύ χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων αυτών εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ακρίβεια, ωστόσο η ανάγκη για ταχύτερες λύσεις παραμένει.

Οι σύγχρονες τεχνολογίες, όπως οι μικροσυστοιχίες DNA, οι βιοαισθητήρες, και τα μονοκλωνικά αντισώματα, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμες στη βελτίωση της ταχύτητας και της ακρίβειας της ανίχνευσης του MRSA. Αυτές οι τεχνολογίες προσφέρουν δυνατότητες για γρήγορες και αξιόπιστες διαγνώσεις, μειώνοντας τον χρόνο διάγνωσης και επιτρέποντας την άμεση έναρξη της θεραπείας.

Μια ουσιαστική πτυχή της σύγκρισης νέων και παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης MRSA έγκειται στην αξιολόγηση των αντίστοιχων πλεονεκτημάτων και περιορισμών τους. Οι παραδοσιακές μέθοδοι, όπως οι τεχνικές που βασίζονται σε καλλιέργειες, αποτελούν εδώ και καιρό τον ακρογωνιαίο λίθο των μικροβιολογικών εργαστηρίων, προσφέροντας αξιοπιστία και οικονομική αποδοτικότητα. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι συχνά απαιτούν εκτεταμένες περιόδους επώασης, καθυστερώντας τις κλινικές αποφάσεις. Αντίθετα, οι νεότερες μοριακές μέθοδοι, όπως οι δοκιμασίες PCR σε πραγματικό χρόνο, παρέχουν γρήγορα και ευαίσθητα αποτελέσματα, επιτρέποντας την έγκαιρη αναγνώριση των στελεχών MRSA και καθοδηγώντας τη στοχευμένη θεραπεία. Αυτές οι προηγμένες τεχνικές προσφέρουν επίσης τη δυνατότητα διαφοροποίησης μεταξύ διαφόρων στελεχών του *S. aureus*, ενισχύοντας την ακρίβεια στις στρατηγικές θεραπείας. Ενώ η ταχύτητα και η ακρίβεια των μοριακών μεθόδων είναι αναμφισβήτητες, το υψηλότερο κόστος τους και η απαίτηση για εξειδικευμένο εξοπλισμό μπορεί να αποτελέσουν τροχοπέδη στην χρήση τους. Ως εκ τούτου, μια συνετή προσέγγιση που αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα τόσο των παραδοσιακών όσο και των νέων μεθόδων

ανίχνευσης είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση της παρακολούθησης του MRSA και της φροντίδας των ασθενών.

Οι παραδοσιακές φαινοτυπικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη τυποποίηση με άγαρ οξακιλλίνης και την καλλιέργεια σε μαννιτόλη με οξακιλλίνη. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου ODD είναι 93.5% και 83.5% αντίστοιχα, ενώ για τη μέθοδο MSA οι αντίστοιχες τιμές είναι 87.1% και 89.3% . Η διαδικασία διάγνωσης απαιτεί 48-72 ώρες. Παρά την οικονομική αποδοτικότητα και την ευκολία εφαρμογής αυτών των μεθόδων, έχουν χαμηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερο χρόνο διάγνωσης σε σχέση με τις μοριακές μεθόδους. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω της ετερογενούς έκφρασης της αντοχής στη μεθικιλίνη.

Η PCR για το γονίδιο *mecA* είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μοριακές μεθόδους ανίχνευσης του MRSA. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου PCR κυμαίνονται από 82-100% και 64-99% αντίστοιχα, με χρόνο διάγνωσης 18-24 ώρες. Η μέθοδος αυτή προσφέρει υψηλή ακρίβεια και ταχύτητα, δυνατότητα αυτοματοποίησης και λιγότερο χρόνο εργασίας, αλλά απαιτεί υψηλότερο κόστος και εξειδικευμένη τεχνική δεξιότητα.

Το μικρορευστομετρικό σύστημα παρουσιάζει ευαισθησία 96.5% και ειδικότητα 92.6%, με χρόνο διάγνωσης περίπου 35 ώρες. Παρέχει ταχεία ανίχνευση και υψηλή αναπαραγωγιμότητα, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιδημιολογική παρακολούθηση και ποσοτικοποίηση βακτηριακών φορτίων. Ωστόσο, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και υψηλότερο αρχικό κόστος.

