



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ε. ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ-ΣΚΟΥΛΑΚΗ

Διδακτορική Διατριβή

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ
ΑΠΟ ΖΩΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΠΟ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΩΝ "**

υπό

ΓΕΩΡΓΙΟΥ Ν. ΤΣΙΚΡΙΚΩΝΗ

Ειδικευόμενου Μικροβιολογίας 2012

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2012

© 2012 Γεώργιος Τσικρικώνης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (9^ο/20-12-2006 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας
*Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος
*Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών*

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου
*Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος
*Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Παναγιώτης Μαρκουλάτος
*Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Παναγιώτης Λιάκος
*Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον κ. Σπύρο Πουρνάρα, Επίκ. Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Πατρών και στον κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις εύστοχες επισημάνσεις τους κατά τη συγγραφή αυτής της μελέτης καθώς και για τη σημαντική βοήθειά τους στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κύριο κ. Πουρνάρα για την καθοριστική συμβολή του στη διεξαγωγή της έρευνας αυτής, την υπομονή που έδειξε στην καθοδήγηση των ερευνητικών μου δραστηριοτήτων και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε στην κριτική διόρθωση και επιμέλεια του κειμένου.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, τον κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο, Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κύριο Παναγιώτη Λιάκο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον αφυπηρεσάντα Καθηγητή Μικροβιολογίας κύριο κ. Αντώνιο Μανιάτη για τις πολύτιμες επιστημονικές παρατηρήσεις του και για την ηθική στήριξη του καθώς και την κ. Δανάη Σοφιανού, πρώην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης για τη συμβολή της στη διατριβή. Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αγάπη και την συμπαράστασή τους καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειας ολοκλήρωσης αυτού του έργου.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

I. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Τσικρικώνης Γεώργιος του Νικολάου.

Διεύθυνση: Στρατονικείας 40, Λάρισα. Τηλέφωνα: 2410-235523, 6942976072.

Ια. ΤΙΤΛΟΙ ΚΑΙ ΣΠΟΥΔΕΣ

1. Απολυτήριο Λυκείου (2^ο Λύκειο Λάρισας), βαθμός 19^{8/11} (Ιούνιος 1998).
2. Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, βαθμός αποφοίτησης «Λίαν Καλώς» (8.05) (Ιούνιος 2005).
3. Certificate of Proficiency in English (University of Michigan).
4. Certificate of Proficiency in English (University of Cambridge).
5. Zertifikat Deutsch als Fremdsprache, Goethe-Institut, βαθμός Άριστα.

Ιβ. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **22/03/2006-06/08/2007:** Αγροτικός ιατρός. Τρίμηνη άσκηση στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και εκτέλεση υπηρεσίας υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Αγιάς.
- **12/08/2008-παρόν:** Ειδικευόμενος στο 5^ο έτος Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης. Άσκηση για χρονικό διάστημα ενός μηνός στο Μυκητολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Αφροδισίων και Δερματικών Νόσων Θεσσαλονίκης.

II. ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ- ΒΡΑΒΕΙΑ

- **2001-2002:** Βράβευση από το Ίδρυμα «Αφών Δεληγεώργη» για διάκριση στις σπουδές.
- **2011-2012:** Λήψη υποτροφίας από την Εταιρεία Ιατρικής Βιοπαθολογίας Βορείου Ελλάδος για την παρακολούθηση του '11th ESCMID Summer School' που πραγματοποιήθηκε από τις 21 έως 27 Ιουλίου 2012 στο Ίνσμπρουκ, στην Αυστρία.

III. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1. **Δημοσιεύσεις πρωτότυπων εργασιών στον Διεθνή Ιατρικό Τύπο**
 - Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin.
Giorgos Tsirikonis, Antonios N Maniatis, Maria Labrou, Eleni Ntokou, Giorgos Michail, Alexandros Daponte, Constantinos Stathopoulos, Athanassios Tsakris, Spyros Pournaras. Microb Pathog. 2012 Jun;52(6):336-43. Epub 2012 Mar 15.

2. Ανακοινώσεις σε συνέδρια και επιστημονικές συναντήσεις

- *Candida* infections in surgical patients. Tsikrikonis Giorgos. 11th ESCMID Summer School, Innsbruck, Austria: 21-27 July 2012.
- Ανίχνευση μηχανισμών αντοχής εντεροβακτηριακών στις καρβαπενέμες με φαινοτυπικές μεθόδους. Καραμπατάκης Θ., Σιάνου Ε., Τσικρικώνης Γ., Πιστοφίδης Κ., Αρετάκη Ε., Ρεπανά Ι., Σεβαστίδου Α., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Συχνότητα απομόνωσης αναερόβιων μικροοργανισμών από καλλιέργειες τραυμάτων κατά τη διάρκεια ενός έτους. Τασίνα Ε., Αμπδαρμάνη Μ., Τσικρικώνης Γ., Κυθρεώτου Γ., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 10^ο Συνέδριο της Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος, Θεσσαλονίκη: 8-10 Δεκεμβρίου 2011.
- Σύγκριση παθογόνων απομονωθέντων από άκρο κεντρικού φλεβικού καθετήρα (ΚΦΚ) σε ασθενείς με μικροβιαμία. Καραμπατάκης Θ., Τσικρικώνης Γ., Τασίνα Ε., Δεληπάλλα Ι., Πιστοφίδης Κ., Κυθρεώτου Γ., Σιάνου Ε., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Δεδομένα ουροκαλλιιεργιών και αντοχή στα συνήθη αντιβιοτικά απομονωθέντων *E. coli*. Τσικρικώνης Γ., Καραμπατάκης Θ., Κουρή Ν., Δεληπάλλα Ι., Σεβαστίδου Α., Τασίνα Ε., Κυθρεώτου Γ., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Μελέτη ευαισθησίας σε αντιβιοτικά του *Acinetobacter baumannii* που απομονώθηκε από καλλιέργειες αίματος. Κουρή Ν., Αμπδαρμάνη Μ., Αρετάκη Ε., Τσικρικώνης Γ., Μπαντής Χ., Διαμαντοπούλου Α., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Λοιμώξεις κεντρικών φλεβικών καθετήρων σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Κουρή Ν., Μπαντής Χ., Τσικρικώνης Γ., Διαμαντοπούλου Α., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Αναδρομική μελέτη της συχνότητας συμμετοχής αναερόβιων μικροοργανισμών σε λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων κατά τα έτη 2009-2010. Τασίνα Ε., Τσικρικώνης Γ., Αμπδαρμάνη Μ., Κυθρεώτου Γ., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Λοιμώξεις κεντρικών φλεβικών καθετήρων σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς από *Staphylococcus* spp. Κουρή Ν., Μπαντής Χ., Τσικρικώνης Γ., Διαμαντοπούλου Α., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.

- Συχνότητα απομόνωσης μυκοβακτηριδίων στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης την τετραετία 2007-2010. Δεληπάλλα Ι., Τασίνα Ε., Αρετάκη Ε., Καραμπατάκης Θ., Τσικρικώνας Γ., Αμπδαρμάνη Μ., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Μελέτη της συχνότητας θετικής οξεάντοχης χρώσης σε δείγματα βιολογικών υγρών που καλλιεργήθηκαν για μυκοβακτηρίδια. Τασίνα Ε., Δεληπάλλα Ι., Αρετάκη Ε., Καραμπατάκης Θ., Τσικρικώνας Γ., Σεβαστίδου Α., Ορφανού Α., Σιάκα Ε. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.
- Αίτια βακτηριαμιών σε χειρουργικούς ασθενείς. Τσικρικώνας Γ., Τασίνα Ε., Κυθρεώτου Γ., Ορφανού Α., Μιχαηλίδου Ι., Σιάκα Ε. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη: 25-27 Μαΐου 2012.
- Εργαστηριακή διερεύνηση υπερλιπιδαιμίας σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό. Τσικρικώνας Γ., Σιάνου Ε., Ντογραματζή Φ., Αθανασιάδου Ζ., Σλαβάκης Α. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα: 15-17 Μαρτίου 2012.

