ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Αποικισμός των βρεφών από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο σε σχέση με τη φορία της μητέρας τους και το αναμνηστικό νοσηλείας τους σε Μονάδα Νεογνών

Διδακτορική Διατριβή

Εμμανουήλ Χατζάκης

Παιδίατρος - Νεογνολόγος

Ηράκλειο 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γαλανάκης Εμμανουήλ. Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Παιδιατρικών Λοιμώξεων, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (επιβλέπων)

Σαμώνης Γεώργιος. Καθηγητής Παθολογίας Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σκούλικα Ευσταθία. Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γαλανάκης Εμμανουήλ: Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Παιδιατρικών Λοιμώξεων, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (επιβλέπων)

Γιαννακοπούλου Χριστίνα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γκίκας Αχιλλέας: Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κοφτερίδης Διαμαντής: Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Λιονής Χρήστος: Καθηγητής Κοινωνικής Οικογενειακής Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σαμώνης Γεώργιος: Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σκούλικα Ευσταθία: Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Νεογνών, το Μαιευτήριο του Βενιζελείου-Πανάνειου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και το Ερευνητικό Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η μελέτη ολοκληρώθηκε με την ευρηματικότητα, την καθοδήγηση, την ηθική συμπαράσταση και επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Εμμανουήλ Γαλανάκη, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Εύη Σκούλικα Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την πολύτιμη συμβολή της στην έρευνα της Μοριακής Γενετικής, την κ. Σοφία Μαράκη κλινικό Βιοπαθολόγο και Διευθύντρια ΕΣΥ του Μικροβιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και την κ. Αριάδνη Χουρδάκη, κλινικό Βιοπαθολόγο για την μεγάλη βοήθεια τους στις καλλιέργειες. Ευχαριστώ την Τριμελή Συμβουλευτική και την Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση της μελέτης. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μητέρες και τα βρέφη που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή.

Τη διδακτορική αυτή διατριβή αφιερώνω

Στην οικογένεια μου

Στον καθηγητή μου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*) είναι μείζον παθογόνο με παγκόσμια κατανομή που ευθύνεται για πολλές λοιμώξεις από ήπιες δερματικές έως σοβαρές συστηματικές. Αρχικά οι σοβαρές λοιμώξεις από *S. aureus* απασχολούσαν νοσοκομειακούς ασθενείς αλλά τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν μια ανησυχητική αύξηση σε ασθενείς χωρίς ιστορικό νοσηλείας. Η εμφάνιση του παθογόνου μικροοργανισμού αυτού στην κοινότητα έχει άμεση σχέση με την ικανότητά του να επιβιώνει σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Ο *S. aureus* θεωρείται από τα πιο προσαρμόσιμα ανθρώπινα παθογόνα με αξιοσημείωτη ικανότητα να αποκτά αντοχή στα αντιβιοτικά. Μπορεί να αποικίσει πολλά σημεία του σώματος όπως το ρινικό επιθήλιο, το φάρυγγα, το περίνεο και να παραμείνει για αρκετά χρόνια δημιουργώντας μία κατάσταση χρόνιας φορίας. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά συνέβαλαν στην αυξημένη εμφάνιση του, τόσο στους νοσοκομειακούς ασθενείς, όσο και στους ασθενείς της κοινότητας.

Την τελευταία δεκαετία, και λόγω της αύξησης των σοβαρών λοιμώξεων στην κοινότητα από ανθεκτικά στελέχη, υπάρχει μια αύξηση του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας παγκοσμίως. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που αλληλεπιδρούν μεταξύ του *S. aureus* και του ξενιστή είναι μείζονος σημασίας για μία μελλοντική στρατηγική ελέγχου των λοιμώξεων. Είναι γνωστό ότι προϋπόθεση για την εμφάνιση σταφυλοκοκκικής λοίμωξης αποτελεί ο αποικισμός του ανθρώπινου ξενιστή από τον *S. aureus* και η προσωρινή ή μόνιμη φορία του, συνήθως στις ρινικές θαλάμες.

Αφετηρία της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας υπήρξε η αυξανόμενη συχνότητα της φορίας και των λοιμώξεων από *S. aureus* στον παιδιατρικό πληθυσμό. Η υπόθεση προς διερεύνηση ήταν κατά πόσο το άμεσο περιβάλλον του βρέφους και κυρίως η μητέρα έχει σχέση με τον αποικισμό κατά την διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής, και κατ' επέκταση τη σταφυλοκοκκική λοίμωξη. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η αποτύπωση του αποικισμού του ρινικού επιθηλίου του βρέφους από τη νεογνική περίοδο έως την ηλικία των 12 μηνών σε σχέση με τη φορία της μητέρας του αφενός και το αναμνηστικό νοσηλείας τους κατά τη νεογνική περίοδο σε Νεογνολογική Κλινική ή Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος **4**

Εισαγωγή **5**

Περιεχόμενα **7**

Περίληψη **9**

Summary **14**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*S. aureus*) **19**

Σημασία του *S. aureus* στην ανθρώπινη υγεία **20**

Σταφυλοκοκκικές Λοιμώξεις **22**

Διάγνωση - Εργαστηριακή διερεύνηση **26**

Θεραπεία **27**

Φορία και κλινική σημασία **29**

Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά **33**

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικό - Μέθοδοι - Πληθυσμός - Δειγματοληψία **36**

Συνέντευξη, ενημέρωση, συμπλήρωση ερωτηματολογίου **37**

Παράμετροι της μελέτης **38**

Καλλιέργειες, ταυτοποίηση και δοκιμασίες ευαισθησίας **40**

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) **40**

Multi locus sequence typing (ST) **41**

Ανίχνευση mecA **42**

Ανίχνευση του PVL **42**

Τυποποίηση Ribo και spa **43**

Στατιστική ανάλυση **44**

Αποτελέσματα

Πληθυσμός **45**

Φορία καθ' όλη τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής **47**

Φορία στους μήνες 0, 6, και 12 **47**

Φορία στο πρώτο έτος της ζωής **49**

Ταυτόχρονη φορία στο βρέφος και τη μητέρα **51**

Γενετικοί παράγοντες **52**

Αντίσταση στα αντιβιοτικά **55**

Συζήτηση **56**

Συμπεράσματα **66**

Βιβλιογραφία **69**

Παράρτημα **85**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*S. aureus*) είναι ένα σημαντικό παθογόνο νοσοκομειακών όσο και εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων με ανησυχητικούς αυξητικούς ρυθμούς ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Μπορεί να αποικίσει πολλά ανθρώπινα σημεία του ανθρώπινου σώματος, από τα οποία το πρόσθιο ρινικό επιθήλιο αντιπροσωπεύει την κύρια θέση. Φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ της φορίας και της λοίμωξης, καθώς τα στελέχη από το ρινικό επιθήλιο και τα στελέχη της λοίμωξης μοιράζονται συχνά το ίδιο γονότυπο. Τα ποσοστά λοίμωξης είναι υψηλότερα σε φορείς, ενώ με την εκρίζωση της φορίας έχει αποδειχθεί μείωση των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Περίπου το 30% του πληθυσμού φέρει τον *S. aureus*. Το 20% είναι επίμονοι φορείς και το 10% είναι παροδικά φορείς. Ο αποικισμός των βρεφών από *S. aureus* δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς ενώ οι μελέτες για τη χρονική στιγμή και τη πηγή του αποικισμού των βρεφών σε παγκόσμιο επίπεδο είναι λίγες.

Η αντίσταση στην μεθικιλλίνη εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε νοσοκομειακούς ασθενείς το 1961. Έκτοτε, ο ανθεκτικός στη μεθικιλλίνη *S. aureus* (MRSA), είναι ευρέως διαδεδομένος σε νοσοκομεία και μονάδες εντατικής θεραπείας σε όλο τον κόσμο. Αυτό το υψηλό επίπεδο αντίστασης προκύπτει από την παρουσία του γονιδίου mecA που κωδικοποιεί την παραγωγή της πρωτεΐνη PBP2a, η οποία έχει μειωμένη χημική συγγένεια με τα περισσότερα βήτα-λακταμικά αντιβιοτικά. Ο MRSA είναι πλέον μία από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριακής νοσοκομειακής λοίμωξης, αντιπροσωπεύοντας το 40-70% των λοιμώξεων στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Κατά την τελευταία δεκαετία νέα στελέχη του MRSA (CA-MRSA) έχουν εμφανιστεί στην κοινότητα, προκαλώντας επιθετικές μολύνσεις σε νέους, κατά τα άλλα υγιείς

ανθρώπους. Αρκετά στελέχη *S. aureus* παράγουν την πρωτεΐνη Panton Valentine Leukocidin (PVL), η οποία σχετίζεται με τη ικανότητα να είναι διεισδυτικά, να παράγουν αποστήματα με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνήσει τους παράγοντες που σχετίζονται με τον αποικισμό στα βρέφη τον πρώτο χρόνο ζωής, τη μοριακή επιδημιολογία καθώς και την αντίσταση στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα βρέφη και τις μητέρες τους σε μια σαφώς καθορισμένη έκταση, τη Κρήτη.

Η ομάδα μελέτης αποτελούνταν από 128 νεογνά και τις μητέρες τους που γεννήθηκαν στο Βενιζέλειο-Πανάνειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης από τον Νοέμβριο 2005 έως τον Μάιο 2006. Από τα 128 νεογνά τα 98 προέρχονταν από την μαιευτική κλινική και ήταν υγιή, ενώ τα 30 προέρχονταν από τη Μονάδα Νεογνών. Ρινικά επιχρίσματα ελήφθησαν από τις μητέρες και τα βρέφη τους πριν από την έξοδο και μετά από 6 και 12 μήνες ενώ ερευνήθηκαν μια σειρά από παράγοντες από το περιβάλλον που σχετίζονται με το βρέφος, τη μητέρα, τον πατέρα και την οικογένεια. Η αναγνώριση του *S. aureus* έγινε με βάση την μορφολογία των αποικιών, την χρώση κατά Gram, τη δοκιμασία καταλάσης-κοαγκουλάσης και τη μέθοδο APIStaph 20, ενώ πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ευαισθησίας στην οξακιλλίνη, την ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη. Σε όλα τα ταυτόχρονα θετικά ζεύγη μητέρας-παιδιού, και σε όλα τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν στα ίδια ζεύγη μητέρας-παιδιού, αλλά σε διαφορετική χρονική περίοδο έγινε τυποποίηση με pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), και ανιχνεύτηκε η παρουσία των γονιδίων spa, mecA και Panton-Valentine Leukocidin (PVL).

Συνολικά ελήφθησαν 615 ρινικά επιχρίσματα από 310 ζεύγη βρέφους-μητέρας, συμπεριλαμβανομένων 10 περιπτώσεων σε δίδυμα. Θετικά για *S. aureus* ήταν 55 (17.7%) δείγματα από βρέφη και 47 (15.4%) δείγματα από τις μητέρες. Από τα 82 βρέφη που ελήφθησαν και τα 3 δείγματα, σε 47 (57.3%) δεν βρέθηκε καμία θετική καλλιέργεια για *S. aureus* (σταθεροί μη-φορείς), σε 23 (28%) βρέφη βρέθηκε μία θετική καλλιέργεια (παροδικά φορείς), και σε 12 (14.6%) βρέθηκαν τουλάχιστον δύο φορές θετικές καλλιέργειες (μόνιμοι φορείς). Από τις 79 μητέρες που ελήφθησαν και τα 3 δείγματα, οι 53 (67.1%) ήταν σταθερα μη-φορείς, οι 15 (19%) ήταν παροδικά φορείς και οι 11 (13.9%) ήταν μόνιμοι φορείς. Τα ποσοστά φορίας στα βρέφη σε κάθε δειγματοληψία είχαν θετική σχέση με τα ποσοστά της μητρικής φορίας και με τις μητέρες που δεν κάπνιζαν. Επίσης τα ποσοστά επίμονης φορίας ήταν υψηλότερα στα βρέφη που γεννήθηκαν από μητέρες που δεν κάπνιζαν και με περισσότερα αδέλφια στην οικογένεια. Ζεύγη βρέφους-μητέρας με ταυτόχρονη φορία βρέθηκαν σε 15 περιπτώσεις (4.8%), σχεδόν διπλάσιο από το ποσοστό που αναμένεται από την τύχη (8.3 ζεύγη, 2.7%). Αυτά τα 15 ζεύγη τυποποιήθηκαν και βρέθηκαν να είναι γονιδιακά όμοια τα 8 ζεύγη (53.3%). Όλα τα ίδια γονιδιακά θετικά ζεύγη ήταν χωρίς ιστορικό εισαγωγής σε τμήμα νεογνών και σχεδόν όλα (7/8) παρατηρήθηκαν στην δειγματοληψία του 6ου μήνα. Τα απομονωμένα στελέχη από τα βρέφη ανήκαν κυρίως στους τύπους ST 30 (8/19) και τύπους PFGE 2 (6/19). Επιπλέον, 10/19 περιείχαν το γονίδιο mecA και 2/19 το γονίδιο PVL. Και τα δύο PVL (+) όπως και τα 8/10 mecA (+) στελέχη από τα βρέφη είχαν θετική συσχέτιση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις μητέρες τους. Και τα 4 PVL (+) στελέχη (2 από τα βρέφη και τις αντίστοιχες μητέρες τους) ήταν και mecA (+) και ανήκαν στον τύπο ST 80. Τα ποσοστά αντοχής στη μεθικιλλίνη, ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη ήταν 43.6%, 5.4% και 3.6%

αντίστοιχα, στα απομονωμένα από βρέφη στελέχη και 42.5%, 8.5%, και 0% στα απομονωμένα από τις μητέρες. Η αντίσταση στη μεθικιλλίνη ήταν πιο συχνή στα βρέφη από το Τμήμα Νεογνών.

Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα στελέχη που αποικίζουν τα βρέφη συνήθως ταυτίζονται με τα στελέχη της μητέρας τους και μάλιστα σε βρέφη που δεν νοσηλεύονται σε νεογνολογική κλινική. Η μετάδοση του *S. aureus* στην βρεφική ηλικία φαίνεται να γίνεται από το γονέα στο παιδί, σε αντίθεση με άλλα παθογόνα όπου συχνά η μετάδοση είναι από το παιδί στους γονείς. Όσον αφορά την υπόθεση του κατά πόσον τα βρέφη αποικίζονται μέσω κάθετης μετάδοσης ή στενής επαφής, τα ευρήματά μας ευνοούν το σενάριο της στενής επαφής, δεδομένου ότι πολύ λίγα ζευγάρια βρέφους-μητέρας βρέθηκαν αποικισμένα τις πρώτες ημέρες της ζωής, και η συντριπτική πλειοψηφία των θετικών ζευγαριών παρατηρήθηκαν στον 6ο μήνα. Τα βρέφη που είχαν εισαχθεί στο τμήμα νεογνών ανέπτυξαν διαφορετική εικόνα φορίας. Επίσης τα ποσοστά φορίας ήταν παρόμοια στα βρέφη που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή. Τα ποσοστά αποικισμού στους μήνες 6 και 12 είναι παρόμοια με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά. Στη μελέτη μας τα νεογνά ήταν λιγότερο αποικισμένα στον πρώτο μήνα σε σχέση με άλλες μελέτες πιθανώς λόγω της λήψης του πρώτου δείγματος ήδη στις πρώτες ημέρες ζωής. Τα ποσοστά επίμονης φορίας ήταν παρόμοια με εκείνα που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά. Είναι ενδιαφέρον το εύρημα ότι και τα δύο βρέφη επίμονοι φορείς με το ίδιο στέλεχος είχαν μητέρες φορείς την ίδια χρονική στιγμή με το ίδιο γονιδιακά στέλεχος. Το εύρημα αυτό δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν και επισημαίνει το ρόλο του μητρικού αποικισμού στην επίμονη φορία του βρέφους. Οι μητέρες που δεν καπνίζουν, ο αποικισμός της μητέρας, και η παρουσία πολλών αδελφών στην οικογένεια είχαν

σχέση με υψηλότερα ποσοστά αποικισμού του *S. aureus* στο βρέφος, σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη βρεφική ηλικία. Τόσο η διαλείπουσα όσο και η επίμονη φορία, ήταν λιγότερο συχνή στα βρέφη μητέρων που κάπνιζαν ωστόσο αυτό το εύρημα χρειάζεται προσεκτική εξήγηση και περαιτέρω έρευνα. Η παρουσία αδελφών στην οικογένεια έχει συσχετιστεί με τη φορία του *S. aureus*, αλλά στην μελέτη μας τα αδέλφια βρέθηκε να προδιαθέτουν τα βρέφη σε επίμονη φορία κυρίως προς το τέλος της βρεφικής ηλικίας παρά στην αρχή. Τέλος, η γονιδιακή ομοιότητα των στελεχών στα ζεύγη μητέρας-παιδιού σε αυτή τη μελέτη παραπέμπει στο κοινό περιβάλλον και στο γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή. Τα απομονωμένα PVL (+) και mecA (+) στελέχη στα βρέφη ήταν παρόμοια γονιδιακά με τα απομονωμένα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή στις μητέρες τους.

Περιορισμοί της μελέτης ήταν ότι δεν αναζητήθηκε ο σταφυλόκοκκος σε άλλα σημεία του σώματος του βρέφους. Ομοίως ότι δεν μελετήθηκε το ενδεχόμενο αποικισμού από άλλα μέλη της οικογένειας ή από πιθανές πηγές νοσοκομειακής μετάδοσης στην υπο-ομάδα των νεογνών που εισήχθησαν στη Μονάδα Νεογνών. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν με σαφήνεια τη σημασία του αποικισμού της μητέρας για τον αποικισμό του βρέφους ήδη στους πρώτες μήνες ζωής και συμβάλλουν στην κατανόηση του φαινόμενου του αποικισμού του ανθρώπινου ξενιστή από ένα από τα πιο επίφοβα παθογόνα.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a major pathogen in both community-acquired and nosocomial infections with alarming rates of resistance to antibiotics in recent years. *S. aureus* can colonize many sites of the human body, among which the anterior nares represent the dominant ecological niche. There seems to exist a link between *S. aureus* nasal carriage and infection, since nasal and infection strains commonly share the same genotype, rates of infection are higher in carriers that in non-carriers, and eradication of carriage has been shown to reduce nosocomial infection. About 30% of the population carries *S. aureus* at any time; this includes 20% who are persistent and 10% who are transient carriers. Infant colonization by *S. aureus* has not been adequately investigated, while there are very few studies worldwide for the timing and the source of colonization in infancy.

Methicillin resistance first appeared among nosocomial isolates of *S aureus* in 1961. Since that time, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has become widespread in hospitals and intensive care units around the world. This high level of resistance results from the presence of the mecA gene that encodes the production of a penicillin binding protein known as PBP2a, which has decreased affinity for most beta-lactam antibiotics. MRSA is now one of the most common causes of bacterial nosocomial infections, accounting for 40–70% of the *S. aureus* infections in intensive care units. In the past decade new strains of MRSA (CA-MRSA) have emerged in the community, causing aggressive infections in young, otherwise healthy people. Many strains produce the Panton-Valentine Leukocidin, (PVL) which is associated with abscesses, invasiveness, and increased morbidity and mortality.