Η μέθοδος υβριδισμού *in situ* χρησιμοποιεί ανιχνευτές DNA που υβριδίζονται με το DNA του βακτηρίου. Οι μικροσυστοιχίες DNA επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων DNA, αλλά απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και τεχνογνωσία. Οι χρωμογενείς καλλιέργειες παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία ενώ έχουν και χαμηλό κόστος. Ωστόσο τα αποτελέσματα προκύπτουν μετά την παρέλευση 24 έως 48 ωρών κάτι που τη καθιστά χρονοβόρα. Επιπλέον, χρειάζεται ειδική εργαστηριακή υποδομή και εξειδικευμένο προσωπικό.

Το Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay βασίζεται στην PCR και μπορεί να ανιχνεύσει το MRSA απευθείας από θετικές καλλιέργειες αίματος μέσα σε 50 λεπτά. Παρέχει ταχύτητα

αποτελέσματα και υψηλή ακρίβεια στην ανίχνευση του MRSA και του MSSA. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *sra* και το κόστος του είναι υψηλό.

Η μέθοδος GenomEra MRSA/SA AC είναι μια άλλη μοριακή τεχνική PCR που μπορεί να ανιχνεύσει MRSA και MSSA απευθείας από θετικές καλλιέργειες αίματος ή καλλιέργειες σε 50 λεπτά. Προσφέρει γρήγορη ανίχνευση και μειωμένο κίνδυνο επιμόλυνσης λόγω της κλειστής φύσης του συστήματος, αλλά απαιτεί υψηλό κόστος και εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η τεχνολογία Whole Genome Sequencing επιτρέπει την πλήρη αλληλούχιση του γονιδιώματος του παθογόνου και παρέχει εκτενείς πληροφορίες για τα γονίδια ανθεκτικότητας και την επιδημιολογία του MRSA. Παρέχει εκτενείς πληροφορίες για την εξέλιξη της ανθεκτικότητας και την λοιμογόνο δύναμη του MRSA, αλλά το υψηλό κόστος και οι τεχνικές απαιτήσεις της μεθόδου την καθιστούν ακόμη υπό ανάπτυξη για κλινική εφαρμογή.

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου έχει υψηλή διακριτική ικανότητα, καθιστώντας την αποτελεσματική για την ανάλυση νοσοκομειακών επιδημιών και τον εντοπισμό επιδημικών κλώνων MRSA. Ωστόσο, η PFGE είναι χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη, με περιορισμένη φορητότητα και δυσκολία στη σύγκριση αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια.

Η MLST προσφέρει υψηλή διακριτική ικανότητα και τη δυνατότητα σύγκρισης αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, η MLST είναι ακριβή και απαιτεί εξοπλισμό που δεν είναι διαθέσιμος στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια, καθιστώντας την μη κατάλληλη για ρουτίνα ελέγχου λοιμώξεων.

Η τυποποίηση *sra* είναι γρήγορη και εύχρηστη καθιστώντας την κατάλληλη για επιδημιολογικές μελέτες. Ωστόσο, είναι λιγότερο διακριτική από την PFGE και απαιτεί επιπλέον δείκτες για πλήρη ανάλυση.

Η τυποποίηση SCCmec, προσφέρει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ νοσοκομειακών (HA-MRSA) και κοινοτικών (CA-MRSA) στελεχών. Εντούτοις, η πολυπλοκότητα της τυποποίησης και η συνεχής ανακάλυψη νέων τύπων SCCmec περιπλέκουν τη χρήση του.

Η μέθοδος DNA microarray hybridization περιλαμβάνει ανιχνευτές για περίπου 180 γονίδια και 300 αλληλόμορφα του *S. aureus*, επιτρέποντας την ανίχνευση μεγάλου αριθμού γονιδιακών

τόπων ταυτόχρονα και την αξιολόγηση νέων επιδημιολογικών δεικτών. Ωστόσο, είναι πολύπλοκη και υψηλού κόστους, καθιστώντας την ακατάλληλη για κλινικές εφαρμογές.

Οι μέθοδοι spa typing και SCCmec typing λόγω της καλής διακριτικής ικανότητας τους, της ταχύτητας και τυποποίησης θεωρούνται ιδανικές. Παρά τα μειονεκτήματα, προσφέρουν αξιόπιστα αποτελέσματα και είναι παγκοσμίως εφαρμόσιμες.