IV. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ/ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- Παρακολούθηση όλων των συνεδριών του '11th ESCMID Summer School' που πραγματοποιήθηκε από τις 21 έως 27 Ιουλίου 2012 στο Ίνσμπρουκ, στην Αυστρία.
- Συμμετοχή στο πρόγραμμα εκπαίδευσης για την Εργαστηριακή Διάγνωση της Ελονοσίας, που πραγματοποιήθηκε από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας σε συνεργασία με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, την Πέμπτη 3 Μαΐου 2012.
- Παρακολούθηση του 15^{ου} Σεμιναρίου Παιδιατρικών Λοιμώξεων που πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία της Ελληνικής Εταιρίας Παιδιατρικών Λοιμώξεων υπό την αιγίδα της Ελληνικής Εταιρίας Λοιμώξεων και της Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ., στις 11 Φεβρουαρίου 2012 στη Θεσσαλονίκη, στο ξενοδοχείο «Hyatt Regency».
- Παρακολούθηση του 26^{ου} Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας που οργανώθηκε από την Εταιρία Ιατρικής Βιοπαθολογίας Βορείου Ελλάδος στη Θεσσαλονίκη στις 4 και 5 Φεβρουαρίου 2012.
- Παρακολούθηση των εργασιών του 7^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας που έγινε από τις 15 μέχρι τις 17 Μαρτίου 2012 στο Μέγαρο Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών.

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΖΩΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΠΟ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΩΝ "**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΚΡΙΚΩΝΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Σπυρίδωνας Πουρνάρας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. **Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου**, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	13
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
I. ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ.....	16
I.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	16
I.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	18
I.1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ.....	23
I.2. ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ.....	26
I.2.1. ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ.....	26
I.2.2. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	27
I.2.3. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ.....	42
I.2.4. ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ.....	43
I.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ.....	44
I.4. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	47
I.4.1. Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	50
I.4.2. ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ.....	51
I.4.4. ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΕΣ.....	53
I.4.5. ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ (ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ).....	53
I.4.6. ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ (ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ).....	55
I.5. ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΙ ΣΤΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ (VRE).....	55
I.5.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ VRE.....	55
I.5.2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ VRE.....	60
I.5.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ VRE.....	62
I.5.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ VRE.....	63

II. ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ.....	65
II.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	65
II.2. ΣΤΑΔΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	69
II.3. ΑΝΙΧΜΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	73
II.4. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	76
II.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	80
II.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	81
III. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ.....	82
III.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ.....	83
III.2. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ESP.....	84
III.3. ΟΠΕΡΟΝΙΟ FSR.....	87
III.4. ΖΕΛΑΤΙΝΑΣΗ	91
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	96
I. ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	96
I.1. Στελέχη-Ταυτοποίηση.....	96
I.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	97
I.2.1. E tests.....	97
I.2.2. Σύστημα Vitek 2.....	99
I.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	100
I.3.1. Εξαγωγή του γενωμικού DNA.....	100
I.3.2. Βασικές αρχές της μεθόδου.....	100
I.3.3. Συνθήκες αντίδρασης.....	102
I.4. Μέθοδοι ηλεκτροφόρησης.....	105

I.5. Έλεγχος της παραγωγής αιμολυσίνης.....	107
I.6. Έλεγχος της παραγωγής ζελατινάσης.....	108
I.7. Έλεγχος της παραγωγής βιομεμβράνης.....	109
I.8. Στατιστική ανάλυση.....	112
II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	112
II.1. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών <i>E. faecium</i>	112
II.2. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών <i>E. faecalis</i>	113
II.3. Ανίχνευση των γονιδίων <i>vanA</i> και <i>vanB</i>	114
II.4. Ανίχνευση του γονιδίου <i>esp</i>	115
II.5. Ανίχνευση του γονιδίου <i>fsrb</i>	117
II.6. Ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης.....	117
II.7. Συσχέτιση της παραγωγής βιομεμβράνης με την παρουσία του γονιδίου <i>esp</i>	119
II.8. Συσχέτιση της παραγωγής βιομεμβράνης με την παρουσία του γονιδίου <i>fsrb</i>	121
II.9. Παραγωγή αιμολυσίνης και ζελατινάσης και συσχέτιση με την παραγωγή βιομεμβράνης.....	122
II.10. Συσχέτιση της παραγωγής αιμολυσίνης και ζελατινάσης με την παρουσία των γονιδίων <i>esp</i> και <i>fsrb</i>	126
II.11. Συσχέτιση της αντοχής στη βανκομυκίνη με το σχηματισμό βιομεμβράνης, την παρουσία του <i>esp</i> και την παρουσία του <i>fsrb</i>	127
II.12. Παραγωγή βιομεμβράνης και παρουσία του γονιδίου <i>esp</i> ανάλογα με τη θέση απομόνωσης.....	128

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	131
IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	142
V. SUMMARY.....	143
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	144

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* είναι παθογόνα που προκαλούν συχνά νοσοκομειακές λοιμώξεις, λόγω της αντοχής τους στα αντιβιοτικά και της ικανότητας τους να επιβιώνουν στο νοσοκομειακό περιβάλλον και να εκφράζουν διάφορους παθογόνους παράγοντες (**Harrington et al, 2004**). Ανάμεσά τους η πρωτεΐνη επιφάνειας των εντεροκόκκων (*Esp*), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *esp* (**Shankar et al, 1999, Eaton et al, 2002**), έχει συσχετιστεί με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη (**Baldassarri et al, 2001, Shankar et al, 2001, Toledo-Arana et al, 2001, Waar et al, 2002**) και έχει συχνά ανιχνευθεί σε ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη *E. faecium*.

Η ικανότητα των εντεροκόκκων να σχηματίζουν βιομεμβράνες σε αβιοτικές επιφάνειες είναι μια σημαντική λοιμογόνος ιδιότητα (**Donelli et al, 2004**) που συμβάλλει στην πρόκληση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων (**Donlan et al, 2002**) και μπορεί να αύξει την αντοχή στα αντιβιοτικά και την ανοσολογική απόκριση (**Donelli et al, 2004, Donlan et al, 2002**). Η ικανότητα να σχηματίσουν βιομεμβράνες είναι συχνή μεταξύ των κλινικών στελεχών *E. faecalis* και έχει προταθεί ότι περιορίζεται σε στελέχη που φέρουν το γονίδιο *esp* (**Toledo-Arana et al, 2001**). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο *esp* μπορεί να μην είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό βιομεμβράνης (**Mohamed et al., 2004, Dworniczek et al, 2003**) και, σε γενικές γραμμές, οι ακριβείς παράγοντες που εμπλέκονται στην παραγωγή βιομεμβρανών από εντεροκόκκους είναι ακόμη άγνωστοι.