S. aureus can colonize many parts of the human body, of which the anterior nares represent the dominant ecological niche. There seems to exist a link between *S. aureus* nasal carriage and infection, since nasal and infection strains commonly share the same genotype, rates of infection are higher in carriers that in non-carriers, and eradication of carriage has been shown to reduce nosocomial infection. About 30% of the population carries *S. aureus* at any one time; this includes 20% who are persistent and 10% who are transient carriers. Infant colonization by *S. aureus* has not been adequately investigated, while there are few studies worldwide for the timing and the source of colonization in infancy.

The objective of the present study was to explore determinants associated with the infant colonization in the first year of life, the molecular epidemiology and the resistance to antibiotics of *S. aureus* strains isolated from infants and their mothers in a well-defined area, i.e., the island of Crete.

The study group consisted of a cohort of 128 recruited newborn infants and their mothers who were born at Venizeleion Pananio General Hospital in Heraklion, Crete, between November 2005 and May 2006. 98 infants were from Maternity Ward and were healthy while 30 were admitted to the Neonatal Ward. Nasal swabs were obtained from mothers and infants before discharge and after 6 and 12 months, and a series of determinants related to infant, mother, father and family were investigated. The cultured *S. aureus* was identified on the basis of colony morphology, Gram stain, catalase test, coagulase test and API 20 Staph system, while antimicrobial susceptibility tests against oxacillin, erythromycin and clindamycin were performed. All mother-infant pairs with simultaneous isolation *S. aureus*, and all strains isolated in

the mother-infant pair at a different sampling were characterized by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing, spa typing, and presence of chromosomal mecA and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes.

A total of 615 nasal swabs were obtained from 310 infant-mother pairs, including 10 cases of sampling in twins. Positive for *S. aureus* were 55 (17.7%) samples from infants and 47 (15.4%) samples from mothers. Of the 82 infants who had all 3 swabs, 47 (57.3%) were persistent *S. aureus* non-carriers, 23 (28%) infants were positive once (transient carriers), and 12 (14.6%) were positive at least twice (persistent carriers). Of the 79 mothers who had all 3 swabs, 53 (67.1%) were *S. aureus* non-carriers, 15 (19%) were transient carriers and 11 (13.9%) were persistent carriers. Carriage rates in infants at any sampling were positively related to maternal carriage rates and to non-smoking mothers. Also persistent carriage rates were further higher in infants born to non-smoking mothers and having more siblings. Pairs of infant-mother carriers were found in 15 occasions (4.8%), almost twice the rate expected by chance (8.3 pairs, 2.7%). This 15 pairs were further typed and were found to be identical at the same time point in 8 pairs (53.3%). All identical *S. aureus* strains were found in infant-mother pairs without history of admission to Neonatal Ward, and almost all identical pairs (7/8) were observed in the 6-month sampling. Isolates from infants principally belonged to ST types 30 (8/19) and to PFGE type 2 (6/19). Furthermore, 10/19 isolates harbored mecA gene and 2/19 isolates PVL gene. Both PVL positive and 8/10 mecA isolates from infants were paired with isolates with the same determinants in mothers. All four PVL positive isolates were mecA positive and belonged to ST type 80. Resistance rates for methicillin, erythromycin and clindamycin were 43.6%, 5.4%, and 3.6% respectively in isolates from infants and

42.5%, 8.5%, and 0% in isolates from mothers. Resistance to methicillin was more frequent in isolates from Neonatology Ward than Maternity Ward infants.

Our findings suggest that strains carried by young infants are commonly identical to their mothers' strains. The transmission in infancy is from parent to child, in contrast to other pathogens where transmission is rather from child to parents. Regarding the issue of whether infants are colonized through vertical transmission or close contact, our findings favor the close contact scenario, given that very few infant-mother pairs were colonized in the first days of life, the vast majority of identical infant-mother isolates were observed in month 6 of life, infants admitted to Neonatology Ward developed a different carriage profile, and as similar carriage rates were found in infants after vaginal delivery or caesarean section. Colonization rates at months 6 and 12 were close to those already reported. In our study infants were less colonized at month 0 than elsewhere, possibly because they were swabbed earlier in their life. Persistent carriage rates were similar to those reported. Interestingly, both infants with persistent carriage of the same strain had mothers carrying identical strains. This finding has not been reported previously and points to the role of maternal colonization in the persistent carriage in the infant. We found that maternal non-smoking, maternal colonization, and many siblings were related to higher rates of *S. aureus* colonization in the infant, though at different time points in infancy. In our study *S. aureus* carriage, both intermittent and persistent, was less common in infants of smoking mothers but this finding needs careful explanation and further investigation. Presence of siblings has been related to *S. aureus* carriage, but in our study siblings were found to predispose infants for persistent carriage in late rather than in early infancy. Finally, concordance in carriage in mother-infant pairs in this

study points to both common environment and host genetics. PVL and mecA positive isolates from infants were simultaneously paired with isolates with the same genetic determinants in mothers.

Limitations of this study included the absence of exploring other potential colonization sites but the nares and of exploring the impact of colonization of other family members. Furthermore we did not investigate potential sources of hospital transmission in the group of infants admitted to the Neonatology Ward. Despite all these limitations our findings clearly point to the impact of maternal colonization in the very first months of life and contribute to the understanding the human colonization by one of the most devastating pathogens.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρυσίζοντας σταφυλόκοκκος (*S. aureus*)

Ο σταφυλόκοκκος είναι αερόβιος και δυνητικά αναερόβιος θετικός κατά gram κόκκος που στο μικροσκόπιο παρουσιάζεται σαν μεμονωμένο βακτηρίδιο, σε ζεύγη, ή σε ακανόνιστα συμπλέγματα δίκην σταφυλιού. Ο αγγλικός όρος *Staphylococcus* προέρχεται από τον ελληνικό όρο «σταφύλι». Οι σταφυλόκοκκοι είναι μη κινητά, μη σπορογόνα, και ικανά να παράγουν καταλάση βακτήρια. Το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει πεπτιδογλυκάνη και τεϊχοϊκό οξύ. Είναι μικροοργανισμοί ανθεκτικοί σε υψηλές θερμοκρασίες έως 50°C, σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, και σε ξηρό περιβάλλον. Ανάλογα αν παράγουν ή όχι κοαγκουλάση και μανιτόλη διακρίνονται σε κοαγκουλάση-θετικοί και μανιτόλη-θετικοί σταφυλόκοκκοι με μόνο εκπρόσωπο τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*S. aureus*), σε κοαγκουλάση-αρνητικοί και μανιτόλη-αρνητικοί με εκπρόσωπο το επιδερμικό σταφυλόκοκκο και σε κοαγκουλάση-αρνητικοί και μανιτόλη-θετικοί με εκπρόσωπο τον σαπροφυτικό σταφυλόκοκκο. Οι αποικίες είναι συνήθως μεγάλες (διάμετρος 6-8mm), ομαλές και διαφανείς. Το χρώμα των αποικιών κυμαίνεται από κρεμ-κίτρινο σε πορτοκαλί. Η ικανότητα παραγωγής κοαγκουλάσης του *S. aureus* είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο και γενικά αποδεκτό κριτήριο για την ταυτοποίηση του. Η κοαγκουλάση είναι μία πρωτεΐνη που βοηθά την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες προκαλώντας τη χαρακτηριστική «κροκίδωση» (συγκολλητινοαντίδραση) του πλάσματος.

Σημασία του *S. aureus* στην ανθρώπινη υγεία

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*S. aureus*) είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος ευθύνεται για πολλές λοιμώξεις από ήπιες έως σοβαρές και συχνά απειλητικές για την ζωή. Η ικανότητά του να επιβιώνει σε διαφορετικά περιβάλλοντα, να προσαρμόζεται, να αποκτά αντοχή στα αντιβιοτικά και να αλληλεπιδρά με επιτυχία με τον ξενιστή τον έχει καταστήσει ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα παγκοσμίως. Στοιχεία από το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης των Νοσοκομειακών Λοιμώξεων για το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Ηνωμένων Πολιτειών (CDC), αποκαλύπτουν ότι ο *S. aureus* είναι η κύρια αιτία της νοσοκομειακής πνευμονίας και των λοιμώξεων του χειρουργικού τραύματος και η δεύτερη πιο συχνή αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων του αίματος.

Ο *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει νόσο μέσω της εισβολής των ιστών και της παραγωγής τοξινών. Η απελευθέρωση τοξινών μπορεί να έχει επιπτώσεις σε περιοχές μακριά από την εστία λοίμωξης ή του αποικισμού. Στην εισβολή των ιστών η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί σε λοίμωξη ξεκινά με τον αποικισμό του μικροοργανισμού και στη συνέχεια διαδίδεται με τα χέρια από το σημείο του αποικισμού σε μέρη του σώματος που μπορεί να προκύψει αλλοίωση του δερματικού φραγμού. Το σήμα κατατεθέν της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης είναι το απόστημα, το οποίο περιέχει μικροοργανισμούς και λευκοκύτταρα. Από αυτή την εστία λοίμωξης, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διαδοθούν αιματογενώς και η δυνατότητα να παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα διευκολύνει τη διαδικασία καταστροφής των ιστών. Το 20-30% των ανοσοκατασταλμένων ασθενών αναπτύσσουν σοβαρές επιπλοκές ή θανατηφόρες σηψαιμίες από *S. aureus* που

σχετίζονται με παρουσία φλεβικού καθετήρα. Η παραγωγή τοξινών από τον *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει συγκεκριμένες ασθένειες ή σύνδρομα. Η εντεροτοξίνη που παράγουν ορισμένα στελέχη *S. aureus* προκαλεί μία από τις πιο κοινές τροφικές δηλητηριάσεις με οξεία έναρξη εμέτου και διάρροιας 2-6 ώρες μετά την κατάποση των μολυσμένων τροφών. Επίσης μια σπάνια αλλά σαφώς περιγραφόμενη διαταραχή σε νεογνά και μικρά παιδιά είναι το σύνδρομο SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrom) ή νόσος Ritter όπου ο *S. aureus* παράγει μια αποφολιδωτική τοξίνη προκαλώντας αποκόλληση της επιδερμίδας. Η πιο σοβαρή εκδήλωση από παραγωγή τοξινών με αυξημένη θνητότητα είναι το σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS) που σχετίζεται με στελέχη που παράγουν την εξωτοξίνη TSST-1 και εντεροτοξίνες B και C.

Νοσηρότητα/θνητότητα. Η νοσηρότητα και θνητότητα από λοίμωξη του *S. aureus* ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την κλινική οντότητα. Οι σηψαιμίες χωρίς θεραπεία έχουν ένα ποσοστό θνητότητας που υπερβαίνει το 80% κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα. Το ποσοστό θνητότητας του συνδρόμου TSS είναι 3-5%. Αν και η θνητότητα είναι χαμηλή σε παιδιά με σύνδρομο SSSS, οι περισσότεροι θάνατοι συνδέονται με την καθυστέρηση στη διάγνωση.

Σταφυλοκοκκικές Λοιμώξεις

Λοιμώξεις δέρματος και των μαλακών μορίων (κηρίο): Συχνά εμφανίζονται σε μικρά παιδιά με τη στενή σωματική επαφή μέσα στην οικογένεια. Εστίες επιδημίας έχουν περιγραφεί και σε νηπιαγωγεία, όπου σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν εξελιχθεί σε σύνδρομο SSSS. Η διάγνωση γίνεται συνήθως με βάση τη χαρακτηριστική εμφάνιση των αλλοιώσεων. Παρά το γεγονός ότι ο στρεπτόκοκκος της ομάδας Α εθεωρείτο η συχνότερη αιτία, ο *S. aureus* έχει καταστεί το κύριο παθογόνο από τη δεκαετία του 1980 και μετά.

Σύνδρομο SSSS (Νόσος Ritter): Μια αποφολιδωτική τοξίνη προκαλεί αυτό το σχετικά σπάνιο σύνδρομο. Χαρακτηριστικά του συνδρόμου αυτού είναι ο πυρετός, το ερύθημα, και φυσαλίδες, οι οποίες μετά από ρήξη αφήνουν μία κόκκινη βάση. Απαλή πίεση στο φαινομενικά άθικτο δέρμα προκαλεί την αποκόλληση της επιδερμίδας, φαινόμενο γνωστό ως σημείο Nikolsky. Η διαφοροδιάγνωση πρέπει να γίνεται προσεκτικά με το πολύμορφο ερύθημα ή τοξική επιδερμική νεκρόλυση, τα οποία έχουν διαφορετική αντιμετώπιση. Παρά το γεγονός ότι το ποσοστό θνητότητας είναι χαμηλό σε παιδιά με αυτό το σύνδρομο, οι περισσότεροι θάνατοι συνδέονται με καθυστερημένη διάγνωση.

Θυλακίτιδα, δοθιήνας, και ψευδάνθρακας: Η θυλακίτιδα είναι φλεγμονή του θύλακα της τρίχας. Ο δοθιήνας περιλαμβάνει τόσο το δέρμα όσο και τους ιστούς του υποδόριου σε περιοχές με θύλακες τριχών, όπως λαιμό, μασχάλη και γλουτούς. Είναι μικρά αποστήματα που χαρακτηρίζεται από τη παρουσία πυώδους υγρού που εκκρίνεται μετά από διάνοιξη. Ο ψευδάνθρακας είναι ένα σύνολο δοθιήνων με αρκετές φλυκταινώδεις βλάβες. Αυτές οι λοιμώξεις του δέρματος μπορεί να είναι

αυτοπεριορισμένες, αλλά μπορούν επίσης να μεταδοθούν αιματογενώς και να προκαλέσουν σηψαιμία, κατάσταση απειλητική για τη ζωή.

Λοιμώξεις των οστών (οστεομυελίτιδα): Παρουσιάζεται συνήθως σε παιδιά πριν την ηλικία που κλείνουν οι επιφύσεις. Τα περισσότερα περιστατικά οστεομυελίτιδας παρουσιάζονται μετά από αιματογενή διασπορά ενώ περίπου το ένα τρίτο των περιπτώσεων μετά από τραύμα. Τα παιδιά συχνά παρουσιάζουν ξαφνική έναρξη πυρετού με ευαισθησία στο οστό ή χωλότητα και πόνο ο οποίος μπορεί να είναι σφύζων και έντονος. Ωστόσο η παρουσίαση σε νεογνά μπορεί να είναι υποκλινική.

Σηπτική αρθρίτιδα: Ο *S. aureus* μπορεί να εισέλθει στην άρθρωση μέσω αιματογενούς διασποράς, με άμεσο ενοφθαλμισμό, ή με εξάπλωση από γειτονική εστία λοίμωξης. Τυπικά ευρήματα περιλαμβάνουν μείωση του εύρους κίνησης, θερμότητα, ερύθημα, ευαισθησία της άρθρωσης μαζί με συστηματική συμπτωματολογία. Στα βρέφη τα σημεία και συμπτώματα μπορεί να απουσιάζουν. Η πύλη εισόδου της μόλυνσης δεν βρίσκεται σχεδόν ποτέ, και η αρθρίτιδα είναι σχεδόν πάντα μονόπλευρη.

Ενδοκαρδίτιδα: Είναι συχνή σε εφήβους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών που δεν έχουν βαλβιδοπάθεια. Σε παιδιά με προϋπάρχουσα καρδιακή νόσο, η ενδοκαρδίτιδα σχετίζεται χρονικά με την καρδιοχειρουργική επέμβαση ή το καθετηριασμό. Παιδιά με προσθετικές βαλβίδες είναι ιδιαίτερα ευάλωτα, λόγω της τάσης του μικροοργανισμού να προσκολλάται στα ξένα προσθετικά υλικά. Η αρχική παρουσίαση των ασθενών με ενδοκαρδίτιδα από *S. aureus* είναι ο πυρετός και η κακουχία ενώ ρίγη και εφιδρώσεις μπορεί να είναι παρόν. Επίσης μπορεί να

παρατηρηθούν περιφερικά εμβολικά φαινόμενα, οζίδια του Osler, υπονύχιες αιμορραγίες, βλάβες του Janeway, και κηλίδες του Roth. Η εμφάνιση ή αλλαγή προϋπάρχοντος καρδιακού φυσήματος παρατηρείται σε πολλούς ασθενείς.

Σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS): Το σύνδρομο σχετίζεται με στελέχη που παράγουν την εξωτοξίνη TSST-1, αλλά και τις εντεροτοξίνες Β και C. Αυτές οι τοξίνες προκαλούν τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων Τ μέσω του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ και απελευθερώνουν μαζικά κυτταροκίνες που προκαλούν το TSS. Το αποτέλεσμα είναι μια κατάσταση που μιμείται το σηψαιμικό σοκ. Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει πυρετό, διάχυτο ερύθημα, υπόταση, με τη συμμετοχή 3 ή περισσότερων συστημάτων (γαστρεντερικό, κυκλοφορικό, νευρικό κτλ.). Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η ταχύτητα με την οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ένα προηγουμένως υγιές άτομο οποιασδήποτε ηλικίας.

Πνευμονία: Η πρωτοπαθής μορφή εμφανίζεται χωρίς εξωπνευμονική εστία, πιθανώς μέσω του άμεσου ενοφθαλμισμού στους πνεύμονες, ενώ η δευτεροπαθής μορφή μετά από αιματογενή διασπορά των πνευμόνων. Προδιαθεσικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την παιδική ηλικία, χρόνιες νόσοι και ιογενής λοίμωξη του αναπνευστικού όπως η γρίπη. Οι ασθενείς με πρωτοπαθή σταφυλοκοκκική πνευμονία παρουσιάζουν ένα σύντομο πρόδρομο στάδιο πυρετού που ακολουθείται από μία ταχείας έναρξης αναπνευστική δυσχέρεια, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει ταχύπνοια, εισολκές και κυάνωση. Η πνευμονία μπορεί επίσης να αναπτυχθεί δευτεροπαθώς μετά από γρίπη και εμφανίζεται κατά προτίμηση σε νεαρούς

ενήλικες (με μεγάλη θνητότητα). Τα τελευταία χρόνια λόγω της αύξησης του CA-MRSA, η σταφυλοκοκκική πνευμονία γίνεται όλο και πιο συχνή.

Θρομβοφλεβίτιδα: Συνήθως εμφανίζεται σε νοσοκομειακούς ασθενείς και χαρακτηρίζεται από πυρετό, πόνο και περιστασιακά από ερύθημα στο σημείο εισαγωγής ενός ενδοφλέβιου καθετήρα με εκροή πύου. Επίσης σοβαρή πυώδης θρομβοφλεβίτιδα μπορεί να παρουσιαστεί σε ασθενείς με εγκαύματα.

Εν τω βάθει απόστημα: Προκύπτουν από αιματογενή διασπορά σε σπλαχνικά όργανα όπως το ήπαρ, τη σπλήνα και τα νεφρά. Αυτές οι λοιμώξεις προκαλούν συνήθως πυρετό με ή χωρίς εντόπιση του πόνου.