Όσον αφορά στις τεχνικές φασματομετρίας και χρωματογραφίας, η MALDI-TOF MS είναι μία γρήγορη και ακριβής μέθοδος. Ο χρόνος ανάλυσης είναι μικρός ενώ διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Εντούτοις, το κόστος του εξοπλισμού αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα και παράλληλα απαιτείται εξειδικευμένη γνώση και εκπαίδευση για τη χρήση του. Επιπλέον, παρουσιάζει περιορισμένη ικανότητα διάκρισης ανάμεσα σε στελέχη MRSA και MSSA. Η μέθοδος LC-MS/MS έχει αρκετά μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση και δύνανται οι επιστήμονες να ποσοτικοποιήσουν τα ανιχνευόμενα μόρια. Ο χρόνος ανάλυσης ωστόσο είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τη MALDI-TOF και το κόστος του εξοπλισμού είναι υψηλότερο.

Η φασματομετρία FTIR είναι πιο γρήγορη και μη καταστροφική αλλά έχει χαμηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση. Η χρήση βιοαισθητήρων είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος όμως έχουν μικρότερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με τις χρωματογραφικές και φασματομετρικές τεχνικές.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι, όπως η ODD και η MSA είναι οικονομικά αποδοτικές και κατάλληλες για ρουτίνα ελέγχους, αν και έχουν μεγαλύτερο χρόνο διάγνωσης και χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις μοριακές μεθόδους. Από την άλλη, οι μοριακές μέθοδοι, ειδικά η PCR και το μικρορευστομετρικό σύστημα με SERS, παρέχουν ταχύτερα και πιο ακριβή αποτελέσματα.

Οι τεχνικές PCR και η ELISA έχουν επιδείξει εξαιρετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση και ταυτοποίηση του MRSA. Η PCR προσφέρει υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, ενώ η ELISA επιτρέπει τη γρήγορη και οικονομική ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Η έρευνα για νέες διαγνωστικές μεθόδους και η βελτίωση των υφιστάμενων είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας του MRSA. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται συνοπτικά τα

πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των σημαντικότερων μεθόδων που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση του MRSA.

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Καλλιέργεια και Βιοχημικές Δοκιμασίες	Υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία- Καλά εδραιωμένες μέθοδοι	Χρονοβόρες- Απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό- Υψηλό κόστος
Καλλιέργεια σε Χρωμογενή Μέσα	Εύκολη και άμεση ανάγνωση- Οπτική διάκριση διαφορετικών βακτηρίων	Απαιτεί 24-48 ώρες επώασης- Περιορισμένη ευαισθησία
ODD (Oxacillin Disk Diffusion)	Απλή και οικονομική μέθοδος ανίχνευσης	Μπορεί να έχει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα- Χαμηλότερη ευαισθησία
Latex Agglutination	Γρήγορη και απλή μέθοδος ανίχνευσης	Χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με άλλες μεθόδους- Μπορεί να έχει ψευδώς θετικά αποτελέσματα
Μικροσυστοιχίες DNA	Υψηλή ευαισθησία- Ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων	Υψηλό κόστος εξοπλισμού και αναλωσίμων- Απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό
Βιοαισθητήρες	Γρήγορη ανίχνευση- Μικρό μέγεθος και φορητότητα	Μπορεί να είναι ευαίσθητοι σε περιβαλλοντικούς παράγοντες
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Πολύ υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια- Γρήγορη ανίχνευση	Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό- Υψηλό κόστος

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Γρήγορη ανίχνευση- Δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα	Μπορεί να έχει χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με PCR
NGS/WGS	Υψηλή ευαισθησία και δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών παθογόνων- Ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος	Πολύ υψηλό κόστος- Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό- Χρονοβόρα ανάλυση δεδομένων
Ανάλυση MALDI-TOF MS	Πολύ γρήγορη ανίχνευση- Υψηλή ακρίβεια	Υψηλό κόστος εξοπλισμού- Απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό
PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)	Υψηλή ανάλυση γονιδιωματικών μοτίβων- Κατάλληλη για επιδημιολογικές μελέτες	Χρονοβόρα και απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό- Πολύπλοκη διαδικασία
DNA Probes	Υψηλή ειδικότητα- Μπορούν να σχεδιαστούν για συγκεκριμένα γονίδια	Απαιτούν κατάλληλη προετοιμασία δειγμάτων- Υψηλό κόστος
REA (Restriction Enzyme Analysis)	Αναλυτική μέθοδος για διαφοροποίηση στελεχών	Χρονοβόρα- Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και γνώση
Ανάλυση Πλασμιδίου	Χρήσιμη για ταυτοποίηση φορέων ανθεκτικότητας	Περιορίζεται από την παρουσία πλασμιδίων- Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)	Χρήσιμη για γενετική διαφοροποίηση στελεχών	Χρονοβόρα- Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό
MLST (Multilocus Sequence Typing)	Υψηλή ακρίβεια στην ταυτοποίηση και διαφοροποίηση στελεχών	Υψηλό κόστος και χρονοβόρα ανάλυση
FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)	Γρήγορη ανίχνευση- Μπορεί να αναγνωρίσει συγκεκριμένα γονίδια απευθείας από δείγματα	Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προετοιμασία δειγμάτων- Υψηλό κόστος
CRISPR	Εξαιρετικά ακριβής και εξειδικευμένη μέθοδος επεξεργασίας γονιδιώματος	Πολύπλοκη και απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό- Μπορεί να είναι χρονοβόρα