Το γονίδιο *fsrB* που είναι μέρος του συμπλέγματος των γονιδίων *fsr* που κωδικοποιούν την φερομόνη της ζελατινάσης, ρυθμίζει την παραγωγή βιομεμβράνης στον *E. faecalis* και συμβάλλει στην παθογονικότητα των εντεροκόκκων (**Hancock & Perego, 2004, Garsin et al, 2001, Qin et al, 2000, 2001, Mylonakis et al, 2002, Nakayama et al, 2001, Otto et al, 2001**).

Η αιμολυσίνη είναι κυτταρολυτική πρωτεΐνη ικανή να λύει τα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου, άλογου και κουνελιού. Στελέχη *E. faecalis* που παράγουν αιμολυσίνη φαίνεται να είναι μολυσματικά σε μοντέλα λοιμώξεων σε ζώα και ανθρώπους (**Ike et al, 1984, 1987, Chow et al, 1993**) και συσχετίστηκαν με αυξημένη βαρύτητα της λοίμωξης (**Johnson et al, 1994**). Από την ως τώρα βιβλιογραφία, μια πιθανή συσχέτιση της παραγωγής αιμολυσίνης με το σχηματισμό βιομεμβράνης από εντερόκοκκους δεν έχει αναφερθεί.

Επίσης, η ζελατινάση είναι μια πρωτεάση που υδρολύει τη ζελατίνη, το κολλαγόνο και άλλα πεπτίδια (**Kreft et al, 1992**) και μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όσον αφορά τη σοβαρότητα των συστηματικών εντεροκοκκικών λοιμώξεων (**Shankar et al, 2001, Creti et al, 2004**). Η ζελατινάση έχει επίσης προταθεί ότι συμμετέχει στο σχηματισμό βιομεμβράνης, μεσολαβώντας σήματα που έρχονται μέσω του συστήματος αίσθησης απαρτίας *fsr* (**Hancock & Perego, 2004**). Η παρουσία και συχνότητα των γονιδίων *esp* και *fsrb* σε κλινικά στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium* είναι καλά τεκμηριωμένη (**Dupre et al, 2003, Klibi et al, 2007, Roberts et al, 2004**).

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναλύσει επίσης τη συχνότητα αυτών των γονιδίων σε εντερόκοκκους από κόπρανα ανθρώπων (**Mohamed et al, 2004, Scott et al, 2005, Whitman et al, 2007**), αλλά τα δεδομένα σχετικά με την παρουσία τους σε εντερόκοκκους από ζώα είναι περιορισμένα (**Dupont et al, 1998, Macovel et al, 2009**). Επιπλέον, περιορισμένα δεδομένα είναι διαθέσιμα σχετικά με την ικανότητα για σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ των εντερόκοκκων από τα ζώα ενώ, από όσα γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με πιθανές διαφορές στο σχηματισμό βιομεμβρανών μεταξύ των εντερόκοκκων ανθρώπινης και ζωϊκής προέλευσης. Πιστεύουμε ότι τέτοια δεδομένα θα ήταν χρήσιμα στην κατανόηση διαφορών στην παθογονικότητα στελεχών εντεροκόκκων από ανθρώπους σε σύγκριση με στελέχη από ζώα. Η παρούσα μελέτη είχε

σκοπό να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση μεταξύ λοιμογόνων παραγόντων, όπως η αιμολυσίνη και η ζελατινάση, η παρουσία των γονιδίων *esp* και *fsrb* και του ποιοτικού και ποσοτικού σχηματισμού βιομεμβράνης σε κλινικά στελέχη και στελέχη εντεροκόκκων από κόπρανα ανθρώπων σε σύγκριση με εντερόκοκκους από ζώα.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

I.1. ΓΕΝΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εντερόκοκκοι αρχικά ταξινομήθηκαν ως ομάδα D του γένους των στρεπτόκοκκων, αλλά το 1984, βασιζόμενοι σε γενετικές μελέτες οι εντερόκοκκοι ορίστηκαν ως ξεχωριστό γένος (**Schleifer et al, 1984**). Μέχρι στιγμής 35 είδη συμπεριλαμβάνονται στο γένος των εντερόκοκκων. Τα περισσότερα είδη μπορούν να αναπτύσσονται παρουσία 6.5% NaCl, 40% χολικών αλάτων, σε pH 9.6 και μπορούν να επιζήσουν για 30' στους 60°C. Τα περισσότερα είδη μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες που ποικίλλουν από 10 σε 45°C (**Moellering et al, 1992**). Είναι οξειδάση- και καταλάση-αρνητικοί Gram θετικοί κόκκοι που στη χρώση Gram διατάσσονται σε ζευγάρια ή σε μικρές αλυσίδες. Μπορούν και επιζούν σε δύσμενεις κλιματολογικές συνθήκες όπως ξηρασία (**Wendt et al, 1998**), υψηλές θερμοκρασίες (**Bradley et al, 1996**) και έκθεση σε αντισηπτικά (**Kampf et al, 1999**), όπου μπορούν να επιζήσουν για παραταταταμένες περιόδους (**Gastmeier et al, 1998**).

Οι εντερόκοκκοι είναι σημαντικά παθογόνα μικρόβια και συχνή αιτία λοιμώξεων στους ανθρώπους (**Evans et al, 1947, Murray, 1990**). Προσβάλλουν το ουροποιητικό σύστημα (**Edelstein et al, 1988**), το αίμα (**Boulanger et al, 1991**), το ενδοκάρδιο (**Eliopoulos et al, 1990**), τα χοληφόρα (**Maki et al, 1988**), την κοιλιά (**Barrall et al, 1985**), εγκαύματα (**Jones et al, 1986**) και προσθετικές ξένες συσκευές όπως φλεβοκαθετήρες (**Richet et al, 1990**). Αν και οι εντερόκοκκοι μπορούν να προσβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (**Bayer et al, 1976**), τους πνεύμονες (**Berk et al, 1983**), τους μαλακούς

ιστούς (**Horvitz et al, 1977**), την ρινική οδό (**Doyle et al, 1991**), το αυτί (**Rantz et al, 1943**), τον οφθαλμό (συνήθως μετεγχειρητικές επιπλοκές μετά από επέμβαση καταρράκτη) (**Stevens et al, 1992**) και περιοδοντικούς ιστούς (**Gold et al, 1975**), αυτές οι λοιμώξεις δεν συμβαίνουν πολύ συχνά. Αποτελούν την δεύτερη αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού σε Ευρώπη και ΗΠΑ (**Moellering et al, 1992**). Ο *Enterococcus faecalis* προκαλεί το 80-90% των ανθρώπινων εντεροκοκκικών λοιμώξεων, ενώ ο *Enterococcus faecium* είναι υπεύθυνος για τις υπόλοιπες λοιμώξεις (**Murray, 1990**). Άλλα είδη εντερόκοκκων όπως ο *Enterococcus avium* (**Patel et al, 1993**), ο *Enterococcus casseliflavus* (**Pompei et al, 1991**), *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii* (**Kaufhold et al, 1991**), *Enterococcus raffinosus* (**Chow et al, 1993**), και *Enterococcus solitarius* έχουν σπανιότερα ενοχοποιηθεί για ανθρώπινες λοιμώξεις (**Facklam et al, 1989**). Τα εντεροκοκκικά στελέχη γίνονται παθογόνα σε ασθενείς σε μονάδες εντατικής θεραπείας και σε νοσοκομειακούς ασθενείς με σοβαρές υποκείμενες παθήσεις ή βλάβη του ανοσολογικού συστήματος ή σε ανθρώπους μεγάλης ηλικίας.

Οι εντερόκοκκοι είναι τώρα η τέταρτη αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων στην Ευρώπη και η τρίτη αιτία βακτηραιμίας στις ΗΠΑ (**Emori et al, 1993**), με σημαντική θνητότητα (**Weinstein et al, 1983**).

Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι η κύρια ανατομική περιοχή όπου οι εντερόκοκκοι συμβιώνουν με άλλους ζωντανούς μικροοργανισμούς χωρίς να προκαλούν εντερολοιμώξεις. Οι εντερόκοκκοι είναι οι κυρίαρχοι Gram-θετικοί κόκκοι στα κόπρανα, με συγκεντρώσεις από 10^5 έως 10^7 CFU/g, αλλά αποτελούν μόνο το 0.01% της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Παρά το γεγονός ότι αποικίζουν ευκαιριακά το στοματοφάρυγγα, πολύ σπάνια προκαλούν λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Απομονώνονται συχνά από φαγητά, φυτά, νερό και χώμα πιθανόν σαν

αποτέλεσμα διασποράς από τα κόπρανα και της αντοχής τους σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Vollaard *et al*, 1994). Η ανίχνευση των εντερόκοκκων στο νερό θεωρείται ως δείκτης μόλυνσής του νερού από τα κόπρανα (Godfree *et al*, 1997).

Η εντεροκοκκική βακτηριαμία μπορεί να προέρχεται από ενδοφλέβιες γραμμές, αποστήματα και λοιμώξεις του ουροποιητικού (Jett *et al*, 1994). Οι παράγοντες κινδύνου για θνησιμότητα που σχετίζεται με εντεροκοκκική βακτηριαμία περιλαμβάνουν την σοβαρότητα της ασθένειας, την ηλικία και την χρήση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών όπως τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και μετρονιδαζόλη (Sood *et al*, 1998). Αντιφατικά δεδομένα έχουν αναφερθεί όσον αφορά την επίδραση της αντοχής στην βανκομυκίνη και σε υψηλές συγκεντρώσεις γενταμικίνης όσον αφορά την θνησιμότητα (Huycke *et al*, 1991). Η εντεροκοκκική βακτηριαμία μπορεί να οδηγήσει σε ενδοκαρδίτιδα, που είναι η πιο σοβαρή εντεροκοκκική λοίμωξη και έχει συσχετιστεί με υψηλή θνησιμότητα (Megran, 1992). Οι εντερόκοκκοι είναι το τρίτο αίτιο πρόκλησης ενδοκαρδίτιδας (5-20 % όλων των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας) μετά τους στρεπτόκοκκους και τον *S. aureus* (Lucas *et al*, 1998).

Για να δράσουν οι εντερόκοκκοι ως παθογόνα προσκολλώνται πρώτα στα κύτταρα του ξενιστή μέσω παράγοντων που διευκολύνουν την προσκόλληση και την εισβολή στους ιστούς και προκαλούν βλάβες μέσω της παραγωγής τοξινών.

1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η πρώτη εξέταση της παθογονικότητας των εντερόκοκκων αναφέρθηκε το 1899 (MacCallum *et al*, 1899), τον πρώτο χρόνο που ανακαλύφθηκαν οι μικροοργανισμοί αυτοί (Thiercelin, 1899). Οι Mc Callum και Hastings (MacCallum *et al*, 1899), περιέγραψαν μια σπάνια περίπτωση ενδοκαρδίτιδας σε ασθενή στο νοσοκομείο “The Johns Hopkins” προκαλούμενη από έναν μικροοργανισμό που ονόμασαν *Micrococcus*

zymogenes. Το βακτήριο εξέφραζε αιμολυτικές ιδιότητες και δραστηριότητα πρωτεάσης (ζελατινάσης) (MacCallum *et al*, 1899) και πιθανόν αντιπροσώπευε τον *E. faecalis* (Breed *et al*, 1948).

Η πρώτη συστηματική μελέτη των ιδιοτήτων ενός παράγοντα παθογονικότητας των εντερόκοκκων ήταν η μελέτη της αιμολυσίνης από τον Todd το 1934, (Todd, 1934). Αυτός παρατήρησε ότι αν και μερικά στελέχη του *E. faecalis* παρήγαγαν ευδιάκριτες ζώνες αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ, αυτή η ομάδα δεν παρήγαγε αιμολυτικά διηθήματα όταν αναπτύχθηκε σε ζωμό Hewitt's (Todd, 1934).

Η αιμολυσίνη που παράγεται από τον *E. faecalis* αναγνωρίζεται από την ανάπτυξη διαυγών ζωνών γύρω από τις αποικίες σε αιματούχο άγαρ. Αυτός ο φαινότυπος του *E. faecalis* συχνά παραβλέπεται σε κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια γιατί τα ερυθροκύτταρα προβάτου, τα κύτταρα στόχοι που συχνά χρησιμοποιούνται σε αιματούχο άγαρ είναι ανθεκτικά στην λύση που προκαλείται από αιμολυσίνες. Τα ερυθροκύτταρα από κουνέλια, ανθρώπους, άλογα και αγελάδες, παθαίνουν εύκολα λύση από την αιμολυσίνη του *E. faecalis* και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να αναγνωρίσουν αυτό τον φαινότυπο (Basinger *et al*, 1968). Ο πιο γενικός όρος κυτταρολυσίνη προτιμάται έναντι του ιστορικού όρου αιμολυσίνη καθώς το εύρος του κυτταρικού στόχου είναι γενικότερο και περιλαμβάνει ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα.

Η παραγωγή αιμολυσίνης από τον *E. faecalis* ήταν μέχρι πρότινος ένα κριτήριο για την ταξινόμηση σε *Streptococcus zymogenes* ή αργότερα *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* (Breed *et al*, 1957). Το εύρημα ότι η αιμολυσίνη μεταφέρεται με τα πλασμίδια και επομένως είναι ένα μεταβλητό χαρακτηριστικό (Bridge *et al*, 1983) μαζί με δεδομένα που τοποθετούν όλα τα είδη του *E. faecalis* σε μια ομάδα οδήγησαν στην εγκατάλειψη του ορισμού *zymogenes* (Mundt, 1986).

Άλλοι παράγοντες στενά συνδεδεμένοι με τους εντερόκοκκους αλλά λιγότερο μελετημένοι είναι η υαλουρανιδάση (**Rosan et al, 1964**) και η ζελατινάση (**Sherman, 1937**). Το 1955 οι Schultz-Haudt και Scherp βρήκαν ότι η αρχική διαταραχή στην περιοδοντική νόσο είναι μια διαταραχή των στοιχείων της ενδοκυττάριας οστέινης ουσίας του επιθηλίου σαν αποτέλεσμα δραστηριότητας μυκοπολυσακχαριδασών (ή υαλουρονιδασών) (**Schultz-Haudt et al, 1955**). Αυτή η επίδραση αποδόθηκε κυρίως σε στελέχη του *Streptococcus mitis* και *Streptococcus salivarius*. Οι εντερόκοκκοι που παρήγαγαν υαλουρονιδάση περιγράφηκαν από τους Rosan και Williams σε έρευνες μικροοργανισμών που προκαλούσαν περιοδοντική νόσο (**Rosan et al, 1964**). Η συμβολή αυτού του ενζύμου στην περιοδοντική ασθένεια δεν έχει περαιτέρω μελετηθεί αν και οι εντερόκοκκοι απομονώνονται συχνά από περιοδοντικές λοιμώξεις (**Fox et al, 1967**). Στελέχη *E. faecalis* με δραστηριότητα πρωτεασών αναφέρθηκαν ως *E. faecalis* var. *Liquefaciens* (**Sherman, 1937**). Λίγες όμως έρευνες αναφέρονται στην δραστηριότητα των πρωτεασών.