Διαφορική διάγνωση: Η διαφορική διάγνωση της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης περιλαμβάνει άλλες δερματικές βλάβες όπως πέμφυγα, πεμφιγοειδές, έγκαυμα, τραύμα τριβής, πολύμορφο ερύθημα, σύνδρομο Stevens-Johnson, ερπητοειδή δερματίτιδα, σύνδρομο Henoch-Schönlein, αλλά και νόσους όπως λευχαιμία, μηνιγγιτιδοκοκκαιμία, λοίμωξη από αδενοϊούς, αλλεργικές αντιδράσεις σε φάρμακα, νόσος Legg-Calvé-Perthes, επιφυσιολίσθηση κτλ.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

Στο κηρίο, την θυλακίτιδα, τον δοθιήνα και τον ψευδάνθρακα η διάγνωση βασίζεται στην κλινική εικόνα και περιστασιακά με καλλιέργεια από το πυώδες έκκριμα μετά από διάνοιξη και παροχέτευση. Στην οστεομυελίτιδα η παρακέντηση είναι απαραίτητη για την απομόνωση του μικροοργανισμού και το σχεδιασμό της μακροχρόνιας θεραπείας ενώ οι καλλιέργειες αίματος είναι θετικές μόνο στο 30-50%. Στις απλές ακτινογραφίες οι καταστροφικές αλλαγές των οστών παρατηρούνται συνήθως 2 εβδομάδες μετά, ενώ η διάγνωση προσέγγιση ενισχύεται από το σπινθηρογράφημα οστών με Tc99m. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) είναι η καλύτερη μορφή απεικόνισης για τον καθορισμό πυώδους συλλογής και για το σχεδιασμό της χειρουργικής αντιμετώπισης. Σε υποψία αρθρίτιδας η εξέταση του αρθρικού υγρού είναι το κύριο μέσο διάγνωσης, ενώ καλλιέργεια, χρώση κατά Gram και καθορισμός του αριθμού και του είδους των λευκοκυττάρων στο υγρό θα πρέπει να διενεργούνται. Η ακτινολογική μέθοδος εκλογής είναι η μαγνητική τομογραφία. Σε υποψία ενδοκαρδίτιδας συνιστάται η λήψη 3-5 σετ μεγάλου όγκου αίματος καλλιεργειών μέσα στις πρώτες 24 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το υπερηχογράφημα καρδιάς αποτελεί ένα πολύτιμο βοήθημα και διενεργείται για να αποκαλύψει εκβλαστήσεις κυρίως σε ασθενείς με αρνητικές καλλιέργειες αίματος. Ακτινογραφίες ασθενών με πρωτοπαθή πνευμονία μπορεί να αναδείξουν μονόπλευρη διήθηση ενώ σε ασθενείς με δευτεροπαθή πνευμονία αμφίπλευρες διηθήσεις. Πλευριτική συλλογή, πνευματοκήλες και πνευμοθώρακας είναι επίσης συχνές στην σταφυλοκοκκική πνευμονία.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Σοβαρές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις απαιτούν θεραπεία παρεντερικά με πενικιλλίνη ανθεκτική στην πενικιλλινάση (π.χ. ναφκιλλίνη, οξακιλλίνη) ή πρώτης γενιάς ή δεύτερης γενιάς κεφαλοσπορίνες (π.χ. κεφαλεξίνη, κεφουροξίμη) μαζί με κλινδαμυκίνη. Η βανκομυκίνη είναι για αποκλειστική χρήση σε στελέχη που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (MRSA) και κλινδαμυκίνη ή σε ασθενή με δυνητικά απειλητική για τη ζωή του λοίμωξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις της βανκομυκίνης θα πρέπει να παρακολουθούνται. Η λινεζολίδη είναι μια εναλλακτική λύση στη βανκομυκίνη αν και έχει αρχίσει να εμφανίζεται αντίσταση. Η τελαβανκίνη είναι ένα λιπογλυκοπεπτίδιο που είναι συνθετικό παράγωγο της βανκομυκίνης για χρήση σε επιπλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και την πνευμονία. Ένα παλιό αντιβιοτικό, το φουσιδικό οξύ λαμβάνει εκ νέου την προσοχή στις ΗΠΑ για τη θεραπεία των λοιμώξεων από MRSA. Η μουπιροκίνη ή η ρεταπαμουλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιφανειακές εντοπισμένες λοιμώξεις (π.χ., κηρίο).

Επειδή ο CA-MRSA προκαλεί περισσότερο από το ήμισυ του συνόλου των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στην κοινότητα, η εμπειρική θεραπεία με πενικιλλίνες ή κεφαλοσπορίνες μπορεί να είναι ανεπαρκής. Ορισμένοι ειδικοί συνιστούν τον συνδυασμό πενικιλλίνης ανθεκτικής στην πενικιλλινάση ή κεφαλοσπορίνη (στη περίπτωση που *S. aureus* είναι ευαίσθητος στην μεθικιλλίνη), με κλινδαμυκίνη ή κινολόνη. Άλλοι προτείνουν τη χρήση κλινδαμυκίνης, τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης (TMP-SMX), ριφαμπικίνης, ή κινολόνης. Τέλος, λόγω των ανησυχιών για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, μερικοί

λοιμωξιολόγοι συνιστούν τη χρήση TMP-SMX και ριφαμπικίνης σε συνδυασμό και όχι μεμονωμένα. Κατευθυντήριες γραμμές θεραπείας έχουν δημοσιευθεί πρόσφατα. (Best Evidence-Guideline Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections in Adults and Children. Clin Infect Dis. Feb 1 2011;52(3):e18-e55).

Το κηρίο και άλλες δευτερεύουσες λοιμώξεις του δέρματος (επιφανειακές ή εντοπισμένες λοιμώξεις) μπορεί να αντιμετωπιστούν τοπικά με μουπιροκίνη ή ρεταπαμουλίνη. Ωστόσο, τα CA-MRSA στελέχη μπορούν εύκολα να γίνουν ανθεκτικά στην μουπιροκίνη. Περισσότερο εκτεταμένες βλάβες του δέρματος αντιμετωπίζονται με από του στόματος αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά. Η διάνοιξη και παροχέτευση της συλλογής πύου είναι υψίστης σημασίας. Για μικρά αποστήματα σε απύρετα νήπια και παιδιά, η παροχέτευση και μόνο μπορεί να αρκεί για την θεραπεία, χωρίς να χρειαστεί συστηματική αγωγή.

ΦΟΡΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Ο άνθρωπος είναι η φυσική δεξαμενή για τον *S. aureus*, και ανευρίσκεται συχνά ως φυσιολογική χλωρίδα σε περιοχές όπως τη μασχάλη, τη βουβωνική περιοχή, το περίνεο, τον κόλπο και τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες, ιδιαίτερα εάν ο δερματικός φραγμός έχει διαταραχθεί ή καταστραφεί. Η μετάδοση γίνεται κυρίως μέσω άμεσης επαφής με άτομα φορείς. Φορία ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία ο μικροοργανισμός παραμένει στον ξενιστή χωρίς να προκαλεί νόσο. Έχουν περιγραφεί 3 προφίλ φορίας: αυτοί που φέρουν πάντα ένα στέλεχος (μόνιμοι φορείς), εκείνοι που φέρουν τον *S. aureus* κατά διαστήματα με αλλαγή στελεχών (διαλείπων φορείς) και αυτούς που ποτέ δεν αποικίζονται από τον *S. aureus* (μη φορείς). Τα ποσοστά φορίας στο γενικό πληθυσμό σε υγιείς ενήλικες είναι από 11-32% ενώ στο προσωπικό του νοσοκομείου 25% (Wenzel et al. 1995). Η φορία του *S. aureus* αναφέρεται υψηλότερη στα παιδιά από ότι στους ενήλικες (Peacock et al. 2003), με τα παιδιά και τους έφηβους κάτω των 20 ετών να έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επίμονης φορίας σε σχέση με τον ενήλικο πληθυσμό (Lebon et al. 2008). Σε πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες αναφέρεται ότι η πρώτη βρεφική ηλικία και κυρίως οι πρώτοι 3 μήνες της ζωής είναι η περίοδος με το μεγαλύτερο ποσοστό αποικισμού το οποίο κυμαίνεται από 25%-50% (Regev-Yochay et al. 2009), ενώ μετά την πρώτη βρεφική ηλικία υπάρχει μία πτώση των ποσοστών στο 13% το πρώτο χρόνο (Lebon et al. 2008). Αυτή η πτώση θα μπορούσε να αποδοθεί ως το αποτέλεσμα ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος του βρέφους αλλά και στον ανταγωνισμό του *S. aureus* με άλλους μικροοργανισμούς. Αυτός ο φυσικός ανταγωνισμός μεταξύ άλλων μικροοργανισμών όπως οι στρεπτόκοκκοι και τα κορυνοβακτηρίδια που συχνά αποικίζουν το ρινικό επιθήλιο μπορεί να αναστείλει

την ανάπτυξη και τον αποικισμό του *S. aureus* μειώνοντας έτσι τα ποσοστά φορίας (Uehara et al. 2001, Uehara et al. 2000). Ο Lina et al. 2003 αναφέρει ότι τα ποσοστά φορίας από *S. aureus* είναι μικρότερα σε άτομα που έχουν αποικιστεί από στελέχη κορυνοβακτηριδίων και/ή S. epidemipis. Ο Van Gils et al. 2011 παρατήρησε μία παροδική αύξηση του αποικισμού του *S. aureus* σε βρέφη 12 μηνών που έχουν εμβολιαστεί με το 7δύναμο αντι-πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο. Αντιβακτηριδιακοί παράγοντες που εκκρίνονται από τη μύτη παίζουν σημαντικό ρόλο στον αποικισμό. Ο Cole et al.1999 αναφέρει ότι οι ρινικές εκκρίσεις από άτομα φορείς του *S. aureus* είχαν έλλειψη αντιβακτηριδιακής δράσης έναντι του *S. aureus* in vitro, εν αντιθέσει με τις εκκρίσεις από μη φορείς. Επιπλέον παράγοντας που εμπλέκεται στη φορία, είναι η ικανότητα του *S. aureus* να προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του ρινικού βλεννογόνου μέσω ειδικών υποδοχέων προσκόλλησης. Ο Aly et al. 1977 αναφέρει μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης του *S. aureus* στα επιθηλιακά κύτταρα φορέων σε σχέση με άτομα μη φορείς. Τα ποσοστά αποικισμού αναφέρονται υψηλότερα σε ομάδες ασθενών με ανοσοανεπάρκεια όπως σε διαβητικούς, σε άτομα με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια υπό κάθαρση και σε άτομα με AIDS (Kluytmans et al 1997). Το μητρικό γάλα και κυρίως το πύαρ είναι γνωστό ότι περιέχει βιοδραστικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως ανοσοσφαιρίνες (κυρίως IgA), λακτοφερίνη αλλά και κυτταρικούς παράγοντες όπως μακροφάγα και πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα. Η δράση του στον έλεγχο και την αποτροπή λοιμώξεων στην βρεφική ηλικία είναι γνωστή. Η επιρροή του μητρικού θηλασμού στη φορία του *S. aureus* σε υγιή παιδιατρικό πληθυσμό όπως και διάφορων άλλων παραγόντων εκ των οποίων ο αριθμός μελών της οικογένειας

(περισσότερα από 5 vs λιγότερα από 5) και το παθητικό κάπνισμα έχει αναφερθεί. (Bogaert et al. 2004, Peacock et al. 2003).

Ο αποικισμός του ρινικού επιθηλίου είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για διεισδυτικές λοιμώξεις (Wertheim et al. 2004) και με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων για τη μοριακή ταυτοποίηση, ο Von Eiff et al 2001 διαπίστωσε ότι στους περισσότερους ασθενείς με βακτηριαιμία από *S. aureus*, το στέλεχος που απομονώθηκε από το αίμα του ασθενούς ήταν ίδιο γονιδιακά με αυτό που απομονώθηκε από το ρινικό επιθήλιο. Έτσι φαίνεται να επιβεβαιώνεται η σχέση μεταξύ της ρινικής φορίας και της λοίμωξης, καθώς τα απομονωμένα στελέχη από το ρινικό επιθήλιο μοιράζονται συχνά το ίδιο γονότυπο με τα στελέχη της λοίμωξης. Επίσης τα ποσοστά λοίμωξης είναι υψηλότερα σε φορείς σε σχέση με τους μη φορείς, καθώς η εκρίζωση της φορίας έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τις νοσοκομειακές λοιμώξεις (Dancer et al. 2008, Peacock et al. 2003, Kluytmans et al 1997). Η επίμονη ρινική φορία εν αντιθέσει με την διαλείπουσα ή τη μη φορία παρουσιάζει υψηλό κίνδυνο λοίμωξης (Van Belkum et al. 2009) ενώ έχει αναφερθεί ότι το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή παίζει σημαντικό ρόλο στην επίμονη ρινική φορία (Ruimy R et al. 2010).

Η πηγή και η διαδρομή του *S. aureus* είναι υπό επιδημιολογική μελέτη τα τελευταία χρόνια. Η μητρική φορία λογικά μπορεί να επηρεάσει το βρεφικό αποικισμό, αλλά αυτή η υπόθεση έχει ερευνηθεί ελάχιστα. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι το νεογνό αποικίζεται τις πρώτες ημέρες ζωής και ότι ο αποικισμός έχει άμεση σχέση με το περιβάλλον και από τη στενή επαφή με τη μητέρα του (Huang YC et al. 2009). Η μετάδοση του *S. aureus* στην βρεφική ηλικία φαίνεται

να γίνεται από το γονέα στο παιδί, σε αντίθεση με άλλα παθογόνα όπως ο S. pneumoniae (Regev-Yochay et al.2009), όπου η μεγάλη μείωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων στους ενήλικες μετά την εισαγωγή του συζευγμένου αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολίου είναι μια πολύ πειστική απόδειξη της μετάδοσης του S. pneumoniae από τον παιδικό πληθυσμό στους ενήλικες (Lexau et al. 2005). Η γενετική ταυτοποίηση σε ταυτόχρονα αποικισμένα ζεύγη μητέρας-παιδιού ανέδειξε τη γονιδιακή ομοιότητα, επιβεβαιώνοντας την άμεση σχέση μητέρας παιδιού στον αποικισμό από *S. aureus*. Άλλοι ανεξάρτητοι παράγοντες αποικισμού που έχουν ερευνηθεί, όπως ο μητρικός θηλασμός, η παρακολούθηση βρεφονηπιακού σταθμού δεν μπόρεσαν να αποδείξουν μια θετική σχέση.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η αντίσταση στην πενικιλλίνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1942 ενώ η αντίσταση στην μεθικιλλίνη εμφανίστηκε σε νοσοκομειακούς ασθενείς το 1961. Έκτοτε, ο ανθεκτικός στη μεθικιλλίνη *S. aureus* (MRSA) έχει γίνει ευρέως διαδεδομένος σε νοσοκομεία και μονάδες εντατικής θεραπείας σε όλο τον κόσμο. Αυτό το υψηλό επίπεδο αντίστασης που προσδίδει αντοχή σε όλες τις πενικιλλίνες ανθεκτικές στη πενικιλλινάση και τις κεφαλοσπορίνες, προκύπτει από την παρουσία του γονιδίου mecA που κωδικοποιεί την παραγωγή της πρωτεΐνης PBP2a (Penicillin Binding Protein), η οποία έχει μειωμένη χημική συγγένεια με τα περισσότερα βήτα-λακταμικά αντιβιοτικά. Το γονίδιο mecA μεταφέρεται από ένα κινητό γενετικό στοιχείο γνωστό ως σταφυλοκοκκική χρωμοσωμιακή κασέτα (SCC) mec (Chambers et al. 1997, Ito et al. 2001). Η αντίσταση στη μεθικιλλίνη έχει μια ευρεία φαινοτυπικά έκφραση. Η ετερογενής αντίσταση είναι ο τυπικός φαινότυπος, όπου όλοι οι μικροοργανισμοί μεταφέρουν τους γενετικούς παραμέτρους αντίστασης, αλλά μόνο ένα μικρό μέρος από αυτά εκφράζουν τον φαινότυπο. Η ομογενής αντίσταση είναι λιγότερο συχνή, με ένα ενιαίο πληθυσμό μικροοργανισμών που αναστέλλονται μόνο με υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Στη δεκαετία του 1980, ο MRSA ανεδείχθη ως η κύρια αιτία ενδονοσοκομειακής λοίμωξης και ως εκ τούτου, η χρήση της βανκομυκίνης αυξήθηκε. Έρευνα του CDC αποκάλυψε ότι το ποσοστό των ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη στελεχών με ευαισθησία μόνο στη βανκομυκίνη στα ενδονοσοκομειακά στελέχη αυξήθηκε από 22,8% το 1987 σε 56,2% το 1997.

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν εμφανιστεί στην κοινότητα νέα στελέχη MRSA (CA-MRSA) που προκαλούν επιθετικές μολύνσεις σε νέους, κατά τα άλλα υγιείς ανθρώπους (Bassetti et al. 2009, David et al. 2010). Έχουν αναφερθεί σοβαρές διεισδυτικές λοιμώξεις σε προηγουμένως υγιή παιδιά από CA-MRSA (Creel et al. 2009) δημιουργώντας ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε πολλά μέρη του κόσμου. Αυτή η παγκόσμια αυξητική τάση των λοιμώξεων από CA-MRSA έχει επιβεβαιωθεί και στον ελληνικό παιδιατρικό πληθυσμό με ένα ποσοστό που φτάνει στο 44% (Niniou et al. 2008). Η προέλευση των στελεχών CA-MRSA αρχικά ήταν υπό αμφισβήτηση, πιστεύοντας ότι είχαν διαδοθεί από νοσοκομειακούς ασθενείς στην κοινότητα. Τελευταίες επιδημιολογικές και μοριακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα στελέχη αυτά έχουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών φαινοτυπικών (ευαισθησία στα αντιβιοτικά) και γονιδιακών χαρακτηριστικών (Kaplan et al. 2006, Crawford et al. 2005). Φαίνεται ότι τα CA-MRSA στελέχη δεν προέρχονται από νοσοκομειακά στελέχη αλλά από ευαίσθητους στην μεθικιλλίνη σταφυλόκοκκους οι οποίοι απέκτησαν γονίδια ανθεκτικότητας. Ένας κλωνικός πληθυσμός που ονομάζεται USA-300 έχει γίνει ο κυρίαρχος, με παρουσία στις περισσότερες κοινότητες των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Tenover et al. 2009). Πολλά από αυτά τα στελέχη παράγουν μία πρωτεΐνη, την Panton Valentine Leukocidin (PVL), η οποία σχετίζεται με μια τάση να παράγουν αποστήματα, να είναι διεισδυτικά και να προκαλούν θρομβώσεις με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα (Long et al. 2010). Τα υψηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι της PVL δεν είναι προστατευτικά. Ο ρόλος της PVL και άλλων παραγόντων ιστικής βλάβης που παράγονται από τον *S. aureus* παραμένει υπό έρευνα. Η πρόσφατη αναφορά στελεχών που είναι ενδιάμεσα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη σε νοσοκομειακούς

ασθενείς, υποδηλώνει την πιθανότητα να προκύψει πλήρης αντοχή στη βανκομυκίνη, αν και αυτό δεν έχει ακόμη συμβεί στον παιδιατρικό πληθυσμό (Zheng et al. 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα απομονωθέντα στελέχη με ενδιάμεση αντοχή στη βανκομυκίνη ήταν από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε παρατεταμένη θεραπεία με βανκομυκίνη. Πρόσφατα έχουν περιγραφεί νέα γονίδια mec και χρωμοσωμικές κασέτες σε ανθρώπινους πληθυσμούς και βοοειδή (Shore et al. 2011, García-Álvarez et al. 2011), γεγονός που υποδηλώνει ότι το θέμα της μικροβιακής αντοχής συνεχίζει να εξελίσσεται.