Πίνακας 6. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης του MRSA

Συμπερασματικά, κάθε μέθοδος έχει τα υπέρ και τα κατά της, όμως η συνεχής εξέλιξη και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που συνδυάζουν ταχύτητα, ακρίβεια και χαμηλό κόστος θα είναι καθοριστικές για την αποτελεσματική διαχείριση των λοιμώξεων από τον MRSA. Παράλληλα, η εκπαίδευση του προσωπικού υγείας στις νέες τεχνολογίες και μεθόδους ανίχνευσης είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση της διάγνωσης και της θεραπείας. Η ενσωμάτωση αυτών των τεχνολογιών στα κλινικά εργαστήρια θα πρέπει να συνοδεύεται από προγράμματα εκπαίδευσης και κατάρτισης. Η ενσωμάτωση των σύγχρονων διαγνωστικών μεθόδων στα κλινικά περιβάλλοντα μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τη διαχείριση των λοιμώξεων από MRSA. Οι γρήγορες και ακριβείς διαγνώσεις θα επιτρέψουν την έγκαιρη και στοχευμένη θεραπεία, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Η πρόοδος στις διαγνωστικές τεχνολογίες προσφέρει νέες ελπίδες για τη δημόσια υγεία, αλλά απαιτείται συνεχής προσπάθεια για την πλήρη αξιοποίησή τους.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2024, June 13). *staphylococcus*. *Encyclopedia Britannica*.
- Χίνη, Β. (2007). Detection of antibiotic resistance mechanisms, toxins production and clones correlation with *Staphylococcus aureus* clinical strains using molecular methods (Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Κλινικών Εργαστηρίων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας).
- Liu, W. T., Chen, E. Z., Yang, L., Peng, C., Wang, Q., Xu, Z., & Chen, D. Q. (2021). Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *Microbial pathogenesis*, 156, 104915. doi:0.1016/j.micpath.2021.104915
- Grema, H. A., Geidam, Y. A., Gadzama, G. B., Ameh, J. A., & Suleiman, A. (2015). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2), 79-98.
<https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2.79.98>
- UK Health Security Agency. (2023). *MRSA, MSSA, Gram-negative bacteraemia and CDI: 30-day all-cause fatality*. London: UK Health Security Agency.
- Junnila, J., Hirvioja, T., Rintala, E., Auranen, K., Rantakokko-Jalava, K., Silvola, J., Lindholm, L., Gröndahl-Yli-Hannuksela, K., Marttila, H., & Vuopio, J. (2020). Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a low endemicity area-new challenges for MRSA control. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(12), 2299–2307. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03824-9>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022, October 24). *MRSA: About MRSA*. <https://www.cdc.gov/mrsa/about/index.html>

- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Mediavilla, J. R., Chen, L., Mathema, B., & Kreiswirth, B. N. (2012). Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Current opinion in microbiology*, 15(5), 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.003>
- Microbe Investigations. (n.d.). *MRSA: Top facts*, 2024
- Otto M. (2012). Molecular insight into how MRSA is becoming increasingly dangerous. *Virulence*, 3(6), 521–523. <https://doi.org/10.4161/viru.21523>
- Ellington, M. J., Hope, R., Livermore, D. M., Kearns, A. M., Henderson, K., Cookson, B. D., Pearson, A., & Johnson, A. P. (2010). Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 446–448. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp448>
- McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Nicholson, A., Bulens, S. N., Limbago, B. M., Shearer, J. E. S., Summers, A. O., & Patel, J. B. (2010). Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3804–3811. <https://doi.org/10.1128/AAC.00351-10>
- Mehndiratta, P. L., & Bhalla, P. (2012). Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A technical review. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(1), 16-23. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.93015>
- Loeffler, A., & Lloyd, D. H. (2010). Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiology and infection*, 138(5), 595–605. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991476>
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & Mackenzie, F. M. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global

epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*, 39(4), 273–282.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>

- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Bramble, C. (2023, January 10). MRSA testing. *Lab Medicine Blog*. <https://labmedicineblog.com/2023/01/10/mrsa-testing/>
- Richardson, J. F. (1998). The Staphylococci in Human Disease. Eds. K. B. Crossley and G. L. Archer. Churchill Livingstone 1997. ISBN 0 4430 7644 8. *Epidemiology and Infection*, 120(1), 111–114
[doi:10.1017/S0950268897248387](https://doi.org/10.1017/S0950268897248387)
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., & Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3), 222–235.
[doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01573](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01573).
- Albarrag, A., Shami, A., Almutairi, A., Alsudairi, S., Aldakeel, S., & Al-Amodi, A. (2020). Prevalence and Molecular Genetics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Nursing Homes in Saudi Arabia. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2020, 2434350.
<https://doi.org/10.1155/2020/2434350>
- Khan, M., Komal, W., Saleem, M., Ahmad, N., Rafaque, Z., Kabir, S., & Rehman, A. (2020). Colonization and antibiotic resistance profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients from tertiary care hospitals. *The Journal of Microbiology and Molecular Genetics*, 1(3), 31–39.
<https://doi.org/10.52700/jmmg.v1i3.11>

- Abebe, A. A., & Birhanu, A. G. (2023). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. *Infection and drug resistance*, 16, 7641–7662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>
- Madera, S., McNeil, N., Serpa, P., Kamm, J., Pak, C., Caughell, C., Nichols, A., Dynerman, D., Li, L. M., Sanchez-Guerrero, E., Phelps, M., Detweiler, A., Neff, N., Reyes, H., Miller, S., Yokoe, D., Derisi, J., Ramirez-Avila, L., & Langelier, C. (2022). Prolonged silent carriage, genomic virulence potential and transmission between staff and patients characterize a neonatal intensive care unit (NICU) outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal Name, Volume(Issue)*, 40-46.
- MedicineNet. (n.d.). Is MRSA contagious? Retrieved June 16, 2024, from https://www.medicinenet.com/is_mrsa_contagious/article.htm
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, 3, 127. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00127>
- Devriese, L. A., Van Damme, L. R., & Fameree, L. (1972). Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 19(7), 598-605. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x>
- Karakonstantis, S., Kalemaki, D., & Lagadinou, M. (2019). In-depth review: The role of over-the-counter and prescribed drugs in the development and spread of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 337-345. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Shoaib, M., Aqib, A. I., Muzammil, I., Majeed, N., Bhutta, Z. A., Kulyar, M. F.-e.-A., Fatima, M., Zaheer, C.-N. F., Muneer, A., Murtaza, M., Kashif, M., Shafqat, F., & Pu, W. (2023). MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1067284.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>

- Purrello, S. M., Garau, J., Giamarellos, E., Mazzei, T., Pea, F., Soriano, A., & Stefani, S. (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. *Journal of global antimicrobial resistance*, 7, 178–186.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.07.010>
- Ndedy, M. M., Nyasa, R. B., Esemu, S. N., Kfusi, J. A., Kenneh, N. K., Masalla, T. N., & Ndip, L. M. (2023). A cross-sectional study on the prevalence and drug susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in the Buea Health District, Cameroon. *The Pan African medical journal*, 45, 28.
<https://doi.org/10.11604/pamj.2023.45.28.36860>
- van Belkum, A., & Rochas, O. (2018). Laboratory-Based and Point-of-Care Testing for MSSA/MRSA Detection in the Age of Whole Genome Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 9, 1437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01437>
- Dharmaratne, P., Sapugahawatte, D. N., Wang, B., Chan, C. L., Lau, K.-M., Lau, C. B. S., Fung, K. P., Ng, D. K. P., & Ip, M. (2020). Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112341. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112341>
- Tkhilaishvili, T., Wang, L., Tavanti, A., Trampuz, A., & Di Luca, M. (2020). Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulations, Staphylococcal Bacteriophage and PYO Bacteriophage, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm Formation and Control of a Systemic Infection of *Galleria mellonella* Larvae. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00110>
- Nasser, A., Azizian, R., Tabasi, M., Khezerloo, J. K., Heravi, F. S., Kalani, M. T., Sadeghifard, N., Amini, R., Pakzad, I., Radmanesh, A., & Jalilian, F. A. (2019). Specification of Bacteriophage Isolated Against Clinical Methicillin-Resistant

Staphylococcus Aureus. Osong public health and research perspectives, 10(1), 20–24.
<https://doi.org/10.24171/j.phrp.2019.10.1.05>