Η ανικανότητα των εντερόκοκκων να προκαλούν χρόνιες ή σοβαρές λοιμώξεις σε ζώα, μετά από ενοφθαλμισμό στον υποδόριο ιστό ή στην περιτοναϊκή κοιλότητα, έχει χρησιμοποιηθεί για να υποστηρίξει δεδομένα σχετικά με την μη τοξικότητα των εντερόκοκκων. Ο Hite και οι συνεργάτες (**Hite et al, 1949**) ανέφεραν το 1949 ότι οι εντερόκοκκοι προκάλεσαν τον σχηματισμό νεκρωτικών αποστημάτων στα κοιλιακά τοιχώματα ποντικών σε συνέργεια με αναερόβια βακτηρίδια. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι εντερόκοκκοι μαζί με αναερόβια που νεκρώθηκαν με θερμότητα συνέχισαν τον σχηματισμό αποστημάτων ενώ νεκρωμένοι με θερμότητα εντερόκοκκοι δεν αύξησαν την τοξικότητα των ζωντανών αναερόβιων (**Hite et al, 1949**). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και με άλλες έρευνες αλλά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβαίνει η συνεργικότητα των μικροβίων είναι ασαφείς.

Σε ένα μεγάλο παιδιατρικό νοσοκομείο στις ΗΠΑ, οι εντερόκοκκοι ήταν υπεύθυνοι για το 0.7% όλων των επεισοδίων βακτηριαμίας το 1986 σε σχέση με το 4.8% το 1991 (**Christie et al, 1994**). Κατά την διάρκεια των χρόνων 1992 ως 1997 ήταν υπεύθυνοι για το 6.2% των βακτηριακών λοιμώξεων σε παιδιατρικές μονάδες εντατικής θεραπείας (**Richards et al, 1999**). Σε μια μελέτη νοσοκομειακών λοιμώξεων σε 827 νεογνά σε 29 εντατικές μονάδες νεογνών στις ΗΠΑ σε μια μέρα το 1999, οι εντερόκοκκοι ήταν τρίτοι μετά τους κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους και την *Candida* ως τα πιο κοινά αναγνωρίσιμα νοσοκομειακά παθογόνα. Ήταν υπεύθυνοι για το 10.3% των παθογόνων που απομονώθηκαν και προκάλεσαν το 15.5% των βακτηριαμιών (**Sohn et al, 2001**).

Ο *E. faecalis* ήταν υπεύθυνος για όλες τις κλινικές εντεροκοκκικές λοιμώξεις και προκάλεσε το 91% των επεισοδίων σε ένα γενικό νοσοκομείο κατά την διάρκεια των χρόνων 1963 ως 1977 (**Shlaes et al, 1981**) και το 100% των εντεροκοκκικών βακτηριαμιών σε νεογνικές μονάδες από το 1980 ως το 1984 (**Luginbuhl et al, 1987**). Η συχνότερη εμφάνιση αντοχής στην αμπικιλίνη και στα γλυκοπεπτίδια στον *E. faecium* έχει συσχετιστεί με αύξηση στην αναλογία των λοιμώξεων που αποδίδονται στον *E. faecium*. Ο *E. faecium* ήταν υπεύθυνος για το 11 ως 60% των επεισοδίων βακτηριαμίας από το 1984 ως το 2004 (**Huycke et al, 1998**). Στις ΗΠΑ μεταξύ εντερόκοκκων από καλλιέργειες αίματος η αναλογία των *E. faecalis* μειώθηκε σημαντικά από 84% το 1988/89 σε 58% το 1994, κατά την διάρκεια των οποίων η αναλογία των *E. faecium* αυξήθηκε από 13 σε 36.3% (**Iwen et al, 1997**). Αποτελέσματα από το 1997 ως το 1999 έδειξαν την τάση: ο *E. faecalis* ήταν υπεύθυνος για το 57% ως το 77% των στελεχών από το αίμα, αναπνευστικό, τραύματα και ουρολοιμώξεις στον Καναδά, Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Ασία περιοχή Ειρηνικού και στις ΗΠΑ. Ο *E. faecium* απομονώθηκε σε 15-20% των περιπτώσεων σε όλες τις περιοχές εκτός από Λατινική Αμερική που ήταν υπεύθυνος μόνο για το 5% των στελεχών.

Η διάδοση των ανθεκτικών στην αμπικιλίνη *E. faecium* είναι δραματική. Σε μελέτες από την Ισπανία ανέφεραν αντοχή στην πενικιλίνη σε 17% των στελεχών του *E. faecium* το 1991, 53% το 1995, και 75% το 2002 (Fortún *et al*, 2002, Coque *et al*, 2005). Αυτά τα στελέχη έδειξαν αντοχή σε άλλα αντιμικροβιακά συμπεριλαμβανομένων των κινολονών, μακρολίδων, και αμινογλυκοσιδών από ότι τα στελέχη ευαίσθητα στην πενικιλίνη που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας περιόδου.

Η απόκτηση της μεταφερόμενης με πλασμίδια αντοχής στα γλυκοπεπτίδια αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε στελέχη *E. faecium* ανθεκτικά στην αμπικιλίνη το 1988 (Uttley *et al*, 1988). Συχνή και εκτενής διασπορά των ανθεκτικών στελεχών επακολούθησε (Budavari *et al*, 1997, Branley *et al*, 1996, Melhus *et al*, 1996). Η επικράτηση της αντοχής στα γλυκοπεπτίδια παραμένει σημαντικά υψηλή μεταξύ στελεχών του *E. faecium* σε σχέση με τον *E. faecalis*, και έχει αναφερθεί σε 60% των στελεχών του *E. faecium* σε σχέση με 2% των στελεχών του *E. faecalis* κατά την διάρκεια των χρόνων 1995 ως 2002 στις ΗΠΑ.

Η μεγάλη διασπορά των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE) είναι ένα θέμα που συζητάται σε πολλές έρευνες. Οι μηχανισμοί φαίνεται να διαφέρουν σε κάθε πλευρά του Ατλαντικού. Στις ΗΠΑ, η ανίχνευση των VRE έχει συσχετιστεί πρωταρχικά με τη νοσοκομειακή νοσηλεία, με σχετικά λίγες περιπτώσεις να ανιχνεύονται στην κοινότητα (Coque *et al*, 1996, Martone 1998). Στην Ευρώπη οι έρευνες έχουν δείξει επικράτηση των VRE στην κοινότητα, άσχετα με την νοσηλεία στο νοσοκομείο (Van der Auwera *et al*, 1996). Αυτά τα στελέχη δεν διασπείρονται απαραίτητα ευρέως. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η εμφάνιση των VRE στην Ευρώπη επηρεάστηκε από την χρήση γλυκοπεπτιδίων, ιδιαίτερα του avoparcin, σε ζωοτροφές με επακόλουθο αποικισμό των ζώων και των πουλερικών με στελέχη ανθεκτικά στα γλυκοπεπτίδια (Bates, 1995, 1993). Αυτή η μέθοδος τώρα απαγορεύτηκε. Στις ΗΠΑ, η εμφάνιση των VRE έχει

συσχετιστεί με νοσηλεία στο νοσοκομείο, έκθεση στην βανκομυκίνη, και νοσοκομειακή εξάπλωση των ανθεκτικών κλώνων.