ΠΡΟΛΗΨΗ

Μια μεγάλη μελέτη σε ενήλικες νοσηλευόμενους ασθενείς έδειξε ότι η καθολική επιτήρηση, η κατάλληλη χρήση των προφυλάξεων επαφής, η υγιεινή των χεριών και η αλλαγή νοοτροπίας μπορεί να μειώσει τις λοιμώξεις από MRSA 29 (Jain et al. 2011). Οι γονείς των παιδιών με λοίμωξη πρέπει να ζητούν πρόσθετες πληροφορίες και εκπαίδευση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πληθυσμός: Η ομάδα που ερευνήθηκε αποτελείτο από 128 νεογνά και τις μητέρες τους που γεννήθηκαν στο Βενιζέλειο-Πανάνειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης κατά την χρονική περίοδο Νοεμβρίου 2005 - Μαΐου 2006. Από τα 128 νεογνά τα 98 προέρχονταν από την μαιευτική κλινική και ήταν φαινοτυπικά υγιή, ενώ τα 30 προέρχονταν από τη Μονάδα Νεογνών. Τα 63 ήταν άρρενα και τα 65 θήλεα νεογνά. Οι μητέρες είχαν μέσο όρο ηλικίας κύησης 38w και οι 77 τόκοι πραγματοποιήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό. Ο μέσος όρος του βάρους γέννησης ήταν 3.15 Kg, ενώ τα 69 από τα 128 νεογνά θήλασαν για τουλάχιστον 1 μήνα είτε αποκλειστικά είτε με μικτή διατροφή, με μέσο όρο θηλασμού τους 3 μήνες. Ο μέσος όρος ηλικίας των μητέρων ήταν τα 28 έτη και οι 23 μητέρες είχαν αλλοδαπή εθνικότητα.

Δειγματοληψία: Η διαλογή των μητέρων-νεογνών έγινε τυχαιοποιημένα μέσω του μητρώου του μαιευτηρίου μετά από επικοινωνία από τον ίδιο τον ερευνητή πριν την έξοδο του νεογέννητου από το μαιευτήριο ή την Μονάδα Νεογνών. Η πρώτη δειγματοληψία στα νεογνά και τις μητέρες τους από το μαιευτήριο έγινε κατά την έξοδο από την μαιευτική κλινική (3η-4η συνήθως ημέρα ζωής), ενώ ακολούθησαν επαναληπτικές λήψεις κατά τον έκτο και δωδέκατο μήνα. Αντίστοιχα στα νεογνά και τις μητέρες τους από την Μονάδα Νεογνών το πρώτο δείγμα πάρθηκε στην έξοδο και ακολούθησαν επαναληπτικές λήψεις κατά τον έκτο και δωδέκατο μήνα. Τα βρέφη που είχαν λάβει αντιβιοτικά τουλάχιστον 2 ημέρες πριν την λήψη του δείγματος αποκλείστηκαν από την έρευνα.

Συνέντευξη, ενημέρωση, συμπλήρωση ερωτηματολογίου, δειγματοληψίες: Έγινε γνωριμία και ενημέρωση των γονέων για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης. Καταγράφηκαν πληροφορίες για την υγεία της μητέρας και του εμβρύου κατά την κύηση, τον τοκετό, την πρόθεση της μητέρας να θηλάσει, καθώς και δημογραφικά στοιχεία. Ζητήθηκε η συνεργασία των γονέων για την λήψη νέων δειγμάτων στον 6ο και 12ο μήνα ενώ λήφθηκαν επιπρόσθετες πληροφορίες κατά την επανεξέταση (όπως χορήγηση αντιβιοτικών, επεισόδια λοιμώξεων, εισαγωγή σε Νοσοκομείο, φοίτηση σε βρεφικό σταθμό). Ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση από τους γονείς και συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο (Παράρτημα 2-3). Όλες οι πληροφορίες παρέμειναν αποκλειστικά στην διάθεση του κύριου ιατρού-ερευνητή και διαχειρίστηκαν με όλους τους κανόνες του ιατρικού απορρήτου. Όλα τα δεδομένα καταχωρήθηκαν υπό μορφή κωδικού για κάθε βρέφος-μητέρα και ο κωδικός ήταν γνωστός μόνο στην ερευνητική ομάδα. Τα ρινικά δείγματα ελήφθησαν με αποστειρωμένο στυλεό, με περιστροφικές κινήσεις και από τους δύο πρόσθιους ρώθωνες την ίδια χρονική στιγμή από το βρέφος και την μητέρα του. Η οικογένεια του βρέφους ενημερωνόταν ανελλιπώς για τα αποτελέσματα της καλλιέργειας του ρινικού επιχρίσματος και για την κλινική σημασία των τυχών θετικών αποτελεσμάτων. Το πρωτόκολλο της μελέτης είχε λάβει την έγκριση από τις αντίστοιχες επιστημονικές επιτροπές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, του Βενιζέλειου-Πανάνειου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Παράμετροι της μελέτης: Μελετήθηκε μια σειρά από παράγοντες που σχετίζονται με το βρέφος και το στενό του περιβάλλον κατά τον πρώτο χρόνο ζωής. Τα βασικά επιδημιολογικά στοιχεία ήταν το φύλο, η εθνικότητα, το βάρος γέννησης, η ηλικία κύησης και το είδος τοκετού. Η φορία της μητέρας ήταν η κυριότερη παράμετρος που μελετήσαμε λόγω της πολύ συχνής επαφής κατά τη βρεφική ηλικία. Επίσης ο αριθμός της οικογένειας συμπεριλαμβανομένου των γονέων των αδελφών και άλλων μελών που μένουν μόνιμα κάτω από την ίδια στέγη ερωτήθηκαν στο ερωτηματολόγιο. Προσπαθώντας να συσχετίσουμε την φορία με τον θηλασμό, το κάπνισμα (είτε των μητέρων είτε των πατέρων) και την εισαγωγή σε παιδιατρική κλινική κατά την διάρκεια της παρακολούθησης, ερευνήσαμε τον συνολικό χρόνο θηλασμού σε μήνες (αποκλειστικό ή μεικτό), το κάπνισμα της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη και μετά τη γέννηση, το κάπνισμα του πατέρα, το αριθμό και λόγο εισαγωγής σε παιδιατρική κλινική και τη χρήση αντιβιοτικών κατά την διάρκεια νοσηλείας. Η χρήση αντιβιοτικών κατά την εγκυμοσύνη στη μητέρα αλλά και στα βρέφη κατά το πρώτο έτος της ζωής για οποιοδήποτε λόγο ρωτήθηκαν στην αρχή της μελέτης στο ερωτηματολόγιο αλλά και κατά την τελευταία επίσκεψη τον πρώτο χρόνο. Επίσης μελετήσαμε το μορφωτικό επίπεδο των γονέων σε συνολικά χρόνια εκπαίδευσης αλλά και το ποσοστό των μητέρων που δούλευαν κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης σε μήνες (Παράρτημα 1). Τα Βασικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Βασικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης.

Χαρακτηριστικά	**Αποτελέσματα**
Βρέφος	
Φύλλο (Άρρεν-Θήλυ)	63; 65
Ηλικία κύησης (Μ.Ο.-Εύρος)	38; 30-40
Είδος τοκετού (Φ.Τ.-Κ.Τ.)	77; 51
Βάρος γέννησης (Μ.Ο.-Εύρος)	3.15; 1.04-4.5
Βρέφη που θήλασαν (Ναι-Όχι)	69; 32
Χρόνος θηλασμού σε μήνες (Μ.Ο.)	3; 0-12
Μητέρα	
Εθνικότητα (Ελληνική - Αλλοδαπή)	105; 23
Ηλικία (Μ.Ο.-Εύρος)	28; 19-42
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (Μ.Ο.-Εύρος)	11; 0-18
Αντιβιοτικά στην εγκυμοσύνη/τοκετό (Ναι-Όχι)	32; 96
Εργασία στην εγκυμοσύνη (Ναι-Όχι)	56; 72
Κάπνισμα (Ναι-Όχι)	37; 70
Πατέρας	
Ηλικία (Μ.Ο.-Εύρος)	32; 21-44
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (Μ.Ο.-Εύρος)	10; 0-18
Κάπνισμα (Ναι-Όχι)	61/42
Οικογένεια	
Μέλη (Μ.Ο.; SEM)	4; 3-8

Ρινικά επιχρίσματα, καλλιέργειες, ταυτοποίηση και δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Τα ρινικά επιχρίσματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε μέσο συντήρησης και μεταφοράς (Biomerieux, Marcy L'Etoile, Γαλλία) και παρέμειναν σε θερμοκρασία 2-4°C μέχρι την επεξεργασία τους. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά τρυβλία καλλιέργειας με μαννιτόλη και αιματούχο άγαρ 5% (Chapman και Blood). Οι μικροοργανισμοί επωάστηκαν σε κλίβανο για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C και για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αναγνώριση του *S. aureus* έγινε με βάση την μορφολογία των αποικιών, τη χρώση κατά Gram, και τη δοκιμασία καταλάσης-κοαγκουλάσης. Για την ταυτοποίηση των στελεχών του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος API Staph 20 (Biomerieux) με επώαση σε κλίβανο για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Η δοκιμασία ευαισθησίας έγινε με τη μέθοδο αναστολής ανάπτυξης σε αντιβιοτικά δισκία οξακιλλίνης, ερυθρομυκίνης και κλινδαμυκίνης με επώαση σε τρυβλία Müller-Hinton σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια των Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI). Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στη μεθικιλλίνη, χρησιμοποιήθηκε η οξακιλλίνη δεδομένου ότι είναι πιο ανθεκτική στην αποδόμηση κατά την αποθήκευση.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Τα στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν γονιδιακά χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού SmaI. Τα βακτηρίδια επωάστηκαν όλη την νύκτα σε 5 ml ζωμού από εκχύλισμα εγκεφάλου και 0.2 ml ζωμού καλλιέργειας (οπτική πυκνότητα, 0.55–0.7 στα 610nm) και έγινε συγκομιδή με φυγοκέντρηση (7.000rpm για 2 λεπτά). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν σε 0.4ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος TEN (0.1M Tris Cl, 0.15M NaCl, 0.1M EDTA), φυγοκεντρήθηκαν και τέθηκαν σε αιώρημα με 0.2ml στείρου ρυθμιστικού

διαλύματος EC (6mM TrisCl, 1M NaCl, 0.1M EDTA, 0.5% Brij 58, 0.2% deoxycholate, 0.5% Sarkosyl). Έπειτα ενσωματώθηκαν σε 0,6ml αγαρόζης 0,9% (pulsed field certified agarose, Biorad) που περιέχει 4μg lysostaphin (Sigma-Aldrich). Το εναιώρημα αναμείχτηκε ήπια, και μεταφέρθηκε με δοκιμαστικό σωλήνα σε ένα καλούπι για να στερεοποιηθεί για περίπου 10 λεπτά πριν την τοποθέτηση του σε ένα σωλήνα που περιέχει 3ml ρυθμιστικού διαλύματος EC. Η κυτταρική λύση επιτεύχθηκε στους 37°C για 4 ώρες και το δείγμα ξεπλύθηκε 4 φορές σε 3ml ρυθμιστικού διαλύματος TE (10mM TrisCl, 0.5mM EDTA) για 1 ώρα στους 55°C και μετά μεταφέρθηκε σε 5ml φρέσκου ρυθμιστικού διαλύματος TE για αποθήκευση στους 4 °C. Για την ηλεκτροφόρηση, το δείγμα κόπηκε σε μικρές φέτες των 2-5mm. Κάθε κομμάτι σταθεροποιήθηκε σε 150μl περιοριστικού ρυθμιστικού διαλύματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε 150μl μίγματος με περιοριστικό ένζυμο που περιέχει 50U SmaI (Takara). Μετά από 4 ώρες επώασης στους 30°C, το δείγμα τοποθετήθηκε σε γέλη αγαρόζης 1% (Biorad) και διενεργήθηκε η ηλεκτροφόρηση με την συσκευή CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Καναδάς) σε 0.5x Tris-borate-EDTA ρυθμιστικού διαλύματος. Οι παράμετροι της ηλεκτροφόρησης αποτελούνταν από χρονικούς παλμούς 5-40sec σε 6 V/cm για 20 ώρες στους 14°C.

Multi locus sequence typing (ST). Το βακτηριδιακό DNA εξήχθη μέσω της τυποποιημένης συσκευασίας καθαρισμού DNA της GFX (Amersham Bioscience). Η αλληλουχία διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας τη τυποποιημένη συσκευασία αλληλουχίας Thermo Sequenase Primer Cycle (GE Healthcare). Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην ιστοσελίδα http://www.mlst.net εκτός από το ότι επεκτάθηκαν στο τέλος 5' με την αλληλουχία

εκκινητών T7-TATAATACGACTCACTATAGGG και M13 reverse–TACAGGAAACAGCTATGACC. Η αλληλουχία των εκκινητών προσδιορίστηκε με τις ετικέτες φθορισμού 700IRD και 800IRD και τα τεμάχια αλληλουχίας αναλύθηκαν σε γέλη 60εκ. 6% RapidGel-XL (USB Cleveland ΗΠΑ) στον αυτοματοποιημένο αναλυτή αλληλουχίας LI-COR 4200 dual band. Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν για ανάλυση στην ιστοσελίδα http://www.mlst.net.

Ανίχνευση mecA. Η παρουσία του γονίδιου mecA προσδιορίστηκε με τη χρήση των εκκινητών PCR Sa5b-GCGATAATGGTGAAGTAG και Sa6b-TCTTGTAACGTTGTAACCAC με ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του γονιδίου 1.171-bp. Το PCR έγινε με PureTaq ready-to-go beads (GE Healthcare). Το στάδιο αποδιάταξης των 5 λεπτών στους 94°C ακολουθήθηκε από 30 κύκλους των 25sec στους 94°C, 25sec στους 55°C και 45sec στους 72°C. Το PCR έληξε με ένα στάδιο επιμήκυνσης των 7min στους 72°C. Τα προϊόντα του PCR διαχωρίστηκαν σε γέλη αγαρόζης 1% και οπτικοποιήθηκαν με υπεριώδες φως μετά από χρώση με Gel star (Cambrex Rockland USA).

Ανίχνευση του PVL. Η Παρουσία των γονιδίων lukS-PV και lukF-PV που κωδικοποιούν συστατικά του PVL προσδιορίστηκαν με τους εκκινητές ATCATTA-GGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3΄ (forward), και GCATCAAGTGTATTGGA-TAGCAAAAGC (reverse). Η τεχνική PCR και η οπτικοποίηση ήταν, παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε για το γονίδιο mecA.

Τυποποίηση Ribo και spa. Η γονιδιακή ανίχνευση και τυποποίηση έγινε με αυτοματοποιημένες μεθόδους ribotyping με Riboprinter (Qualicon Inc, Wilmington, DE) χρησιμοποιώντας EcoRI. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του

λογισμικού Qualicon. Η πολυμορφική Χ-περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Α (spa) ενισχύθηκε και προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Ridom StaphType (www.ridom.org). Το PCR πραγματοποιήθηκε με την πολυμεράση Platinum pfx Taq DNA (Invitrogen) σε 50ul διαλύματος που περιείχε 2.5mM MgSO4, 80nM από κάθε ένα εκκινητή, 200uM dNTPs και 1x ρυθμιστικό διάλυμα. Οι παράμετροι του PCR ήταν οι εξής: αποδιάταξη για 10min σε 95°C, 30 κύκλοι των 30sec σε 95°C, 30sec σε 60°C και 45sec σε 72°C και ένας κύκλος από 10 λεπτά σε 72°C. Όπως περιγράφηκε παραπάνω για το ST, οι εκκινητές επεκτάθηκαν με T7 και M13 αντίστροφο και η αλληλουχία έγινε όπως στο ST εκτός από το ότι οι αλληλουχίες αναλύθηκαν σε γέλη μήκους 45cm. Η τύποι spa που προέκυψαν τυποποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Ridom StaphType (Ridom GmbH, Würzburg, Germany). Η ανάλυση των τύπων spa βασίστηκε στον αλγόριθμο BURP όπως εφαρμόζεται στο λογισμικό Ridom StaphType (Strommenger et al 2006).

Στατιστική ανάλυση: Τα ζεύγη βρέφους-μητέρας που παρακολουθήθηκαν με επιτυχία και για τους 12 μήνες συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση της φορίας. Η ανάλυση συμπεριλάμβανε υπολογισμούς του λόγου πιθανοτήτων (odds ratios, OR). Το Fisher's exact test (2-tailed) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των κατανομών των κατηγοριοποιημένων μεταβλητών των ομάδων. Το Student's t-test (2-tailed) και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των συνεχών μεταβλητών. Τιμές *p* μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο GraphPad της Prism.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πληθυσμός. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείτο από 128 βρέφη εκ των οποίων υπήρχαν 4 σετ διδύμων με τις 124 μητέρες τους. Από τα 128 ζεύγη που συμμετείχαν, 82 (64.2%) ολοκλήρωσαν και τα 3 στάδια και 100 (78,1%) ολοκλήρωσαν τα δύο πρώτα στάδια παρακολούθησης. Από τα 128 βρέφη, 98 (76.6%) ήταν από το μαιευτήριο και 30 (23.4%) από την μονάδα νεογνών. Τα βρέφη από την μονάδα νεογνών ήταν μικρότερης ηλικίας κύησης (36.1 εβδομάδες έναντι 38.6 εβδομάδες; p <0.0001) και χαμηλότερου βάρους γέννησης (2.546gr έναντι 3.332gr; P <0.0001), και με συχνότερο είδος τοκετού την καισαρική τομή (70% έναντι 30.6%; OR: 5.29; 95% CI: 2.17-12.09; P <0.001). Ο πληθυσμός και τα στατιστικά χαρακτηριστικά του απεικονίζονται στον Πίνακα 2. Συνολικά 615 ρινικά επιχρίσματα ελήφθησαν από 310 ζεύγη βρέφους-μητέρας, συμπεριλαμβανομένων 10 περιπτώσεων δειγματοληψίας σε δίδυμα. Τρία είδη φορίας καθορίστηκαν, οι μη-φορείς σε περίπτωση που και τα 3 επιχρίσματα ήταν αρνητικά, διαλείπουσα φορία σε περίπτωση που 1 επίχρισμα ήταν θετικό, και επίμονη φορία σε περίπτωση που 2 ή 3 επιχρίσματα ήταν θετικά.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης.