- Otto M. (2010). Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection. Expert opinion on biological therapy, 10(7), 1049–1059.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2010.495115>
- Brenner, B. M., & Stein, J. H. (1987). *Homeostasis of body fluids*.
- DeLaet, R. (2020). *Introduction to health & career*. Jones & Bartlett Learning.
- Altman, P. L., & Katz, D. D. (1961). *Blood and other bodily fluids*.
- Chaudhary, P., & Singh, D. (2017). *Tuberculosis: Towards appropriate diagnosis and treatment*.
- Buszewska-Forajta, M., Raczak-Gutknecht, J., Struck-Lewicka, W., Nizioł, M., Artymowicz, M., Markuszewski, M., Kordalewska, M., Matuszewski, M., & Markuszewski, M. (2022). Non-targeted three-matrix metabolomics study: Seminal fluid, urine and serum to search for possible markers of prostate cancer. *Metabolomics*.
- Batistelli, M. (2021). Liquid biopsy: A family of potential diagnostic tools. *Journal of Clinical Medicine*.
- Walker, H. K., Hall, W. D., & Hurst, J. W. (1990). *Clinical methods*. Butterworth-Heinemann.
- Malamud, D., & Tabak, L. A. (1993). *Saliva as a diagnostic fluid*. Annals of the New York Academy of Sciences.
- Ghemrawi, M., Fernandez-Tejero, N., Vaquero, L., Want, A., Carmel, J. H., & McCord, B. (2024). Examination of differences in epigenetic methylation of saliva-type samples based on collection method. *Epigenetics Research Journal*.
- Teixeira Silva, E. T., Barcelos Furtado, F., Antunes da Silveira, R., Tasca, K. I., Nonato Silva, C., Godoy, A. T., Moraes, L. N., Hong, M. V., Alves, C. G., Simões, R., Kubo, A. M. S., Fortaleza, C. M. C. B., Pereira-Lima, M. C., Valente, G. T., & Tommasini Grotto, R. M. (2024). Το σάλιο ως βιολογικό υγρό στην ανίχνευση SARS-CoV-2. *Journal of Virological Methods*, 14.

- Boado-Penas, M. del C., Eisenberg, J., & Şahin, Ş. (2022). *Pandemics: Insurance and social protection*. Springer Nature.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (29th ed., CLSI supplement M100). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Jorgensen, J. H. (Ed.), Pfaller, M. A. (Ed.), Carroll, K. C. (Ed.), & American Society for Microbiology. (2015). *Manual of clinical microbiology* (11th ed.). ASM Press. Publisher: ASM Press, Washington, DC.
- Castillo, D., Harcourt, B., Hatcher, C., Jackson, M., Katz, L., Mair, R., Mayer, L., Mcgee, L., Novak, R., Rahalison, L., Schmink, S., Theodore, M. J., Thomas, J., Vuong, J., Wang, X., Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), & World Health Organization. (2011). *Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae* (2nd ed.). World Health Organization.
- Ermenlieva, N., Todorova, T., Tcancova, G., Kostadinova, T., & Georgieva, E. (2016). Effectiveness of MRSA detection methods in the laboratory practice – A brief review. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, 22, 1157-1159. <https://doi.org/10.5272/jimab.2016222.1157>
- Szabó, J. (2014). Molecular methods in epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Advantages, disadvantages of different techniques. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 03(03). <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000147>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Ion Torrent™ Ion PGM™ System User Guide*. (2015).
- Datta, P., Gulati, N., Singla, N., Rani Vasdeva, H., Bala, K., Chander, J., & Gupta, V. (2011). Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *Journal of Medical Microbiology*, 60(11), 1613-1616.

- Ji, Y. (Ed.). (2014). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 1085). Springer.
- Micheel, V., Hogan, B., Köller, T., Warnke, P., Crusius, S., Hinz, R., Hagen, R. M., Schwarz, N. G., & Frickmann, H. (2015). Screening agars for MRSA: evaluation of a stepwise diagnostic approach with two different selective agars for the screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Military Medical Research*, 2, 18. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0046-1>
- Arshad, F., Javed, I., Mushtaq, S., & Anwer, S. (2013). Detection of MecA mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by cefoxitin disc diffusion method and latex agglutination test. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 03(03), 147. <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000147>
- Sharma, R. (2022, May 18). *Kirby Bauer disc diffusion method for antibiotic susceptibility testing*.
- LibreTexts. (n.d.). *Kirby-Bauer (Antibiotic Sensitivity)* (J. Reynolds, Author)(2024).
- Hardy Diagnostics. (2015). *Instructions for use: HardyDisk™ antimicrobial sensitivity test*.
- Mizusawa, M., & Carroll, K. C. (2020). Novel strategies for rapid identification and susceptibility testing of MRSA. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1760842>
- Sekiguchi, K., Saito, M., & Yajima, R. (1995). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with antibodies against synthetic peptides derived from penicillin-binding protein 2'. *Microbiology and immunology*, 39(8), 545–550. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02240.x>
- Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R., & Musser, J. M. (2001). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8821–8826. <https://doi.org/10.1073/pnas.161098098>

- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2004). spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of clinical microbiology*, 42(2), 792–799. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.792-799.2004>
- Hartstein, A. I., Phelps, C. L., Kwok, R. Y., & Mulligan, M. E. (1995). In vivo stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2022–2026. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.8.2022-2026.1995>
- Bard, J. (2017). Principles of Evolution: Systems, Species, and the History of Life (1st ed.). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781315227986>
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Staněk, L. (2013). Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii [Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology]. *Cesk Patol*, 49(3), 119–121.
- Hue-Roye, K., & Vege, S. (2008). Principles of PCR-based assays. *Immunohematology*, 24(4), 170–175.
- Firoozeh, F., Omid, M., Saffari, M., et al. (2020). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from four teaching hospitals in Iran: the emergence of novel MRSA clones. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00777-8>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real-time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108.
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*, 4(11), 1120–1128.

- Houghton, S. G., & Cockerill, F. R. III. (2006). Real-time PCR: overview and applications. *Surgery*, 139(1), 1-5.
- Becker, K., Pagnier, I., Schuhen, B., Wenzelburger, F., & Jonas, D. (2006). Does nasal cocolonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* promote the persistence of MRSA in cystic fibrosis patients? *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1076-1080.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4089-4094.
- McClure, J. A., Conly, J. M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W., & Zhang, K. (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1141-1144.
- Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. (n.d.). Retrieved from <https://www.applied-maths.com/applications/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge-typing>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., & Tenover, F. C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5113-5120.
- Naji, D. E., & Arif, S. K. (2024). Genotyping of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Sulaimani City using pulsed-field gel electrophoresis. *Tikrit Journal of Pure Science*, 29(1), 1-15. <https://doi.org/10.25130/tjps.v29i1.1397>

- Graves, B. (2024). Common applications of DNA microarrays.
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3), 225-235.
- Diep, B. A., & Otto, M. (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 16(8), 361-369.
- Ghosh, A., Singh, Y., Kapil, A., & Dhawan, B. (2016). Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) typing of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci (CoNS) from a tertiary care hospital in New Delhi, India. *The Indian journal of medical research*, 143(3), 365–370. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.182629>
- Uehara Y. (2022). Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086>
- Oliveira, D. C., & de Lencastre, H. (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2155-2161.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X. X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., & Hiramatsu, K. (2006). Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: A proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 1001-1012.
- Feil, E. J., & Enright, M. C. (2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 308-313.
- Kong, H., Yu, F., Zhang, W., Li, X., & Wang, H. (2017). Molecular epidemiology and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a tertiary hospital in China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00838>

- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008-1015.
- Frénay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J., & Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 15(1), 60–64. <https://doi.org/10.1007/BF01586186>
- Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR. *Cells*, 10(8), 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- Chaouch M. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Reviews in medical virology*, 31(6), e2215. <https://doi.org/10.1002/rmv.2215>
- Nanayakkara, I. A., & White, I. M. (2019). Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. *The Analyst*, 144(12), 3878–3885. <https://doi.org/10.1039/c9an00671k>
- Yang, M. J., Kim, J., Lee, J. S., & Jang, S. J. (2013). Loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *mecA* and *pvl* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 43(2), 191-195.
- Egyir, B., Dsani, E., Owusu-Nyantakyi, C., Amuasi, G. R., Owusu, F. A., Allegye-Cudjoe, E., & Addo, K. K. (2022). Antimicrobial resistance and genomic analysis of staphylococci isolated from livestock and farm attendants in Northern Ghana. *BMC microbiology*, 22(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02589-9>

- Cheng, V., Wong, S.-C., Cao, H., Chen, J., So, S., Wong, S., Sridhar, S., Yuen, K.-Y., & Ho, P.-L. (2019). Whole-genome sequencing data-based modeling for the investigation of an outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit in Hong Kong. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-03458-y>
- Gordon, N. C., & Pichon, B. (2017). Whole-genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(1), 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>
- Köser, C. U., Ellington, M. J., & Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics*, 30(9), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.003>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, 98, 236-238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9), 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Stephenson, M., Bursa, F., & Ladroue, C. (2021). Interval estimation for concentration in the ELISA setting. *Journal of immunological methods*, 497, 113122. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113122>
- Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Amini, M., Pourmand, M.R., & Faridi-Majidi, R. (2023). Development of a High Sensitive Multiplex Lateral Flow Immunoassay (LFIA) System for Rapid Detection of

Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 15, 100 - 107.