Οι οξαζολιδινόνες είναι μία νέα τάξη συνθετικών αντιμικροβιακών φαρμάκων που δεν σχετίζεται και δεν επηρεάζεται από τους υπάρχοντες μηχανισμούς αντοχής στα βακτήρια. Ωστόσο, το 2001 οι Gonzales και συνεργάτες (**Gonzales et al, 2001**), ανέφεραν την απομόνωση ενός στελέχους *E. faecium* ανθεκτικού στην λινεζολίδα από πέντε ασθενείς. Ακολούθησαν και άλλες σποραδικές περιπτώσεις (**Rahim et al, 2003, Krawczyk et al, 2004, Burleson et al, 2004**). Έχει ανιχνευτεί χαμηλό επίπεδο ανθεκτικών στελεχών στην λινεζολίδα. Στις ΗΠΑ το 2004, 99.5% και 96.4% των *E. faecalis* και *E. faecium* αντίστοιχα, ήταν ευαίσθητα στην λινεζολίδα (**Draghi et al, 2005**). Παρόλαυτα, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή. Στην Γερμανία οι Klare και συνεργάτες (**Klare et al, 2005**) ανέφεραν την έκφραση αντοχής στην λινεζολίδα σε στελέχη *E. faecium* ανθεκτικά σε αμπικιλίνη-γλυκοπεπτιδία, που ανήκαν στον επιδημικό παθογονικό κλώνο complex-17 (έναν κλώνο του *E. faecium*) που εκφράζει το φαινότυπο VanA που έχει ήδη γρήγορη παγκόσμια διασπορά (**Jones et al, 2006**).

1.1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Η ταξινόμηση των εντεροκοκκικών ειδών είναι δύσκολη λόγω της σημαντικής φαινοτυπικής ποικιλίας τους (**Devriese et al, 1993**). Η ταξινόμηση των ειδών συχνά απαιτεί μεγάλο χρόνο επώασης (**Facklam et al, 2002**).

Οι περισσότεροι εντερόκοκκοι δεν παράγουν καθόλου (γάμμα) ή παράγουν μερικώς (άλφα) αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ. Η διαφοροποίηση από άλλους αιμολυτικούς ή μη αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας βιοχημικά τεστ. Η ταξινόμηση πραγματοποιείται στα κλινικά εργαστήρια βασιζόμενοι στον τύπο της αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ, το μέγεθος των αποικιών και την

μορφολογία, την χρώση Gram, την υδρόλυση της L-πυρολιδονυλ-2-ναφθυλαμίδης (PYR) και το τεστ λευκίνης αμινοπεπτιδάσης (LAP). Οι εντερόκοκκοι υδρολύουν την εσκουλίνη παρουσία 40% χολικών αλάτων και είναι ικανοί να αναπτύσσονται σε 6.5% αλατούχο διάλυμα, σε pH 9.6 και σε 10°C ως 45°C.

Βιοχημικά τεστ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαφοροποίηση των πιο κοινών ειδών. Ο *E. faecalis* σε αντίθεση με τον *E. faecium* αναπτύσσεται παρουσία tellurite, μειώνει το terazolium σε formazan και παράγει οξύ από σορβιτόλη και γλυκερόλη. Οι μελέτες κινητικότητας και χρωστικών ουσιών είναι επίσης χρήσιμες. Οι *E. casseliflavus* και *E. gallinarum* είναι κινητοί, ενώ και οι δυο *E. casseliflavus* και *E. mundtii* παράγουν κίτρινη χρωστική (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Φαινοτυπικά κριτήρια για την ταυτοποίηση των κλινικώς σημαντικών *Enterococci* (Koneman, 2006).

Είδος	ESC	LAP	PYR	Κινητικότητα	Χρωστική	HIP
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	-	+

ESC= Esculin, LAP=Leucine-beta-naththylamide, PYR = Pyrrolidonyl Aminopeptidase, HIP = Hippurate Hydrolysis.

Οι μέθοδοι γονοτυπικής ανίχνευσης που χρησιμοποιούν τα γονίδια *16S* και *23S* rDNA είναι περισσότερο ακριβείς αν και δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν μεταξύ των ειδών εντερόκοκκων (πχ. ο *E. gallinarum* και ο *E. casseliflavus* έχουν 99.8% ομολογία στο *16S* rDNA). Εναλλακτικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία όπως i) ειδική ενίσχυση με PCR του rRNA (Naimi *et al*, 1997), των γονιδίων *ddl* και *van* (Satake *et al*,

1997), *ace* (Duh *et al*, 2001) και *sodA* (Jackson *et al*, 2004) ii) ενίσχυση του μεταγραφικού ρυθμιστικού γονιδίου *Ef0027* (Liu *et al*, 2005) iii) sequencing των γονιδίων *ddl* (Ozawa *et al*, 2000), *cpn60* (Goh *et al*, 2000) και *atpA* (Naser *et al*, 2005) και iv) rep-PCR με τον primer (GTG)₅ (Svec *et al*, 2005).

Έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες τυποποίησης ανάμεσα σε εντεροκοκκικά στελέχη ανθρώπων και στελέχη τροφών. Αυτές οι έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει ποικιλία μοριακών μεθόδων, όπως ενισχυμένη rDNA περιοριστική ανάλυση (ARDRA) (Ulrich *et al*, 1998), ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), ανάλυση τυχαίου πολλαπλασιασμού του πολυμορφικού DNA (RADP)-PCR (Cocconcelli *et al*, 1995) και ανάλυση πολυμορφισμού μήκους πολλαπλασιασμένων θραυσμάτων (AFLP), (Antonishyn *et al*, 2000). Η PFGE έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για να δείξει τις διαφορές ανάμεσα σε κλινικά στελέχη και στελέχη τροφών (Klare *et al*, 1995) και μεταξύ στελεχών από πουλερικά και νοσοκομειακούς ασθενείς (Lemcke *et al*, 2000). Αν και η PFGE αποτελεί τη gold standard για την διάκριση μεταξύ στελεχών εντερόκοκκου του ίδιου είδους θεωρείται ακριβή μέθοδος και δύσκολα εφαρμόσιμη, διότι καταναλώνει χρόνο και είναι σύνθετη. Δυο νέες μέθοδοι: η πολυτοπική ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-multilocus sequence typing (MLST), βασισμένη στην νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίων και η πολλαπλή ανάλυση MLVA (multilocus variable analysis) έχουν αποδειχθεί περισσότερο ορθές μέθοδοι από ότι η PFGE (Homan *et al*, 2002). Για παράδειγμα η ανάλυση της δομής του στελέχους *E. faecium* 411 με αυτό τον τρόπο έδειξε ότι οι περισσότεροι εντερόκοκκοι που είναι νοσοκομειακοί και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη είναι μέρος ενός κλωνικού συμπλέγματος που ονομάζεται Complex-C17 (Willems *et al*, 2005). Η MLST είναι εξαιρετικά χρήσιμη για επιδημιολογική ανάλυση των στελεχών *E. faecium* και μαζί με τη MLVA μια καλή εναλλακτική λύση

στην PFGE. Παρά τις μεθόδους αυτές είναι δύσκολο να διακρίνουμε κλινικά και τροφικά στελέχη.

Η σωστή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους συμβάλλει σημαντικά στη σωστή ερμηνεία του αντιβιογράμματος λόγω της διαφορετικής ιδιοσυστασιακής αντοχής των διαφόρων ειδών στα αντιβιοτικά.