Χαρακτηριστικά	**Όλα τα βρέφη N=128**	**Βρέφη από το Μαιευτήριο N=98**	**Βρέφη από Μονάδα Νεογνών N=30**	**Στατιστικά**
Βρέφος				
Φύλλο (άρρεν-θήλυ)	63; 65	47; 51	16; 14	ns
Ηλικία κύησης (διάμεση-εύρος)	38; 30-40	39; 36-40	37; 30-40	P <0.0001*
Είδος τοκετού (Φ.Τ.-Κ.Τ.)	77; 51	68; 30	9; 21	<0.0001; 5.29 (2.17-12.9)**
Βάρος γέννησης (διάμεσο-εύρος)	3.26; 1.04-4.5	3.32; 2.43-4.5	2.39; 1.04-4.36	P <0.0001***
Βρέφη που θήλασαν (%)	68.3% (69/101)	72.4% (55/76)	56% (14/25)	ns
Χρόνος θηλασμού σε μήνες, διάμεσος	2; 0-12	2; 0-12	2; 0-12	ns
Μητέρα				
Εθνικότητα (Ελληνική - Αλλοδαπή)	105; 23	79; 19	26; 4	ns
Ηλικία (διάμεση - εύρος)	28; 19-42	28; 19-40	29; 23-42	ns
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (διάμεσο - εύρος)	12; 0-18	12; 0-18	12; 6-16	ns
Αντιβιοτικά στην εγκυμοσύνη/τοκετό (%)	25%; 32/128	27.6%; 27/98	16.7%; 5/30	ns
Εργασία στην εγκυμοσύνη (%)	43.7; 56/128	44.9; 44/98	40%; 12/30	ns
Κάπνισμα (%)	34.6% (37/107)	33.8% (26/77)	36.7% (11/30)	ns
Πατέρας				
Ηλικία (διάμεση - εύρος)	32; 21-44	31; 21-42	32; 24-44	ns
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (διάμεσο - εύρος)	12; 0-18	12; 0-18	12; 6-16	ns
Κάπνισμα (%)	59.2% (61/103)	60.3% (44/73)	56.7% (17/30)	ns
Οικογένεια				
Μέλη (μέση τιμή; SEM)	4; 3-8	5.03; 0.20	3.81; 0.09	P <0.0001****

* 36.1 ± 0.54 vs. 38.6 ± 0.11
** Κ.Τ. συχνότερη στη Μονάδα Νεογνών
*** 2546 ± 157 vs. 3332 ± 45.3
**** 5.03 ± 0.20 vs. 3.81 ± 0.09

Φορία *S. aureus* καθ' όλη τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής. Θετικά για στελέχη *S. aureus* ήταν 55 (17.7%) δείγματα από βρέφη (44 από το Μαιευτήριο και 11 από το Τμήμα Νεογνών) και 47 (15.4%) δείγματα από τις μητέρες (36 από το Μαιευτήριο και 11 από το Τμήμα Νεογνών). Τα ποσοστά φορίας του *S. aureus* στα βρέφη και τις μητέρες τους είχαν θετική συσχέτιση (Pearson r: 0.261; P: 0.003). Ζεύγη βρέφους-μητέρας με ταυτόχρονη φορία βρέθηκαν σε 15 περιπτώσεις (4.8%), σχεδόν διπλάσιο από το ποσοστό που αναμένεται από την τύχη (8.3 ζεύγη, 2.7%). Από τα βρέφη που οι μητέρες τους ήταν φορείς τα 15/47 (31.9%) ήταν φορείς και αυτά, ενώ μόνο τα 40/263 (15.2%) βρέφη με μητέρες μη-φορείς ήταν φορείς (OR 2.61, 95% CI: 1.30 -5.26 P: 0.008). Η μόνη τεκμηριωμένη περίπτωση σταφυλοκοκκικής λοίμωξης σε ένα βρέφος κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης (μία περίπτωση οστεομυελίτιδας), δεν είχε σχέση με προηγούμενη φορία από *S. aureus*.

Φορία *S. aureus* στους μήνες 0, 6, και 12. Στην πρώτη λήψη επιχρίσματος την πρώτη εβδομάδα της ζωής, φορία βρέθηκε σε 20/128 (15.6%) νεογνά και σε 13/124 (10.5%) μητέρες. Επιχρίσματα τον 6^{ο} μήνα λήφθηκαν σε 100/128 (78.1%) ζεύγη βρέφους-μητέρας (3 σετ διδύμων) και βρέθηκε φορία σε 22 (22%) βρέφη και σε 23 (23.7%) μητέρες. Επιχρίσματα τον 12^{ο} μήνα λήφθηκαν σε 82/128 (64.1%) ζεύγη βρέφους-μητέρας (3 σετ των διδύμων) και βρέθηκε φορία σε 13 (15.9%) βρέφη και 11 (13.9%) μητέρες. Η σχέση μεταξύ βρεφικής και μητρικής φορίας, καπνίσματος της μητέρας και του αριθμού των αδελφών στην οικογένεια απεικονίζεται στον πίνακα 3. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις για τις υπόλοιπες μεταβλητές και στις 3 δειγματοληψίες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Σχέση μεταξύ αποικισμού από *S. aureus* στα βρέφη και του αποικισμού των μητέρων, το κάπνισμα και τον αριθμό των αδελφών στην οικογένεια.

Αποικισμένα βρέφη	**Αποικισμένες Μητέρες**		**Κάπνισμα Μητέρας**		**Αριθμός Αδελφών**	
	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Αποικ. Βρέφη	Μη αποικ. Βρέφη
1η Εβδομάδα	23.1%[ns]	14.8%	5.41%[a]	24.3%	1.33[ns]	0.94
6ο Μήνα	39.1%[b]	16.9%	16.2%[ns]	25.4%	1.01[ns]	0.95
12ο Μήνα	27.3%[ns]	14.1%	21.2%[ns]	6.67%	1.62[c]	0.94

[a] Ο αποικισμός από *S. aureus* είναι πιο συχνός στα βρέφη που οι μητέρες τους δεν καπνίζουν (OR 4.37, 95% CI 0.94 to 20.4; P 0.049).

[b] Ο αποικισμός από *S. aureus* είναι πιο συχνός στα βρέφη που οι μητέρες τους είναι αποικισμένες (OR 3.02; 95% CI 1.08 to 8.44; P 0.045).

[c] Ο αποικισμός από *S. aureus* είναι πιο συχνός στα βρέφη με περισσότερα αδέλφια (P 0.028).

[ns] χωρίς σημαντικές διαφορές.

Φορία *S. aureus* στο πρώτο έτος της ζωής. Από τα 82 βρέφη που ελήφθησαν και τα 3 δείγματα, 47 (57.3%) ήταν επίμονοι μη-φορείς, 23 (28%) βρέφη είχαν θετική καλλιέργεια μία φορά, και 12 (14.6%) είχαν τουλάχιστον δύο φορές θετικές καλλιέργειες. Από τα τελευταία βρέφη, ένα βρέφος (1.2%) είχε θετική καλλιέργεια και στα 3 δείγματα. Από τις 79 μητέρες που ελήφθησαν και τα 3 επιχρίσματα, 53 (67.1%) ήταν μη-φορείς, 15 (19%) είχαν θετική καλλιέργεια μία φορά και 11 (13.9%) είχαν τουλάχιστον δύο φορές θετικές καλλιέργειες. Από τις τελευταίες τέσσερις μητέρες (5.1%) είχαν θετική καλλιέργεια και στα 3 επιχρίσματα.

Στην ομάδα των 82 ζευγαριών βρέφους-μητέρας με 12μήνη παρακολούθηση, τα ποσοστά φορίας στα βρέφη σε κάθε δειγματοληψία είχαν θετική σχέση με τα ποσοστά της μητρικής φορίας (Pearson r: 0.246; P: 0.026) και με τις μητέρες που δεν κάπνιζαν (53.8% vs. 23.3%; OR: 3.83, 95% CI: 1.40-10.5; P: 0.010). Τα ποσοστά επίμονης φορίας ήταν υψηλότερα στα βρέφη που γεννήθηκαν από μητέρες που δεν κάπνιζαν (29.4% vs. 8.0%; OR: 4.79, 95% CI: 0.95-24.3; P: 0.054) και με περισσότερα αδέλφια (1.75 vs 1.01, P: 0.044). Η παλινδρομική λογιστική ανάλυση επιβεβαίωσε την επίδραση του καπνίσματος της μητέρας και της μητρικής φορίας αλλά όχι του αριθμού των αδελφών στην επίμονη φορία στα βρέφη (P: 0.028, P: 0.023 και P: 0.077 αντίστοιχα) (Πίνακας 4).

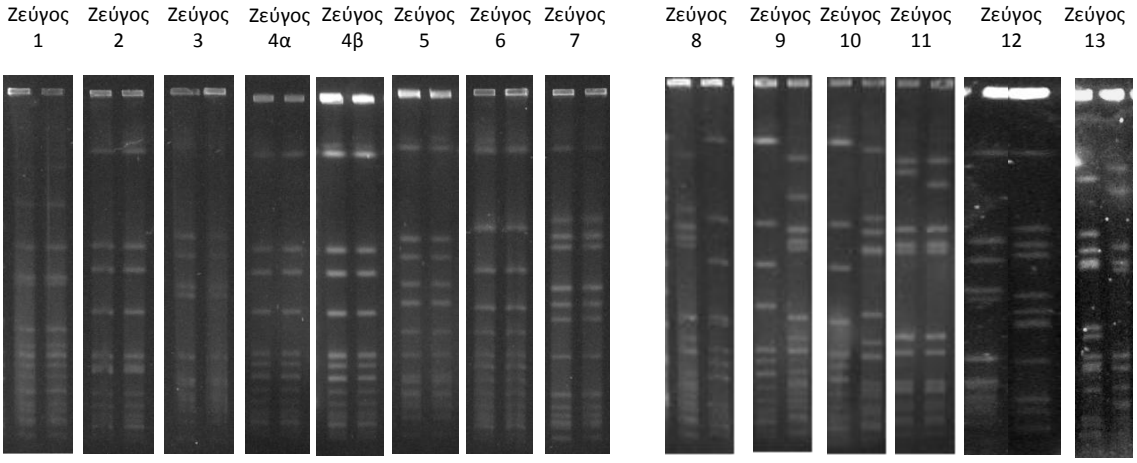
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Φορία σε 82 βρέφη στον μήνα 0, 6 και 12.

	Μη-φορέας N=47	**Διαλείπων φορέας N=23**	**Επίμονα Φορέας N=12**
Βρέφος			
Φύλλο (Άρρεν-θήλυ)	26; 21	9; 14 ns	8; 4 ns
Είδος τοκετού (Φ.Τ.-Κ.Τ.)	29; 18	18; 5 ns	6; 6 ns
Βάρος γέννησης (διάμεσος-Εύρος)	3.10; 1.04-4.25	3.51; 1.83-3.95	3.13; 1.75-4.36 ns
Μαιευτήριο/Μονάδα Νεογνών	33; 14	19; 4	9; 3 ns
Βρέφη που θήλασαν (%)	33; 14	19; 4 ns	6; 6 ns
Χρόνος θηλασμού σε μήνες, διάμεσος	2; 0-12	2; 0-12	1; 0-9 ns
Ηλικία κύησης (διάμεσος-Εύρος)	38; 30-40	39; 34-40	37; 34-40 ns
Μητέρα			
Εθνικότητα (Ελληνική - Αλλοδαπή)	40; 7	19; 4 ns	10; 2 ns
Ηλικία (Μ.Ο. - Εύρος)	29; 20-42	28; 19-35	30; 23-37 ns
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (διάμεσος - Εύρος)	12; 0-16	12; 6-16	12; 6-15 ns
Αντιβιοτικά στην εγκυμοσύνη/τοκετό (Ναι-Όχι)	14; 33	8; 15 ns	2; 10 ns
Εργασία στην εγκυμοσύνη (Ναι-Όχι)	26; 21	10; 13 ns	6; 6 ns
Κάπνισμα (Ναι-Όχι)	23; 24	5; 18*	2; 10 ***
Αποικισμός από *S. aureus* (Ναι-Όχι)	12; 35	9; 14	5; 7 ns
Πατέρας			
Ηλικία (Μ.Ο. - Εύρος)	32; 21-44	33; 25-39	34; 28-38 ns
Μορφωτικό επίπεδο σε έτη (διάμεσος - Εύρος)	12; 0-16	9; 6-16	12; 6-12 ns
Κάπνισμα (Ναι-Όχι)	29; 16	15; 7 ns	6; 6 ns
Οικογένεια			
Μέλη (Μ.Ο.; SEM)	4; 3-7	4.15;	4.92; **

*σε σχέση με τους μη-φορείς p 0.039; OR 0.29 (0.09-0.91)
** σε σχέση με τους μη-φορείς Mann Whitney 0.066; t-test 0.038, 1t 0.019
*** σε σχέση με τους μη-φορείς p 0.054; OR 0.21 (0.041-1.06)

Ταυτόχρονη φορία στο βρέφος και τη μητέρα. Από τα 82 βρέφη που ελήφθησαν και τα 3 δείγματα, τα 35 είχαν τουλάχιστον ένα θετικό επίχρισμα με συνολικά 48 θετικά επιχρίσματα. Σε 15 από αυτά τα 35 βρέφη (42.9%), η μητέρα βρέθηκε ταυτόχρονα αποικισμένη τουλάχιστον μία φορά. Υπήρχε σημαντικός βαθμός αντιστοιχίας της φορίας μεταξύ των μητέρων και των βρεφών με 15/48 ζευγάρια (31.2%). Μόνο σε 5 περιπτώσεις το βρέφος δεν ήταν φορέας παρότι η μητέρα ήταν επίμονη φορέας. Από τα απομονωμένα στελέχη, τα 15 ταυτόχρονα θετικά ζεύγη βρέφους-μητέρας τυποποιήθηκαν και βρέθηκε να είναι γονιδιακά όμοια τα 8 ζεύγη (53.3%, Εικόνα 1). Σε 2 επιπλέον θετικά ζεύγη τα ίδια γονιδιακά βακτηρίδια παρατηρήθηκαν στα βρέφη και τις μητέρες τους σε διαφορετική χρονική περίοδο. Όλα τα ίδια στελέχη *S. aureus* που βρέθηκαν στο βρέφος-μητέρα ήταν χωρίς ιστορικό εισαγωγής σε τμήμα νεογνών και σχεδόν όλα (7/8) παρατηρήθηκαν στην δειγματοληψία του 6^{ου} μήνα. Και τα δύο βρέφη με επίμονη φορία από το ίδιο στέλεχος, συμπεριλαμβανομένου εκείνου με 3 θετικά δείγματα, είχαν μητέρες αποικισμένες από το ίδιο στέλεχος (MRSA, PFGE 2b, ST 30 και MRSA, PFGE 2e, ST 30, αντίστοιχα).

ΕΙΚΟΝΑ 1: Απεικόνιση PFGE των 8 όμοιων ζευγαριών βρέφους – μητέρας (1-7) και των 6 όχι-όμοιων (8-13) *S aureus* που απομονωθήκαν την ίδια χρονική στιγμή.



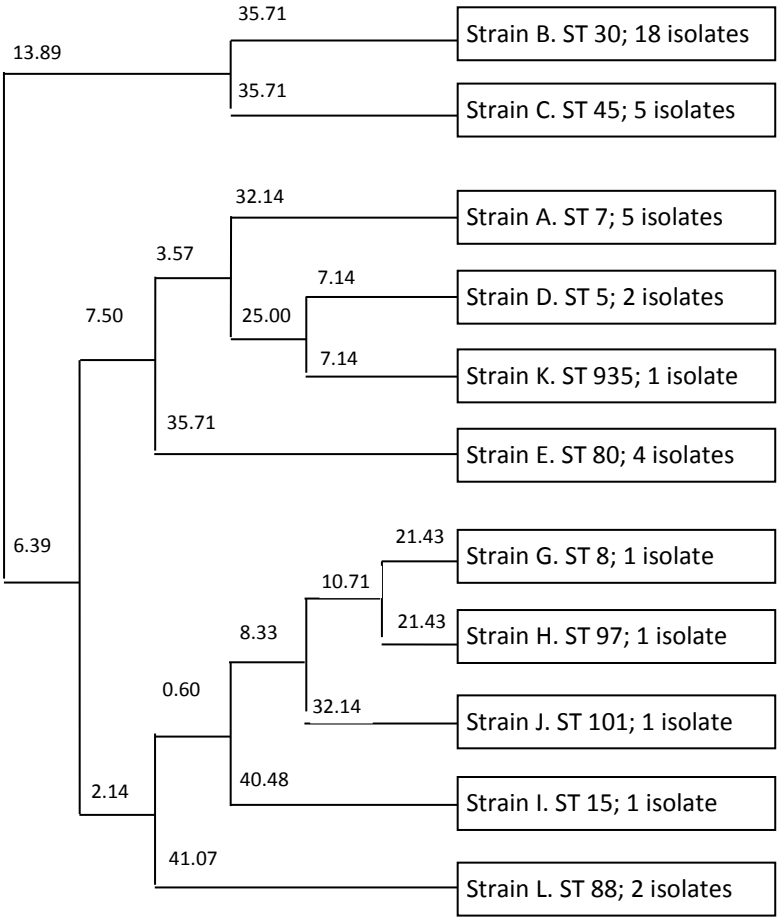
Γενετικοί παράγοντες. Γενετικοί καθοριστικοί παράγοντες διερευνήθηκαν σε 41 στελέχη, σε όλα τα 15 θετικά ζεύγη μητέρας-παιδιού, και σε όλα τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν στα ίδια 15 ζεύγη μητέρας-παιδιού, αλλά σε διαφορετική χρονική περίοδο. Η γενετική συγγένεια των στελεχών φαίνεται στην Εικόνα 1 και τον Πίνακα 5. Τα απομονωμένα στελέχη από τα βρέφη ανήκαν κυρίως στους τύπους ST 30 (8/19) και τύπους PFGE 2 (6/19). Επιπλέον, 10/19 περιείχαν το γονίδιο mecA και 2/19 το γονίδιο PVL. Και τα δύο PVL θετικά όπως και τα 8/10 mecA θετικά στελέχη από τα βρέφη είχαν θετική συσχέτιση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις μητέρες τους. Όλα τα PVL θετικά στελέχη ήταν και mecA θετικά και ανήκαν στον τύπο ST 80. Χαρακτηριστικό εύρημα ήταν ότι σε 2 ζεύγη ταυτόχρονα θετικά δείγματα στο 6^{ο} μήνα με όμοια γενετικά στελέχη, η μητέρα ήταν επίσης φορέας με το ίδιο στέλεχος και στο πρώτο δείγμα, ενώ το παιδί της δεν είχε θετική καλλιέργεια. Το δενδρόγραμμα που δείχνει την γενετική συγγένεια των στελεχών του *S. aureus* εμφανίζεται στην Εικόνα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Γονιδιακή ταυτοποίηση των στελεχών *S. aureus*.