- Ahmed, Y. M., Abdelshakour, M. S., Abdo, A. M., & Sayed, N. M. (2023). Microbes and infectious diseases.
- Sambri, V. (2018). Molecular techniques for the detection of the antimicrobial sensitivity: friend or foe? *Microbiologia Medica*, 32(4).
<https://doi.org/10.4081/mm.2017.7346>
- Cheriyeath, Susha. (2021, February 02). What is Lab-on-a-Chip?. AZoLifeSciences.
- Narayanamurthy, V., Jeroish, Z. E., Bhuvaneshwari, K. S., Bayat, P., Premkumar, R., Samsurie, F., & Yusoffh, M. M. (2020). Advances in passively driven microfluidics and lab-on-chip devices: A comprehensive literature review and patent analysis. *RSC Advances*, 10, 11652-11680.
- Gao, W., Li, B., Ling, L., Zhang, L., & Yu, S. (2022). MALDI-TOF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl α -cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*, 244, 123405.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123405>
- Madhavan, A., Sachu, A., Balakrishnan, A., Vasudevan, A., Balakrishnan, S., & Vasudevapanicker, J. (2021). Comparison of PCR and phenotypic methods for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of microbiology*, 13(1), 31–36. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5489>
- Schmitt, B. H., Cunningham, S. A., Dailey, A. L., Gustafson, D. R., Patel, R., & Terrell, C. L. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry applications for the detection of antimicrobial resistance: A review of current practices. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1793–1800.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., Wolk, D. M., (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603.

- Amiali, N. M., Golding, G. R., Sedman, J., Simor, A. E., & Ismail, A. A. (2011). Rapid identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(2), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.016>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons.
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons.
- Meyer, V. R. (2013). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons.
- Royal Society of Chemistry. (n.d.). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).
- Guk, K., Keem, J. O., Hwang, S. G., Kim, H., Kang, T., Lim, E. K., & Jung, J. (2017). A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosensors & bioelectronics*, 95, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.016>
- Wei, L., Wang, Z., Wu, L., & Chen, Y. (2023). CRISPR/Cas12a-based magnetic relaxation switching biosensor for nucleic acid amplification-free and ultrasensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 222, 114984. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114984>
- Li, Y., Shi, Z., Hu, A., Cui, J., Yang, K., Liu, Y., Deng, G., Zhu, C., & Zhu, L. (2022). Rapid One-Tube RPA-CRISPR/Cas12 Detection Platform for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostics*, 12(4), 829. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040829>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2019). Textbook “principles of instrumental analysis”. *Cengage learning*.
- Anwar, K., Hussein, D., & Salih, J. (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing and Phenotypic Detection of MRSA Isolated from Diabetic Foot Infection. *International journal of general medicine*, 13, 1349–1357. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S278574>

- Daeschlein, G., Assadian, O., Daxboeck, F., & Kramer, A. (2006). Multiplex PCR-ELISA for direct detection of MRSA in nasal swabs advantageous for rapid identification of non-MRSA carriers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 25(5), 328–330.
<https://doi.org/10.1007/s10096-006-0131-1>
- Poojary, N. S., Ramlal, S., Urs, R. M., Sripathy, M. H., & Batra, H. V. (2014). Application of monoclonal antibodies generated against Pantone-Valentine Leukocidin (PVL-S) toxin for specific identification of community acquired methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Microbiological research*, 169(12), 924–930.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.002>
- Yin, W., Zhu, L., Xu, H., Tang, Q., Ma, Y., Chou, S.-H., & He, J. (2022). Bio-hybrid nanoarchitectonics of nanoflower-based ELISA method for the detection of *Staphylococcus aureus*. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology & Hubei Hongshan Laboratory, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan.
- Choopara, I., Suea-Engam, A., Teethaisong, Y., Howes, P. D., Schmelcher, M., Leelahavanichkul, A., Thunyaharn, S., Wongsawaeng, D., deMello, A. J., Dean, D., & Somboonna, N. (2021). Fluorometric Paper-Based, Loop-Mediated Isothermal Amplification Devices for Quantitative Point-of-Care Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *ACS sensors*, 6(3), 742–751.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01405>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα: Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.