I.2. ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

I.2.1. ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Η προσκόλληση των βακτηρίων στους ιστούς του ξενιστή είναι ένα κρίσιμο βήμα για την διαδικασία της λοίμωξης (**Baddour et al, 1990**). Για συμβιόντες μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού όπως οι εντερόκοκκοι, οι προσκολλητικές ουσίες στους υποδοχείς των ευκαρυωτικών κυττάρων αναμένεται να παίζουν σπουδαίο ρόλο στην διατήρηση των προσκολληθέντων μικροβιακών κυττάρων. Χωρίς τους ειδικούς μηχανισμούς προσκόλλησης οι εντερόκοκκοι θα εξαλείφονταν από την ροή των περιεχομένων του αυλού του εντέρου. Η προσκόλληση μέσω των προσκολλητινών στα επιθηλιακά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα ή την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, είναι το πρώτο βήμα της λοίμωξης. Προσκολλητικά συστήματα έχουν αναφερθεί και σε άλλα παθογόνα όπως *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis* (**Bliska et al, 1993, Hasty et al, 1992, Hoepelman et al, 1992, Jones et al, 1992**). Αυτά τα προσκολλητικά μόρια παίζουν διάφορους ρόλους οδηγώντας σε φαγοκυττάρωση, προκαλώντας ή μειώνοντας τοπικές φλεγμονώδεις απαντήσεις, ή δρώντας σαν τοξίνες.

1.2.2. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Δεν έχουν όλα τα στελέχη εντερόκοκκων τους ίδιους παθογόνους παράγοντες. Παρά το γεγονός ότι πολλοί από τους παράγοντες παθογονικότητας απαντούν και στα δύο είδη (π.χ. οι νήσοι παθογονικότητας-PAIs έχουν ήδη περιγραφεί από τον Leavis και τους συνεργάτες το 2004 (**Leavis et al, 2004**) και για τους *E. faecium* και τους *E. faecalis*), οι λοιμογόνοι παράγοντες του *E. faecalis* είναι και οι πιο εκτενώς μελετημένοι. Διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες έχουν αναφερθεί από αναλύσεις παθογονικότητας σε μοντέλα ζώων (Πίνακας 2). Εμπλέκονται τόσο στην προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή όσο και σε εξωκυττάρειες πρωτεΐνες (AS, Esp, EfaA), στην αντοχή στα μακροφάγα (AS, HypR), στην καταστροφή κυττάρων και ιστών (Cyl, GelE, SprE) και στην διαφυγή του ανοσολογικού συστήματος (πολυσακχαριδική κάψα) (**Gilmore et al, 2002, Tendolkar et al, 2003**).

Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες παθογονικότητας σχετίζονται με συζευγμένα γονίδια πλασμιδίων (AS και Cyl) ή χρωμοσωμικές περιοχές όπως 1) το *fsr* locus (GelE, SprE, Fsr [**Nakayama et al, 2002**]), 2) η μεγάλη χρωμοσωμική περιοχή που περιγράφεται ως νήσος παθογονικότητας (Esp, Cyl, AS και GlS24 [**Shankar et al, 2002**]), και 3) το *cps* locus (**Hufnagel et al, 2004**). Οι παράγοντες παθογονικότητας των πλασμιδίων είναι μεταβιβάσιμοι με μηχανισμούς γονιδιακής μεταφοράς (**Wirth, 1994**). Πρόσφατα, ανιχνεύθηκε ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που συνεισφέρουν στην παθογονικότητα του *E. faecalis* από την αλληλουχία του στελέχους *E. faecalis* V583 και την νήσο παθογονικότητας στο στέλεχος MMH594 (**Paulsen et al, 2003**). Η μεγάλη αναλογία (25%) των μεταθετών γενετικών στοιχείων σε αυτό το στέλεχος που ανθίσταται στα αντιβιοτικά αντανακλούν την μεγάλη ικανότητα οριζόντιας μεταφοράς του.

Πίνακας 2: Γονίδια και παράγοντες παθογονικότητας του *E. faecalis*.

Γονίδιο	Παράγοντας	Ρόλος
Προσκολλητικά μόρια		
<i>agg</i>	Ουσία συνάθροισης (AS)	Προσκόλληση και αποικισμός Βακτηριακή σύζευξη
<i>efaA</i>	Αντιγόνο A του <i>E. faecalis</i>	Αποικισμός
<i>esp</i>	Εντεροκοκκική πρωτεΐνη επιφάνειας (Esp)	Προσκόλληση και αποικισμός
<i>ace</i>	Προσκολλητίνη του <i>E. faecalis</i> στο κολλαγόνο	Προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
Πρωτεάσες		
<i>gelE</i>	Ζελατινάση	Καταστροφή ιστών
<i>sprE</i>	Σερινοπρωτεάση	Καταστροφή ιστών
Εκκρινόμενοι παράγοντες		
<i>cylA-M</i>	Αιμολυσίνη	Καταστροφή ιστών
<i>Gls24</i>	Πρωτεΐνη επαγόμενη από στέρηση γλυκόζης	Παραμονή στον ξενιστή
Εξωπολυσακχαρίτες		
<i>cpsA-K</i>	Καψικός πολυσακχαρίτης	Αντίσταση στην άμυνα του ξενιστή
<i>epa</i>	Καψικός πολυσακχαρίτης	Μη καθοριζόμενη
Μεταγραφικοί ρυθμιστές		
<i>cylR1-R2</i>	Πεπτιδικό σύστημα δύο συστατικών	Ρύθμιση του <i>cylA-M</i>
<i>fsrA-C</i>	Ρυθμιστικό σύστημα τύπου Agr	Ρύθμιση του <i>gelE</i> και <i>sprE</i>
<i>etaRS</i>	Σύστημα τύπου OmpR δύο συστατικών	Μη καθοριζόμενη
<i>hypR</i>	Hydrogen peroxide regulator	Αντίσταση στην άμυνα του ξενιστή
<i>perR</i>	Peroxide regulator	Μη καθοριζόμενη

Αιμολυσίνη

Πολλά είδη εντερόκοκκων παράγουν αιμολυσίνη (Clewel, 1993). Δεδομένα ότι η αιμολυσίνη σχετίζεται με την παθογονικότητα αποκτήθηκαν από πειράματα σε ζώα. Σε ένα πειραματικό μοντέλο περιτονίτιδας οι μικροοργανισμοί που είχαν φυσιολογικό φαινότυπο αιμολυσίνης ήταν περισσότερο λοιμογόνιοι από τα ισογονικά μη αιμολυτικά στελέχη που παράχθηκαν με μετάλλαξη (Ike *et al*, 1984) ή άλλα μη αιμολυτικά στελέχη (Miyazaki *et al*, 1993). Η πρώτη απόδειξη της τοξινογόνου δράσης της αιμολυσίνης