ID Infant / ID Mother	Ribo	Mec	PVL	PFGE	MLST	Spa
ΒΚ7Ν / ΒΚ7Μ	4015 / 4011	- / -	- / -	2a / 1a	30 / 7	t021 / t091
ΓΚ7Ν / ΓΚ7Μ	ND / ND	- / -	- / -	11b / 1b	101 / 7	ND / ND
/ ΒΚ13Μ	/ 4017	/ -	/ -	/ 11a	/ 97	/ ND
ΒΚ19Ν /	4011 /	- /	- /	1a /	7 /	t091 /
ΒΚ27Ν / ΒΚ27Μ	4036 / 4036	- / -	- / -	4 / 4	88 / 88	t1490 / t1490
ΒΚ29Ν / ΒΚ29Μ	4042 / 4042	- / -	- / -	5 / 5	45 / 45	t015 / t015
/ ΓΚ29Μ	/ ND	/ -	/ -	/ 5	/ (45)	/ ND
ΑΚ32Ν / ΑΚ32Μ	14103 / 4015	- / +	- / -	10 / 2d	8 / 30	ND / t021
/ ΓΚ32Μ	/ ND	/ -	/ -	/ ND	/ 935	/ ND
/ ΑΚ40Μ	/ ND	/ +	/ -	/ 3	/ (30)	
ΒΚ40Ν / ΒΚ40Μ	4015 / 4015	+ / +	- / -	3 / 3	30 / 30	t018 / t018
/ ΓΚ40Μ	/ ND	/ +	/ -	/ 3	/ (30)	/ ND
ΑΚ42Ν / ΑΚ42Μ	4015 / 4015	+ / +	- / -	2e / 2e	30 / 30	ND / t253
ΒΚ42Ν / ΒΚ42Μ	14211 / 14211	+ / +	- / -	2e / 2e	30 / 30	ND / t253
ΓΚ42Ν / ΓΚ42Μ	ND / ND	+ / +	- / -	ND / 2e	30 / 30	ND / ND
ΑΚ57Ν / ΑΚ57Μ	4014 / 4014	+ / +	- / -	8b / 8a	5 / 5	t548 / t548
ΒΚ57Ν / ΒΚ57Μ	4042 / 4042	- / -	- / -	7 / 7	45 / 45	ND / t339
/ ΑΚ64Μ	/ ND	/ +	/ -	/ 2b	/ (30)	/ ND
ΒΚ64Ν / ΒΚ64Μ	4015 / 4015	+ / +	- / -	2b / 2b	30 / 30	ND / t018
ΓΚ64Ν /	ND /	+ /	- /	2b /	30 /	ND /
ΒΚ71Ν / ΒΚ71Μ	16421 / 16421	+ / +	+ / +	6 / 6	80 / 80	ND / t044
ΑΚ82Ν /	ND /	+ /	- /	2c /	30 /	ND /
ΒΚ82Ν / ΒΚ82Μ	4011 / 4015	- / +	- / -	1b / 2c	7 / 30	t091 / ND
ΑΚ89Ν /	4034 /	- /	- /	9 /	15 /	ND /
/ ΑΚ91Μ	/ 4011	/ -	/ -	/ 1a	/ 7	/ ND
ΓΚ92Ν / ΓΚ92Μ	ND / ND	+ / +	+ / +	6 / 5	80 / 80	ND / ND

[1] ND : στελέχη που δεν πραγματοποιήθηκε η μελέτη
[2] Οι τύποι ST σε παρένθεση υποδεικνύει παραλλαγή με μια μετάλλαξη σε ένα αλλήλιο.

ΕΙΚΟΝΑ 3: Το δενδρόγραμμα δείχνει την γενετική συγγένεια των στελεχών του *S. aureus* όπως συνάγεται από τις αλληλουχίες των 7 αλληλίων που χρησιμοποιήθηκαν στο ST. Τα απομονωμένα στελέχη διανεμήθηκαν σε 11 ομάδες. Από τα 41 απομονωμένα στελέχη τα 23 συγκεντρώνονται στην πρώτη ομάδα (περιλαμβάνει το στέλεχος B ST 30 και στο στέλεχος C ST 45). Από τα εναπομείναντα 18 στελέχη 12 συγκεντρώνονται στη υποομάδα 2 (στελέχη A, D, K, E) και 6 στην υποομάδα 3 (στελέχη G, H, I, J, L).



Αντίσταση στα αντιβιοτικά. Τα ποσοστά αντοχής στη μεθικιλλίνη, ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη ήταν 43.6%, 5.4% και 3.6% αντίστοιχα, στα απομονωμένα στελέχη από βρέφη και 42.5%, 8.5%, και 0% στα απομονωμένα από τις μητέρες (Πίνακας 6). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην αντίσταση μεταξύ στελεχών από τα βρέφη και τις μητέρες. Η πλειονότητα των ανθεκτικών στελεχών στην ερυθρομυκίνη (4/6) ήταν ανθεκτικά και στη μεθικιλλίνη. Αντίσταση στη μεθικιλλίνη ήταν πιο συχνή στα απομονωμένα στελέχη των βρεφών από το τμήμα νεογνών σε σχέση τα στελέχη από το μαιευτήριο (72.7% vs. 36.4; OR: 4.67, 95% CI: 1.08-20.1; P: 0.042).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αντίσταση των απομονωμένων στελεχών στην μεθικιλλίνη, ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη.

	Αριθμός N	Μεθικιλλίνη N (%)	Ερυθρομυκίνη N (%)	Κλινδαμυκίνη N (%)	Statistics
Σύνολο *S. aureus*	102	44 (43.1)	7 (6.9)	2 (2)	
Βρέφη	55	24 (43.6)	3 (5.4)	2 (3.6)	
Μητέρες	47	20 (42.5)	4 (8.5)	0 (0)	
Βρέφη από μαιευτήριο	44	16 (36.4)	3 (6.8)	2 (4.5)	
Βρέφη από Μονάδα Νεογνών	11	8 (72.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.042; 4.67 (1.08-20.1)
Βρέφη με Φ.Τ.	37	16 (43.2)	2 (5.4)	1 (2.7)	
Βρέφη με Κ.Τ.	18	8 (44.4)	1 (5.5)	1 (5.5)	
Μητέρες με Φ.Τ.	33	15 (45.4)	2(6.1)	0 (0.0)	
Μητέρες με Κ.Τ.	14	5 (35.7)	2 (14.3)	0 (0.0)	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματά μας προέρχεται από μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης ζευγαριών βρέφους-μητέρας από τη γέννηση μέχρι το πρώτο έτος ζωής με μεσοδιαστήματα 6 μηνών. Παρακολουθώντας την ανάπτυξη της φορίας από τον *S. aureus* σε νεογνά που γεννήθηκαν σε θεωρητικά στείρο περιβάλλον, μελετήσαμε τα ποσοστά φορίας τόσο στα βρέφη όσο και στις μητέρες την ίδια χρονική στιγμή, τη σχέση της φορίας των βρεφών με τη φορία της μητέρας τους την ίδια χρονική στιγμή, τα ποσοστά ανθεκτικότητας καθώς και την παρουσία λοιμογόνων παραγόντων σε στελέχη της κοινότητας. Προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε τον αποικισμό στα βρέφη με διάφορους παράγοντες από το περιβάλλον και συγκρίναμε τη φορία και την ανθεκτικότητα με στελέχη που απομονώσαμε από Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών.

Είναι γνωστό ότι ο άνθρωπος είναι η φυσική δεξαμενή για τον *S. aureus* και ότι η μετάδοση του γίνεται κυρίως μέσω άμεσης επαφής με άτομα φορείς. Στην διεθνή βιβλιογραφία συχνά αναφέρεται ο σημαντικός ρόλος του ξενιστή στη φορία του *S. aureus*, παραγόντων από το περιβάλλον, αλλά και τη αλληλεπίδραση με άλλα μικρόβια που συχνά αποικίζουν τη ρινική κοιλότητα. Έχουν περιγραφεί 3 καταστάσεις φορίας: οι μόνιμοι φορείς που φέρουν πάντα ένα στέλεχος, οι διαλείποντες φορείς που φέρουν τον *S. aureus* κατά διαστήματα με αλλαγή στελεχών και οι μη φορείς που ποτέ δεν αποικίζονται από τον *S. aureus*. Η φορία του *S. aureus* αναφέρεται υψηλότερη στα παιδιά από ότι στους ενήλικες και πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες αναφέρουν ότι η πρώτη βρεφική ηλικία και κυρίως οι πρώτοι 3 μήνες της ζωής είναι η περίοδος με το μεγαλύτερο ποσοστό

αποικισμού ενώ μετά την πρώτη βρεφική ηλικία υπάρχει μία πτώση των ποσοστών. Ο Lebon et al. σε πρόσφατη έρευνα, παρακολούθησε ένα σχετικά μεγάλο πληθυσμό βρεφών (443) από την γέννηση τους λαμβάνοντας 3 δείγματα από το ρινικό επιθήλιο σε ηλικία 1,5 μηνών, 6 μηνών και 14 μηνών θέλοντας να μελετήσει την επιδημιολογία και τους παράγοντες που σχετίζονται με τον αποικισμό σε αυτή την ηλικιακή ομάδα. Στα αποτελέσματα αναφέρει ένα αυξημένο ποσοστό αποικισμού στην ηλικία 1,5 μήνα (52.1%) και μια μείωση στην ηλικία των 6^{ο} μηνών (21.7%) και 14^{ο} μηνών (12.9%). Τα ποσοστά αποικισμού στα βρέφη μας ήταν 15.6%, 22%, 15.9% στους μήνες 0, 6 και 12 αντίστοιχα. Το μεγάλο ποσοστό φορίας τις πρώτες εβδομάδες μετά την γέννηση αναφέρεται και σε άλλες πρόσφατες μελέτες (Peacock et al. 2003, Regev-Yochay et al. 2009, Gries et al. 2009) πράγμα που εμείς δεν μπορέσαμε να το επαληθεύσουμε και η πιθανότερη εξήγηση για αυτό είναι ότι η πρώτη λήψη ήταν πολλή κοντά στην γέννηση (3^{η} ημέρα) χωρίς να αφήσουμε έτσι το απαραίτητο χρονικό διάστημα για να μπορέσει να αποικιστεί το νεογνό. Παρόλ' αυτά το μέγιστο ποσοστό αποικισμού στα βρέφη φαίνεται να συμβαίνει ενωρίς στη γέννηση, αλλά όχι τις πρώτες ημέρες μετά τον τοκετό. Μπορέσαμε όμως να επιβεβαιώσουμε την πτώση των ποσοστών από την ηλικία των 6 μηνών στην ηλικία των 12 μηνών. Η πτώση αυτή αργότερα στην βρεφική ηλικία μπορεί να αντανακλά την ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης, τη λιγότερη επαφή με τη μητέρα και άλλων ατόμων που φροντίζουν τα βρέφη ή τον ανταγωνισμό στον αποικισμό μεταξύ του *S. aureus* και άλλων βακτηριδίων. Ο Bogaert et al. 2004 αναφέρει μια αντίστροφη σχέση της φορίας του *S. aureus* και του *S. pneumoniae* σε μεγαλύτερα παιδιά, πράγμα που θα μπορούσε να ισχύει και στην βρεφική ηλικία ενώ ο Regev-Yochay et al. 2004 βρήκε ότι η ταυτόχρονη φορία του *S. aureus* και

του *S. pneumoniae* ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή που αναμενόταν από την τύχη αλλά και ένα προστατευτικό ρόλο της φορίας του *S. pneumoniae* ενάντια του αποικισμού του *S. aureus*. Αυτή η εμφανής αντίστροφη σχέση μπορεί να είναι συνέπεια βακτηριδιακών αλληλεπιδράσεων γεγονός που έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία και με άλλα βακτηρίδια όπως τους αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους, κορυνοβακτηρίδια και ομάδες viridans στρεπτόκοκους (Uehara et al. 2000, 2001, Poutrel et al., 1980). Ο Regev-Yochay et al. 2009 μελετώντας την συνύπαρξη του *S. pneumoniae* και *S. aureus*, αναφέρει ένα μικρότερο ποσοστό συν-αποικισμού των δύο βακτηριδίων όταν το στέλεχος του πνευμονιόκκοκου φέρει ινίδια στο εξωτερικό καψιδικό τοίχωμα. Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα ινίδια, που έχουν ρόλο στην προσκόλληση στα κύτταρα, είναι καθοριστικής σημασίας στην συνύπαρξη των δύο βακτηριδίων. Το πνευμονιοκοκκικό συζευγμένο εμβόλιο ως γνωστό μειώνει τη φορία για τα στελέχη του περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Αυτή η μείωση συνεπάγεται την αύξηση της φορίας για τα στελέχη που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο αλλά δυνητικά και του *S. aureus* στα παιδιά, πράγμα πολύ σημαντικό σε μία εποχή αύξησης του CA-MRSA. Στην μελέτη μας δεν ερευνήσαμε το εμβολιαστική κάλυψη των βρεφών και επίσης δεν απομονώσαμε άλλα μικρόβια όπως πνευμονιόκκοκους ή αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους για να μπορέσουμε να επιβεβαιώσουμε την αλληλεπίδραση που φαίνεται να υπάρχει μεταξύ του *S. aureus* και άλλων μικροοργανισμών που συχνά αποικίζουν το ρινικό επιθήλιο.

Σε υγιή παιδιατρικό πληθυσμό διάφοροι παράγοντες έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι επηρεάζουν τη φορία, εκ των οποίων ο αριθμός μελών της οικογένειας, ο μητρικός θηλασμός και το παθητικό κάπνισμα. Το 2003 ο Peacock et

al. σε μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης ζευγαριών βρέφους-μητέρας σε υγιή πληθυσμό από την γέννησή τους και για 6 μήνες, μελέτησε παράγοντες όπως την ηλικία της μητέρας, το βάρος γέννησης, την ηλικία κύησης, το φύλο και το κάπνισμα που μπορεί να επηρεάζουν τη φορία χωρίς να μπορέσει να αποδείξει θετική σχέση μεταξύ των παραπάνω παραγόντων και της φορίας στο βρέφος. Ο μητρικός θηλασμός την χρονική στιγμή της λήψης του δείγματος στο βρέφος είχε θετική συσχέτιση αλλά όχι με τη μητρική φορία. Επίσης αναφέρει μια θετική σχέση της φορίας στα βρέφη με αυξημένο αριθμό αδελφών στην οικογένεια, ανεξάρτητα από τη φορία της μητέρας. Και στην δική μας μελέτη δεν βρήκαμε θετική σχέση της ηλικίας της μητέρας, του βάρους γέννησης, τη ηλικία κύησης και της φορίας του βρέφους αλλά ούτε με την διάρκεια του θηλασμού. Οι παραπάνω παράγοντες και η φορία στα παιδιά, έχουν απασχολήσει αρκετά διάφορους μελετητές, εντούτοις τα αποτελέσματα συχνά είναι αντιφατικά. Μια θεωρία που εξηγεί το ότι το βρέφος που θηλάζει έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αποικιστεί, είναι ότι οι θηλές είναι συχνή εστία αποικισμού του *S. aureus* όπως επίσης και ότι οι φλεγμονές από *S. aureus* κατά την περίοδο του θηλασμού είναι πολύ συχνές.

Η μητρική φορία λογικά μπορεί να επηρεάσει το βρεφικό αποικισμό, αλλά αυτή η υπόθεση έχει ερευνηθεί ελάχιστα. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι το νεογνό αποικίζεται τις πρώτες ημέρες ζωής και ότι ο αποικισμός έχει άμεση σχέση με το περιβάλλον και από την στενή επαφή με τις μητέρες του. Η γενετική ταυτοποίηση σε ταυτόχρονα αποικισμένα ζεύγη μητέρας-παιδιού ανέδειξε την γονιδιακή ομοιότητα, επιβεβαιώνοντας την άμεση σχέση μητέρας παιδιού στον αποικισμό από *S. aureus*. Ο Regev-Yochay et al. το 2009 μελέτησε ένα μεγάλο παιδιατρικό πληθυσμό (4500 παιδιά) και τους γονείς τους για μία χρονική περίοδο

3 ετών από την γέννηση τους και ανάλυσε τους παράγοντες που σχετίζονται με τον αποικισμό από *S. aureus* με εστίαση στην μητρική φορία, στον θηλασμό, την παρουσία αδελφών στην οικογένεια και τη παρακολούθηση σε βρεφικούς και νηπιακούς σταθμούς. Βρήκε μία θετική υψηλή σχέση μεταξύ του αποικισμού του παιδιού και της μητέρας του με τα απομονωμένα στελέχη από τα παιδιά και τους γονείς τους να έχουν γενετική ομοιότητα σε ποσοστό >70%. Αξιολογώντας τα επιδημιολογικά στοιχεία από τα ζευγάρια βρέφους – μητέρας δεν βρήκε σχέση μεταξύ του θηλασμού της μητέρας και τον κίνδυνο για αποικισμό του βρέφους. Επίσης συνέκρινε την κατάσταση αποικισμού των βρεφών και νηπίων που παρακολουθούσαν σταθμούς και που είχαν μικρά αδέλφια χωρίς να μπορέσει να αποδείξει θετική συσχέτιση μεταξύ της φορίας των νηπίων που ανήκαν στις παραπάνω ομάδες. Αυτό το εύρημα ενισχύει τη θεωρία ότι η διαδρομή μετάδοσης του *S. aureus* είναι από την μητέρα προς το βρέφος. Επίσης ο Leshem et al. 2011 μελετώντας 208 γυναίκες σε προχωρημένη εγκυμοσύνη κατέληξε στη διαπίστωση ότι τα νεογέννητα των γυναικών με φορία είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να αποικιστούν από *S. aureus* και ότι ο αποικισμός τον πρώτο μήνα ζωής γίνεται με οριζόντια και όχι με κάθετη μετάδοση. Στην μελέτη μας τα ποσοστά φορίας του *S. aureus* στα βρέφη και τις μητέρες τους είχαν θετική συσχέτιση, στοιχείο που έρχεται σε συμφωνία με τις υπάρχουσες μελέτες. Από τα βρέφη που οι μητέρες τους ήταν φορείς το 31.9% ήταν φορείς και αυτά, ενώ μόνο το 15.2% των βρεφών με μητέρες μη-φορείς ήταν φορείς. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει τη σχέση του κοινού περιβάλλοντος και κυρίως της μητέρας. Τα ταυτόχρονα αποικισμένα βρέφη και μητέρες παρατηρήθηκαν σε σχεδόν διπλάσιο ποσοστό από ότι θα περιμέναμε από την τύχη (15 περιπτώσεις αντί 8,3). Η μετάδοση του *S. aureus* στη βρεφική

ηλικία φαίνεται να γίνεται από το γονέα στο παιδί, σε αντίθεση με άλλα παθογόνα όπου η μετάδοση είναι από το παιδί στους γονείς όπως ο S. pneumoniae. Τα ευρήματά μας ευνοούν το σενάριο της στενής επαφής μητέρας – βρέφους παρά το σενάριο της κάθετης μετάδοσης στην γέννηση, δεδομένου ότι πολύ λίγα ζευγάρια βρέφους-μητέρας βρέθηκαν αποικισμένα τις πρώτες ημέρες της ζωής και η συντριπτική πλειοψηφία των θετικών ζευγαριών παρατηρήθηκε στον 6ο μήνα. Επίσης τα βρέφη που είχαν εισαχθεί στο τμήμα νεογνών ανέπτυξαν ένα διαφορετικό προφίλ φορίας ενώ τα ποσοστά φορίας στα βρέφη που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή ήταν παρόμοια.

Η σχέση μεταξύ του καπνίσματος και της φορίας από *S. aureus* δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το ενεργητικό κάπνισμα προστατεύει από τον αποικισμό με μειωμένα ποσοστά επίμονης φορίας του *S. aureus* στους καπνιστές (Qu F et al. 2010), αλλά και ότι το παθητικό κάπνισμα σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά αποικισμού από συγκεκριμένα στελέχη του *S. aureus* (Melles et al. 2007). Τα χαμηλότερα ποσοστά φορίας (παροδικής και επίμονης) στα βρέφη από μητέρες που κάπνιζαν στην μελέτη μας συσχετίζονται με τα επίσης χαμηλά ποσοστά των μητέρων τους, ενδιαφέρον εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη του Qu F et al.. Ο καπνός είναι γνωστός για την αντιβακτηριδιακή του ιδιότητα από αρκετά χρόνια δεδομένο που μπορεί να σχετίζεται με την μειωμένη ρινική φορία στις μητέρες της μελέτης μας. Εντούτοις τα βρέφη που γεννιούνται από μητέρες που καπνίζουν είναι και παθητικοί καπνιστές γεγονός που έχει αναφερθεί ως παράγοντας κινδύνου για αποικισμό. Ως εκ τούτου, το εύρημα μικρότερων ποσοστών φορίας στα βρέφη από μητέρες που καπνίζουν χρειάζονται προσεκτικότερη ερμηνεία και περαιτέρω έρευνα.

Ο Lebon et al. 2008 στην μελέτη του αναφέρει ποσοστό επίμονης φορίας 2.9% (θετικά και τα 3 δείγματα) και 17.2% (2 θετικά δείγματα) ενώ το 43.6% είχαν 1 θετικό δείγμα. Παρατήρησε ότι τα άρρενα βρέφη είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο για 2 ή περισσότερα θετικά επιχρίσματα σε σχέση με τα θήλεα. Από τα 10 βρέφη με όλα τα δείγματα θετικά, τα 3 είχαν το ίδιο γονιδιακά στέλεχος, τα 6 είχαν 2 διαφορετικά στελέχη και 1 βρέφος είχε 3 διαφορετικά στελέχη. Τα ποσοστά επίμονης φορίας (2 ή περισσότερα θετικά επιχρίσματα) στην μελέτη μας ήταν 14.6% για τα βρέφη και 13.9% για τις μητέρες, ποσοστά παρόμοια με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί. Επίσης τα άρρενα βρέφη με δύο ή περισσότερα θετικά επιχρίσματα ήταν διπλάσια σε αριθμό (8 vs 4) σε σχέση με τα θήλεα. Στην διεθνή βιβλιογραφία ελάχιστες μελέτες σχετίζουν το άρρεν φύλο με αυξημένα ποσοστά αποικισμού ή επίμονης φορίας από *S. aureus*, γεγονός εξαιρετικά ενδιαφέρον. Λόγω του μικρού αριθμού στην μελέτη μας χρειάζονται μελέτες με μεγαλύτερο πληθυσμό για να μπορέσουμε να συσχετίσουμε με στατιστική ασφάλεια το φύλο με την προδιάθεση για επίμονη φορία. Αν και οι ενήλικες μπορεί να φέρουν το ίδιο στέλεχος για πολλά χρόνια, τα βρέφη με το ίδιο γονιδιακά στέλεχος και στα 3 δείγματα ήταν ελάχιστα, αποδεικνύοντας ότι η μόνιμη φορία από το ίδιο στέλεχος είναι λιγότερο συχνή στη βρεφική ηλικία, εύρημα που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Lebon et al 2008). Βρήκαμε θετική σχέση της επίμονης φορίας στα βρέφη με τα ποσοστά της μητρικής φορίας, με τις μητέρες που δεν κάπνιζαν και στις οικογένειες με περισσότερα αδέλφια. Η παρουσία αδελφών στην οικογένεια έχει συσχετιστεί με τη φορία του *S. aureus* και από άλλες μελέτες, αλλά στη μελέτη μας, τα αδέλφια βρέθηκε να προδιαθέτουν τα βρέφη σε επίμονη φορία στο τέλος της βρεφικής ηλικίας παρά στην αρχή. Αυτό το ενδιαφέρον εύρημα μπορεί να εξηγηθεί λόγω της

αυξημένης στενής επαφής μεταξύ αδελφών στο δεύτερο εξάμηνο της ζωής. Ένα ενδιαφέρον εύρημα που μπορεί να αποδοθεί στην κοινή γενετική προδιάθεση είναι ότι και τα δύο βρέφη με επίμονη φορία από το ίδιο στέλεχος είχαν μητέρες φορείς από το ίδιο γονιδιακά στέλεχος. Το εύρημα αυτό δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν και ισχυροποιεί την άποψη της σχέσης μεταξύ του μητρικού αποικισμού και της επίμονης φορίας του βρέφους.

Τρείς μελέτες στην διεθνή βιβλιογραφία μέχρι σήμερα έχουν μελετήσει τον ταυτόχρονο αποικισμό της μητέρας και του παιδιού στην βρεφική ηλικία (Regev-Yochay et al. 2009, Huang YC et al. 2009, Peacock et al. 2003). Όλες αναφέρουν μια γονιδιακή ομοιότητα των θετικών καλλιεργειών στα ζεύγη μητέρας – παιδιού την ίδια χρονική στιγμή λήψης σε μεγάλο ποσοστό. Τα 15 ταυτόχρονα θετικά ζεύγη βρέφους-μητέρας στην μελέτη μας τυποποιήθηκαν και βρέθηκε να είναι γονιδιακά όμοια τα 8 ζεύγη (53.3%) ποσοστό μεγάλο και που έρχεται σε συμφωνία με τις παραπάνω πρόσφατες μελέτες. Η γονιδιακή ομοιότητα των στελεχών στα ζεύγη μητέρας-παιδιού σε αυτή τη μελέτη έρχεται να επιβεβαιώσει το κοινό περιβάλλον αλλά και πιθανό κοινό γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή. Τα θετικά PVL και mecA στελέχη που απομονώσαμε στα βρέφη ήταν παρόμοια γονιδιακά με τα απομονωμένα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή στις μητέρες τους. Παρατηρήσαμε ότι τα νεογνά που εισήχθησαν στη Μονάδα Νεογνών απέκτησαν διαφορετικό γονιδιακό προφίλ και δεν αποικίστηκαν από μητρικά στελέχη υποδηλώνοντας ότι η νοσηλεία στην νεογνική ηλικία επηρεάζει τη φορία στην μετέπειτα βρεφική ζωή.

Τη τελευταία δεκαετία παρατηρείται μια αύξηση αποικισμού από ανθεκτικά στελέχη σε υγιή παιδιατρικό πληθυσμό στην κοινότητα χωρίς ιστορικό λοίμωξης

αλλά και σε παιδιατρικό πληθυσμό με σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις χωρίς ιστορικό νοσηλείας. Ο Creech et al. (2005) αναφέρει σε μελέτη του ένα ποσοστό 25% MRSA από τα απομονωθέντα στελέχη σε υγιή παιδιά, και ο Wen-Tsung Lo et al. (2008) ένα ποσοστό 28,6%. Ο τελευταίος ερευνητής αναφέρει επίσης μία αύξηση των MRSA στελεχών που εκφράζουν PVL σε αποικισμένα παιδιά χωρίς ιστορικό νοσηλείας. Τα υψηλά ποσοστά αντοχής είναι αρκετά γνωστά και σε στελέχη *S. aureus* στην Ελλάδα (Sdougkos et al. 2008). Η Niniou et al. (2008) σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα με 198 στελέχη *S. aureus* από ασθενείς που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία κατά την περίοδο 2003-2005 λόγο σταφυλοκοκκικής λοίμωξης, αναφέρει ένα ποσοστό 44.4% MRSA με 68% από αυτά τα στελέχη να εκφράζουν το γονίδιο PVL και με ένα μικρό ποσοστό ανθεκτικότητας στην κλινδαμυκίνη και στην ερυθρομυκίνη (CA-MRSA). Στην μελέτη μας τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα βρέφη της κοινότητας ήταν 36.4% από τα απομονωθέντα στελέχη, αποτέλεσμα σε συμφωνία με την αυξητική τάση που αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Το γεγονός αυτό είναι ανησυχητικό παρόλο που παραμένει η ευαισθησία σε άλλα αντιβιοτικά και αυτό γιατί μεγάλο ποσοστό από τα στελέχη εκφράζουν το γονίδιο PVL που τα καθιστά εξαιρετικά επιθετικά με τάση να δημιουργούν αποστήματα. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα βρέφη που νοσηλεύτηκαν στην Μονάδα Νεογνών είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στην μεθικιλλίνη (72%) και ήταν όλα ευαίσθητα στην κλινδαμυκίνη και στην ερυθρομυκίνη. Η παρουσία παραγόντων παθογονικότητας (PVL, mecA) δεν ήταν σπάνια στη μελέτη μας, όπως και στην βιβλιογραφία αν και η πλειοψηφία ήταν στελέχη της κοινότητας. Σε αντίθεση με τη Βόρεια Αμερική, όπου ο κλώνος USA300 κυριαρχεί, ο CA-MRSA στην Ευρώπη χαρακτηρίζεται από κλωνική

ετερογένεια. Το πιο κοινό ευρωπαϊκό στέλεχος είναι ο κλώνος ST80 αν και υπάρχουν αναφορές για αύξηση του USA300 (Otter JA et al. 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι τα απομονωμένα στελέχη μας ανήκουν κυρίως στον τύπο MLS 30 και όχι στον ευρωπαϊκό τύπο ST 80 γεγονός που επιβεβαιώνει την κλωνική ετερογένεια. Ωστόσο και τα τέσσερα PVL θετικά στελέχη ανήκαν στον τύπο ST 80.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη του αποικισμού του βρέφους από το *S. aureus* σχεδιάστηκε για να καλύψει το χρονικό διάστημα του πρώτου έτους ζωής. Αυτή η παρατεταμένη περίοδος παρακολούθησης επέτρεψε την εκτίμηση των ποσοστών της φορίας σε διάφορες χρονικές περιόδους της βρεφικής ηλικίας καθώς και παράγοντες από το περιβάλλον που σχετίζονται με τη φορία του βρέφους όπως τη φορία της μητέρας, το κάπνισμα, τη παρουσία αδελφών στην οικογένεια και ο θηλασμός. Επίσης επέτρεψε την εκτίμηση των ποσοστών της επίμονης φορίας, των ποσοστών αντοχής και της παρουσίας λοιμογόνων παραγόντων.

Στους περιορισμούς της μελέτης οπωσδήποτε συγκαταλέγεται το σχετικά μικρό μέγεθος του πληθυσμού των ζευγών μητέρων-βρεφών. Ομοίως η λήψη καλλιεργειών ήταν από το ρινικό επιθήλιο και όχι από άλλα σημεία του σώματος όπως το ρινοφάρυγγα, το περίνεο, τον κόλπο ή τη μασχάλη, σημεία που δυνητικώς αποικίζονται από τον *S. aureus*. Επικεντρωθήκαμε μόνο στις μητέρες, οι οποίες είχαν και την πιο στενή επαφή κατά τον πρώτο χρόνο αλλά όχι σε άλλα μέλη της οικογένειας. Η φορία του πατέρα, των αδελφών ή των ατόμων που παρακολουθούσαν τα βρέφη δεν μελετήθηκε, πράγμα που θα διευκρίνιζε περαιτέρω την ακριβή διαδρομή μετάδοσης του *S. aureus*. Περιοριστήκαμε στο πρώτο έτος της ζωής και δεν λάβαμε δείγματα σε παιδιά άνω του έτους, πράγμα που θα βοηθούσε περισσότερο στον καθορισμό των παραγόντων που σχετίζονται με την επίμονη φορία. Η πρώτη δειγματοληψία ήταν πολύ ενωρίς στη γέννηση, και αυτό επέτρεπε μεν την αποτύπωση του αποικισμού στις πρώτες ημέρες ζωής, αλλά όχι στις επόμενες εβδομάδες ενώ το μεσοδιάστημα των 6 μηνών ήταν μάλλον μεγάλο

για να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε ικανοποιητικά τον αποικισμό στα βρέφη κατά το πρώτο έτος. Δεν προσπαθήσαμε να απομονώσουμε άλλους μικροοργανισμούς όπως στρεπτόκοκκους ή κορυνοβακτηρίδια τα οποία ως γνωστό ανταγωνίζονται στον αποικισμό με τον *S. aureus* όπως επίσης δεν παρακολουθήσαμε την εμβολιαστική κάλυψη με το αντιπνευμονιοκοκκικό εμβόλιο γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την φορία. Τέλος δεν μελετήσαμε πιθανές πηγές νοσοκομειακής μετάδοσης στην ομάδα των νεογνών που εισήχθησαν στη Μονάδα Νεογνών.

Η παρούσα μελέτη με τα ευρήματα της, συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση της μετάδοσης του *S. aureus* στα βρέφη. Επιβεβαιώνει τον σημαντικό ρόλο του στενού περιβάλλοντος στον αποικισμό και στην επίμονη φορία στην βρεφική ηλικία, γεγονός που προδιαθέτει σε λοίμωξη, όπως επίσης και την σημαντική αύξηση των ανθεκτικών στελεχών τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες και κυρίως ο αποικισμός της μητέρας, η παρουσία αδελφών και η νοσηλεία τις πρώτες ημέρες της ζωής επηρεάζουν σημαντικά τη φορία και καθορίζουν τη λοιμογόνο δράση και αντοχή των στελεχών *S. aureus* στη βρεφική ηλικία. Η μελέτη αυτή αποτελεί το έναυσμα για νέες ερευνητικές προσπάθειες οι οποίες θα μπορούσαν να επεκταθούν σε ένα μεγαλύτερο παιδιατρικό πληθυσμό τόσο αριθμητικά όσο και ηλικιακά ώστε να μελετηθεί καλύτερα η επίμονη φορία. Μια μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να ανιχνεύσει και άλλες πηγές μετάδοσης από το στενό οικογενειακό περιβάλλον εκτός της μητέρας. Η ταυτόχρονη απομόνωση άλλων βακτηριδίων στον παιδιατρικό πληθυσμό αλλά και η εμβολιαστική κάλυψη θα μας έδιδε σημαντικά στοιχεία της αλληλοεπίδρασης των διάφορων μικροοργανισμών. Η παρουσία μελών της οικογένειας που

καπνίζουν αλλά και της μητέρας θα πρέπει να μελετηθούν περισσότερο για να διευκρινιστεί ο ρόλος του καπνίσματος στη φορία, μιας και η βιβλιογραφία αναφέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η επέκταση της μελέτης σε ειδικό παιδιατρικό πληθυσμό όπως οι Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας (Νεογνών και Παίδων) αλλά και παιδιατρικών κλινικών θα προσέτεθε περισσότερες πληροφορίες για τη μεταδοτικότητα αλλά και την πρόληψη σοβαρών λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη σε μια εποχή αυξημένης χρήσης αντιβιοτικών.

Ο *S. aureus* είναι ένας μικροοργανισμός παγκόσμια διαδεδομένος στον οποίο έχει στρέψει την προσοχή της η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια κυρίως λόγω της αυξανόμενης συχνότητας σοβαρών λοιμώξεων σε υγιή παιδιά στην κοινότητα. Η αύξηση των ποσοστών της επίμονης φορίας η οποία προδιαθέτει στη λοίμωξη, ο σημαντικός ρόλος του στενού περιβάλλοντος (κυρίως της μητέρας το πρώτο έτος ζωής) και η συνεχής αύξηση των ανθεκτικών στα συνήθη αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά στελεχών, επισημαίνει την αναγκαιότητα για μία καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην μετάδοση και τη φορία.

References

1: **Wenzel RP**, Perl TM. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. J Hosp Infect. 1995 Sep;31(1):13-24. Review. PubMed PMID: 7499817.

2: **Peacock SJ**, Justice A, Griffiths D, de Silva GD, Kantzanou MN, Crook D, Sleeman K, Day NP. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5718-25. PubMed PMID: 14662966; PubMed Central PMCID: PMC308978.

3: **Lebon A**, Labout JA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, van Wamel W, Moll HA, van Belkum A. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. J Clin Microbiol. 2008 Oct;46(10):3517-21. Epub 2008 Jul 30. Erratum in: J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1995-6. PubMed PMID: 18667593; PubMed Central PMCID: PMC2566071.

4: **Regev-Yochay G**, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Navon-Venezia S, Pinco E, Leavitt A, Keller N, Rahav G, Malley R, Rubinstein E; Maccabi Implementing Judicious Antibiotic Prescription Study Group. Parental *Staphylococcus aureus* carriage is associated with staphylococcal carriage in young children. Pediatr Infect Dis J. 2009 Nov;28(11):960-5. PubMed PMID: 19738508.

5: **Uehara Y**, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, Maruchi N. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of

Corynebacterium sp. J Hosp Infect. 2000 Feb;44(2):127-33. PubMed PMID: 10662563.

6: **Uehara Y**, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K. H(2)O(2) produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. Clin Infect Dis. 2001 May 15;32(10):1408-13. PubMed PMID: 11317240.

7: **Uehara Y**, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci. Clin Infect Dis. 2001 May 15;32(10):1399-407. PubMed PMID: 11317239.

8: **Lina G**, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):18-23. PubMed PMID: 12513972; PubMed Central PMCID: PMC152380.

9: **van Gils EJ**, Hak E, Veenhoven RH, Rodenburg GD, Bogaert D, Bruin JP, van Alphen L, Sanders EA. Effect of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial. PLoS One. 2011;6(6):e20229. Epub 2011 Jun 10. PubMed PMID: 21695210; PubMed Central PMCID: PMC3112202.

10: **Cole AM**, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. Infect Immun. 1999 Jul;67(7):3267-75. PubMed PMID: 10377100; PubMed Central PMCID: PMC116505.

11: **Aly R**, Shinefield HI, Strauss WG, Maibach HI. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infect Immun. 1977 Sep;17(3):546-9. PubMed PMID: 409676; PubMed Central PMCID: PMC421160.

12: **Kluytmans J**, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):505-20. Review. PubMed PMID: 9227864; PubMed Central PMCID: PMC172932.

13: **Bogaert D**, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PW. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. Lancet. 2004 Jun 5;363(9424):1871-2. PubMed PMID: 15183627.

14: **Wertheim HF**, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet.2004 Aug 21-27;364(9435):703-5. PubMed PMID: 15325835.

15: **Wertheim HF**, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005 Dec;5(12):751-62. Review. PubMed PMID: 16310147.

16: **von Eiff C**, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med. 2001 Jan 4;344(1):11-6. PubMed PMID: 11136954.

17: **Dancer SJ**. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. Lancet Infect Dis. 2008 Feb;8(2):101-13. Epub 2007 Oct 31. Review. PubMed PMID: 17974481.

18: **van Belkum A**, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HF. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. J Infect Dis. 2009 Jun 15;199(12):1820-6. PubMed PMID: 19419332.

19: **Ruimy R**, Angebault C, Djossou F, Dupont C, Epelboin L, Jarraud S, Lefevre LA, Bes M, Lixandru BE, Bertine M, El Miniai A, Renard M, Bettinger RM, Lescat M, Clermont O, Peroz G, Lina G, Tavakol M, Vandenesch F, van Belkum A, Rousset F, Andremont A. Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? J Infect Dis. 2010 Sep 15;202(6):924-34. PubMed PMID: 20677941.

20: **Huang YC**, Chao AS, Chang SD, Chen YJ, Peng MT, Sung JH, Chen CJ. Association of *Staphylococcus aureus* colonization in parturient mothers and their babies. Pediatr Infect Dis J. 2009 Aug;28(8):742-4. PubMed PMID: 19633520.

21: **Lexau CA**, Lynfield R, Danila R, Pilishvili T, Facklam R, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Reingold A, Bennett NM, Hadler J, Cieslak PR, Whitney CG; Active Bacterial Core Surveillance Team. Changing epidemiology of invasive

pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. JAMA. 2005 Oct 26;294(16):2043-51. PubMed PMID: 16249418.

22: **Chambers HF**. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):781-91. Review. PubMed PMID: 9336672; PubMed Central PMCID: PMC172944.

23: **Ito T**, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May;45(5):1323-36. Erratum in: Antimicrob Agents Chemother 2001 Dec;45(12):3677. PubMed PMID: 11302791; PubMed Central PMCID: PMC90469.

24: **Bassetti M**, Nicco E, Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? Int J Antimicrob Agents. 2009 Jul;34 Suppl 1:S15-9. Review. PubMed PMID: 19560669.

25: **David MZ**, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul;23(3):616-87. Review. PubMed PMID: 20610826; PubMed Central PMCID: PMC2901661.

26: **Creel AM**, Durham SH, Benner KW, Alten JA, Winkler MK. Severe invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in previously healthy children. Pediatr Crit Care Med. 2009 May;10(3):323-7. PubMed PMID: 19307811.

27: **Niniou I**, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, Pasparakis DG, Kafetzis DA, Tsolia MN. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Sep;27(9):831-7. Epub 2008 Jun 7. PubMed PMID: 18536947.

28: **Kaplan SL**. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Semin Pediatr Infect Dis. 2006 Jul;17(3):113-9. Review. PubMed PMID: 16934705.

29: **Crawford SE**, Daum RS. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: modern times for an ancient pathogen. Pediatr Infect Dis J. 2005 May;24(5):459-60. Review. PubMed PMID: 15876949.

30: **Tenover FC**, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother. 2009 Sep;64(3):441-6. Epub 2009 Jul 16. Review. PubMed PMID: 19608582.

31: **Long CB**, Madan RP, Herold BC. Diagnosis and management of community-associated MRSA infections in children. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Feb;8(2):183-95. Review. PubMed PMID: 20109048.

32: **Zheng X**, Qi C, Arrieta M, O'Leary A, Wang D, Shulman ST. Lack of increase in vancomycin resistance of pediatric methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from 2000 to 2007. Pediatr Infect Dis J. 2010 Sep;29(9):882-4. PubMed PMID: 20453708.

33: **Shore AC**, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Aug;55(8):3765-73. Epub 2011 Jun 2. PubMed PMID: 21636525; PubMed Central PMCID: PMC3147645.

34: **García-Álvarez L**, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011 Aug;11(8):595-603. PubMed PMID: 21641281.

35: **Jain R**, Kralovic SM, Evans ME, Ambrose M, Simbartl LA, Obrosky DS, Render ML, Freyberg RW, Jernigan JA, Muder RR, Miller LJ, Roselle GA. Veterans Affairs initiative to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 2011 Apr 14;364(15):1419-30. PubMed PMID: 21488764.

36: **Strommenger B**, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2533-40. PubMed PMID: 16825376; PubMed Central PMCID: PMC1489514.

37: **Regev-Yochay G**, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, Rahav G, Rubinstein E. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. JAMA. 2004 Aug 11;292(6):716-20. PubMed PMID: 15304469.

38: **Gries DM**, Zemzars TF, Gibson KA, O'Hern E, Iyer M, Myers M, Pultz MJ, Li Y, Donskey CJ. A pilot study to assess frequency of carriage and routes of acquisition of *Staphylococcus aureus* by healthy infants. Am J Infect Control. 2009 Sep;37(7):598-600. PubMed PMID: 19328594.

39: **Poutrel B**, Lerondelle C. Protective effect in the lactating bovine mammary gland induced by coagulase-negative staphylococci against experimental *Staphylococcus aureus* infections. Ann Rech Vet. 1980;11(4):327-32. PubMed PMID: 7337390.

40: **Regev-Yochay G**, Lipsitch M, Basset A, Rubinstein E, Dagan R, Raz M, Malley R. The pneumococcal pilus predicts the absence of *Staphylococcus aureus* co-colonization in pneumococcal carriers. Clin Infect Dis. 2009 Mar 15;48(6):760-3. PubMed PMID: 19207082; PubMed Central PMCID: PMC2674784.

41: **Qu F**, Cui E, Guo T, Li H, Chen S, Liu L, Han W, Bao C, Mao Y, Tang YW. Nasal colonization of and clonal transmission of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* among Chinese military volunteers. J Clin Microbiol. 2010 Jan;48(1):64-9. PubMed PMID: 19889899; PubMed Central PMCID: PMC2812276.

42: **Melles DC**, Bogaert D, Gorkink RF, Peeters JK, Moorhouse MJ, Ott A, van Leeuwen WB, Simons G, Verbrugh HA, Hermans PW, van Belkum A. Nasopharyngeal co-colonization with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in children is bacterial genotype independent. Microbiology. 2007 Mar;153(Pt 3):686-92. PubMed PMID: 17322188.

43: **Leshem E**, Maayan-Metzger A, Rahav G, Dolitzki M, Kuint J, Roytman Y, Goral A, Novikov I, Fluss R, Keller N, Regev-Yochay G. Transmission of *Staphylococcus aureus* from Mothers to Newborns. Pediatr Infect Dis J. 2011 Dec 23. PubMed PMID: 22189535.

44: **Creech CB** 2nd, Kernodle DS, Alsentzer A, Wilson C, Edwards KM. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. Pediatr Infect Dis J. 2005 Jul;24(7):617-21. PubMed PMID: 15999003.

45: **Lo WT**, Lin WJ, Tseng MH, Wang SR, Chu ML, Wang CC. Risk factors and molecular analysis of Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children. Pediatr Infect Dis J. 2008 Aug;27(8):713-8. PubMed PMID: 18600194.

46: **Sdougkos G**, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Stamatakis E, Vris A, Christodoulidi I, Protopapadakis G, Spiliopoulou I. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. Clin Microbiol Infect. 2008 Nov;14(11):995-1001. PubMed PMID: 18808423.

47: **Liu C**, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, J Rybak M, Talan DA, Chambers HF; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011 Feb 1;52(3):e18-55. Epub 2011 Jan 4. Erratum in: Clin Infect Dis. 2011 Aug 1;53(3):319. PubMed PMID: 21208910.

48: **Otter JA**, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis. 2010 Apr;10(4):227-39. Review. PubMed PMID: 20334846.

49: **Lamaro-Cardoso J**, de Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LS, Oliveira RM, Nouer SS, Aires-de-Sousa M, Milheiriço C, Andrade AL. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infants attending day care centers in Brazil. J Clin Microbiol. 2009 Dec;47(12):3991-7. PubMed PMID: 19828745; PubMed Central PMCID: PMC2786686.

50: **Skov L**, Halkjaer LB, Agner T, Frimodt-Møller N, Jarløv JO, Bisgaard H. Neonatal colonization with *Staphylococcus aureus* is not associated with development of atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2009 Jun;160(6):1286-91. PubMed PMID: 19239467.

51: **Datta F**, Erb T, Heininger U, Gervaix A, Schaad UB, Berger C, Vaudaux B, Aebi C, Hitzler M, Kind C, Gnehm HE, Frei R; Pediatric Infectious Disease Group Switzerland Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Study Group. A multicenter, cross-sectional study on the prevalence and risk factors for nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients admitted to children's hospitals in Switzerland. Clin Infect Dis. 2008 Oct 1;47(7):923-6. PubMed PMID: 18715155.

52: **Bonness S**, Szekat C, Novak N, Bierbaum G. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus* isolates from atopic patients revealing presence of similar strains in isolates from children and their parents. J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):456-61. PubMed PMID: 18077648; PubMed Central PMCID: PMC2238135.

53: **Stone A**, Quittell L, Zhou J, Alba L, Bhat M, DeCelie-Germana J, Rajan S, Bonitz L, Welter JJ, Dozor AJ, Gherson I, Lowy FD, Saiman L. *Staphylococcus aureus* nasal colonization among pediatric cystic fibrosis patients and their household contacts. Pediatr Infect Dis J. 2009 Oct;28(10):895-9. PubMed PMID: 20135845.

54: **Strommenger B**, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2006

Jul;44(7):2533-40. PubMed PMID: 16825376; PubMed Central PMCID: PMC1489514.17.

55: **Andrews JI**, Fleener DK, Messer SA, Kroeger JS, Diekema DJ. Screening for *Staphylococcus aureus* carriage in pregnancy: usefulness of novel sampling and culture strategies. Am J Obstet Gynecol. 2009 Oct;201(4):396.e1-5. PubMed PMID: 19716114.

56: **Adler A**, Givon-Lavi N, Moses AE, Block C, Dagan R. Carriage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of infants in southern Israel: risk factors and molecular features. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):531-8. PubMed PMID: 20007386; PubMed Central PMCID: PMC2815591.

57: **Chen CJ**, Hsu KH, Lin TY, Hwang KP, Chen PY, Huang YC. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. J Clin Microbiol. 2011 Jan;49(1):131-7. PubMed PMID: 21084507; PubMed Central PMCID: PMC3020448.

58: **Pickett A**, Wilkinson M, Menoch M, Snell J, Yniguez R, Bulloch B. Changing incidence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* skin abscesses in a pediatric emergency department. Pediatr Emerg Care. 2009 Dec;25(12):831-4. PubMed PMID: 19952975.

59: **Boucher HW**, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S344-9. Review. PubMed PMID: 18462089.

60: **Suryadevara M**, Moro MR, Rosenbaum PF, Kiska D, Riddell S, Weiner LB, Shaw J. Incidence of invasive community-onset *Staphylococcus aureus* infections in children in Central New York. J Pediatr. 2010 Jan;156(1):152-154.e1. PubMed PMID: 20006767.

61: **Reyes J**, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, Carrillo C, Rizzi A, Guzmán M, Adachi J, Chowdhury S, Murray BE, Arias CA. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. Clin Infect Dis. 2009 Dec 15;49(12):1861-7. PubMed PMID: 19911971; PubMed Central PMCID: PMC2787674.

62: **Saxena S**, Thompson P, Birger R, Bottle A, Spyridis N, Wong I, Johnson AP, Gilbert R, Sharland M; Improving Children's Antibiotic Prescribing Group. Increasing skin infections and *Staphylococcus aureus* complications in children, England, 1997-2006. Emerg Infect Dis. 2010 Mar;16(3):530-3. PubMed PMID: 20202439.

63: **Lessa FC**, Mu Y, Davies J, Murray M, Lillie M, Pearson A, Fridkin SK; Emerging Infections Program/Active Bacterial Core surveillance MRSA Investigators and the Health Protection Agency Team. Comparison of incidence of bloodstream infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between England and United States, 2006-2007. Clin Infect Dis. 2010 Oct 15;51(8):925-8. PubMed PMID: 20815734.

64: **Carrillo-Marquez MA**, Hulten KG, Hammerman W, Lamberth L, Mason EO, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus* pneumonia in children in the era of community-

acquired methicillin-resistance at Texas Children's Hospital. Pediatr Infect Dis J. 2011 Jul;30(7):545-50. PubMed PMID: 21407143.

65: **Elliott DJ**, Zaoutis TE, Troxel AB, Loh A, Keren R. Empiric antimicrobial therapy for pediatric skin and soft-tissue infections in the era of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatrics. 2009 Jun;123(6):e959-66. PubMed PMID: 19470525.

66: **Lu PL**, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, Siu LK. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):132-9. PubMed PMID: 15634961; PubMed Central PMCID: PMC540160.

67: **Sattler CA**, Mason EO Jr, Kaplan SL. Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community-acquired, methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children. Pediatr Infect Dis J. 2002 Oct;21(10):910-7. PubMed PMID: 12394811.

68: **Carrillo-Marquez MA**, Hulten KG, Hammerman W, Mason EO, Kaplan SL. USA300 is the predominant genotype causing *Staphylococcus aureus* septic arthritis in children. Pediatr Infect Dis J. 2009 Dec;28(12):1076-80. PubMed PMID: 19820424.

69: **Nakamura MM**, Rohling KL, Shashaty M, Lu H, Tang YW, Edwards KM. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. Pediatr Infect Dis J. 2002 Oct;21(10):917-22. PubMed PMID: 12394812.

70: **Almer LS**, Shortridge VD, Nilius AM, Beyer JM, Soni NB, Bui MH, Stone GG, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Jul;43(3):225-32. PubMed PMID: 12106956.

71: **Regev-Yochay G**, Malley R, Rubinstein E, Raz M, Dagan R, Lipsitch M. In vitro bactericidal activity of *Streptococcus pneumoniae* and bactericidal susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cocolonized versus noncocolonized children. J Clin Microbiol. 2008 Feb;46 (2):747-9. PubMed PMID: 18039795; PubMed Central PMCID: PMC2238136.

72: **Carrillo-Marquez MA**, Hulten KG, Mason EO, Kaplan SL. Clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* catheter-related bacteremia in children. Pediatr Infect Dis J. 2010 May;29(5):410-4. PubMed PMID: 20431380.

73: **Nambiar S**, Herwaldt LA, Singh N. Outbreak of invasive disease caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonates and prevalence in the neonatal intensive care unit. Pediatr Crit Care Med. 2003 Apr;4(2):220-6. PubMed PMID: 12749656.

74: **Shiojima T**, Ohki Y, Nako Y, Morikawa A, Okubo T, Iyobe S. Immediate control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit. J Infect Chemother. 2003 Sep;9(3):243-7. PubMed PMID: 14513393.

75: **Kluytmans J**. Reduction of surgical site infections in major surgery by elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 1998 Sep;40 Suppl B:S25-9. Review. PubMed PMID: 9777530.

76: **Regev-Yochay G**, Bogaert D, Malley R, Hermans PW, Veenhoven RH, Sanders EA, Lipsitch M, Rubinstein E. Does pneumococcal conjugate vaccine influence *Staphylococcus aureus* carriage in children? Clin Infect Dis. 2008 Jul 15;47(2):289-91; author reply 291-2. PubMed PMID: 18564933.

77: **Regev-Yochay G**, Rubinstein E, Barzilai A, Carmeli Y, Kuint J, Etienne J, Blech M, Smollen G, Maayan-Metzger A, Leavitt A, Rahav G, Keller N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. Emerg Infect Dis. 2005 Mar;11(3):453-6. PubMed PMID: 15757564.

78: **Melles DC**, Pauw E, van den Boogaard L, Boelens HA, Peters J, Peeters JK, Witsenboer H, van Leeuwen WB, Verbrugh HA, van Belkum A, Nouwen JL. Host-microbe interplay in persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage in HIV patients. Microbes Infect. 2008 Feb;10(2):151-8. PubMed PMID: 18248760.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

1. Φύλο
2. Εθνικότητα
3. Βάρος γέννησης
4. Ηλικία κύησης
5. Είδος τοκετού
6. Χορήγηση αντιβιοτικών στην βρεφική περίοδο
7. Ηλικία γονέων
8. Εργασία κατά την εγκυμοσύνη
9. Επάγγελμα γονέων
10. Μορφωτικό επίπεδο γονέων
11. Κάπνισμα γονέων
12. Αριθμός παιδιών στο σπίτι
13. Αριθμός ενηλίκων στο σπίτι
14. Μητρικός θηλασμός
15. Εισαγωγή σε Νοσοκομείο κατά τη νεογνική και βρεφική περίοδο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Ερωτηματολόγιο της πρώτης δειγματοληψίας Κωδικός μελέτης □.□□□

Ονοματεπώνυμο μητέρας . . . . . .

Ονοματεπώνυμο βρέφους . . . . . .

Φύλο βρέφους □ αγόρι □ κορίτσι

Βάρος γέννησης □.□□□ gr

Εβδομάδες κύησης . . . . . .

Τοκετός □ φυσιολογικός τοκετός □ καισαρική τομή

Αντιβιοτικά στην εγκυμοσύνη □ ναι □ όχι αν ναι, τι; . . . . . .

Ηλικία μητέρας . . . . . ετών

Ηλικία πατέρα/συντρόφου . . . . . ετών

Εργασία πριν την εγκυμοσύνη/τον τοκετό; □ ναι □ όχι Αν ναι, ποια ; . . . . . .

Σπουδές μητέρας □ δημοτικό □ γυμνάσιο □ λύκειο □ ΤΕΙ □ ΑΕΙ

Σπουδές συζύγου □ δημοτικό □ γυμνάσιο □ λύκειο □ ΤΕΙ □ ΑΕΙ

Επάγγελμα του συζύγου . . . . . .

Άλλα παιδιά στην οικογένεια □ όχι □ 1 □ 2 □ 3 □ 4

Άλλοι ενήλικες στο σπίτι □ όχι □ 1 □ 2 □ 3 □ 4

Μητρικός θηλασμός □ ναι □ όχι

Αν όχι, γιατί; . . . . . .

Θα συμφωνούσατε να γίνει καλλιέργεια ρινικού επιχρίσματος σε σας την ίδια και στο μωρό σας σήμερα και αργότερα, μετά από συνεννόηση; □ ναι □ όχι

Τηλέφωνο οικογένειας. . . . . .

Διεύθυνση οικογένειας . . . . . .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

Δίνω τη συγκατάθεση μου να γίνει έλεγχος στο παιδί μου με εξέταση ρινικού επιχρίσματος για την παρουσία του μικροβίου «χρυσίζων Σταφυλόκοκκος» (Staphylococcus aureus).

Έχω ενημερωθεί ότι:

• η εξέταση αυτή γίνεται στο πλαίσιο διερεύνησης της συχνότητας του μικροβίου στα μικρά μωρά και της μεταδοτικότητας του από τη μητέρα

• η εξέταση θα είναι σύντομη, ανώδυνη και χωρίς ιδιαίτερη ταλαιπωρία για το μωρό

• θα ενημερώνομαι για όλα τα ευρήματα, είτε φυσιολογικά είτε παθολογικά

• έχω το δικαίωμα να αρνηθώ και να διακόψω οποιαδήποτε στιγμή την περαιτέρω συμμετοχή στη μελέτη

• μου έχει δοθεί η ευκαιρία και ο χρόνος να συζητήσω τις σχετικές απορίες μου με το γιατρό-ερευνητή

Ηράκλειο, .../. . . . ./. . . . . .

Ο/Η γονέας / κηδεμόνας του παιδιού . . . . . .

Ο γιατρός . . . . . .