παρουσιάστηκε από τους Ike και συνεργάτες (1984), οι οποίοι έδειξαν με δοκιμές σε ποντίκια ότι στελέχη *E. faecalis* που εκφράζαν την αιμολυσίνη ήταν πολύ πιο παθογονικά από τα ισογονικά, μη αιμολυτικά στελέχη. Μια περαιτέρω αύξηση της θνησιμότητας παρατηρήθηκε σε ένα υπερ-αιμολυτικό μεταλλαγμένο στέλεχος (Ike *et al*, 1984). Πιο πρόσφατα, χρησιμοποιώντας διαφορετικά στελέχη ποντικών και εντεροκόκκων, έχει επιβεβαιωθεί ότι η αιμολυσίνη συμβάλλει στη θανατηφόρο δόση LD50 (Dupont *et al*, 1998), και σε μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι άλλα γνωστά χαρακτηριστικά των εντεροκόκκων. Η αιμολυσίνη έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ένα σημαντικός καθοριστικός παράγοντας θνησιμότητας στην ενδοκαρδίτιδα. Σε ένα μοντέλο κουνελιών, διαπιστώθηκε ότι εγκαθίσταται ενδοκαρδίτιδα μετά τον καθετηριασμό και την ενδοφλέβια χορήγηση στελεχών *E. faecalis* ελαττωματικών στην έκφραση μιας επιφανειακής πρωτεΐνης που είναι γνωστή ως ουσία συνάθροισης, και / ή της αιμολυσίνης (Chow *et al*, 1993). Η έκφραση της αιμολυσίνης και της ουσίας συνάθροισης οδήγησε σε εκβλαστήσεις που συνδέονται με την θνησιμότητα στο 55% των ζώων, ενώ παρατηρήθηκε θνησιμότητα στο 15% όταν παρήχθη η ουσία συνάθροισης, αλλά όχι η αιμολυσίνη (Chow *et al*, 1993). Στα κουνέλια που ενέθηκαν με στελέχη εντεροκόκκων που εκφράζαν την αιμολυσίνη αλλά όχι την ουσία συνάθροισης δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα (Chow *et al*, 1993). Εκτός από υποξεία ενδοκαρδίτιδα, η οποία συχνά μπορεί να αποκτηθεί στην κοινότητα, οι περισσότερες εντεροκοκκικές λοιμώξεις συνήθως εμφανίζονται σε νοσοκομειακούς ασθενείς, με σοβαρές υποκείμενες ασθένειες (Huycke *et al*, 1998). Σε ένα μοντέλο ενδοφθαλμίτιδας σε κουνέλια, η αιμολυσίνη κατέστρεψε το νευρικό ιστό του αμφιβληστροειδούς και την αρχιτεκτονική του σε μια περίοδο 24-72 h (Stevens *et al*, 1992). Η τοξικότητα στον αμφιβληστροειδή ιστό δεν εξασθένησε ούτε με αντιβιοτικά ούτε μετά από θεραπεία με αντιφλεγμονώδη όταν η λοίμωξη προκλήθηκε από αιμολυτικό στέλεχος, ενώ η λοίμωξη από ισογονικά, μη αιμολυτικά στελέχη υποχώρησε εντελώς όταν

και οι δύο αυτές θεραπείες δόθηκαν 24 ώρες μετά τη λοίμωξη (**Jett et al, 1995**). Οι μελέτες αυτές έδειξαν όχι μόνο τη συμβολή της αιμολυσίνης στην παθογένεια των εντεροκοκκικών λοιμώξεων, αλλά και στη δημιουργία της φλεγμονής. Σε ένα πειραματικό μοντέλο κατάποσης του εντερόκοκκου από *Caenorhabditis elegans*, η αιμολυσίνη παρατηρήθηκε ότι ενίσχυε τη θανάτωση των νηματωδών από τον *E. faecalis* (**Garsin et al, 2001**). Η παρατήρηση ότι η αιμολυσίνη είναι θανατηφόρα όχι μόνο για μια ποικιλία θηλαστικών ειδών, αλλά και για ασπόνδυλα, δείχνει ότι ο στόχος δράσης της αιμολυσίνης βρίσκονται παντού. Επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο της αιμολυσίνης στις λοιμώξεις. Η αιμολυσίνη παρατηρήθηκε ότι σχετίζεται με θνησιμότητα στους ανθρώπους μετά από ανάλυση μίας επιδημίας ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E. faecalis* (**Huycke et al, 1991**). Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς που είχαν μολυνθεί με αιμολυτικά, ανθεκτικά στη γενταμικίνη /καναμυκίνη στελέχη εμφάνισαν πενταπλάσια αυξημένο κίνδυνο θνητότητας ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα του θεραπευτικού σχήματος (**Huycke et al, 1991**).

Επί του παρόντος, οι μηχανισμοί με τους οποίους η αιμολυσίνη αυξάνει την τοξικότητα του *E. faecalis* δεν είναι καλά κατανοητοί αν και έχει αναφερθεί ότι αιμολυτικά στελέχη προκαλούν λύση των πολυμορφοπύρηνων ποντικών και των μακροφάγων (**Miyazaki et al, 1993**). Σε μια έρευνα εντεροκοκκικών λοιμώξεων στην Ιαπωνία, το 60% των κλινικών στελεχών ήταν αιμολυτικά σε σχέση με το 17% στελεχών από κόπρανα υγιών, δείχνοντας ότι η αιμολυσίνη έπαιξε ρόλο στην λοίμωξη (**Ike et al, 1987**). Συσχέτιση ανάμεσα στην σοβαρότητα της κλινικής προσβολής και της παραγωγής αιμολυσίνης αναφέρθηκε σε μια άλλη μελέτη, που το 40% των στελεχών που είχαν απομονωθεί από το αίμα, το 25% από ούρα και το 23% από τραύματα, ήταν αιμολυτικά σε σχέση με 0% από τον κόλπο και τα πτύελα (**Libertin et al, 1992**).

Ωστόσο, το γεγονός ότι μη αιμολυτικά στελέχη εντερόκοκκων μπορούν επίσης να προκαλέσουν κλινική προσβολή δείχνει ότι η αιμολυτική δραστηριότητα δεν είναι απαραίτητη για την παθογονικότητα των εντερόκοκκων.

Ο φαινότυπος της αιμολυσίνης καθορίζεται από μεταβιβαζόμενα πλασμίδια (**Ike et al, 1987**). Τα πλασμίδια που καθορίζουν την αιμολυσίνη βρέθηκε ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα ασυμβατότητας (**Colmar et al, 1987**). Εν τούτοις έχουν αναφερθεί πλασμίδια για την αιμολυσίνη και από άλλες ομάδες ασυμβατότητας (**Ike et al, 1992**). Τα γονίδια για την αιμολυσίνη υπάρχουν σαν χρωμοσωμικά στοιχεία (**Ike, 1992**). Το πιο ευρέως γνωστό πλασμίδιο αιμολυσίνης είναι το pAD1 (**Clewell et al, 1993**).

Ζελατινάση

Η ζελατινάση είναι μέλος της M4 οικογένειας πρωτεασών (TLPs) τύπου θερμολυσίνης που περιλαμβάνει τα ένζυμα από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως η *Legionella*, η *Listeria*, το *Clostridium*, ο *Staphylococcus*, η *Pseudomonas* και το *Vibrio* (**Barrett et al, 1998**). Πολλές από αυτές τις βακτηριακές μεταλλοπρωτεάσες έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την παθογονικότητα, ενώ οι λεγόμενες μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας (**Dhanaraj et al, 1996**) έδειξαν να συμμετέχουν σε μια σειρά διεργασιών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας των πρόδρομων ουσιών που παίζουν ρόλο στη διαφοροποίηση κατά τον σχηματισμό των όγκων (**Mäkinen et al, 1994**). Έτσι, οι μεταλλοπρωτεάσες της M4 οικογένειας έχουν προσελκύσει αυξανόμενη προσοχή σαν μοντέλα πρωτεϊνών για την ανάπτυξη ειδικών αναστολέων που μπορούν να εφαρμοστούν στη θεραπεία της νόσου (**Tamaki et al, 1995**). Οι μεταλλοπρωτεάσες (Metalloproteases, MMPs) ανήκουν στην οικογένεια των αποικοδομητικών ενζύμων του εξωκυττάριου χώρου. Ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως την αγγειογένεση, την επούλωση των πληγών και την αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου. Βάση της εξειδίκευσης του υποστρώματος, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορούν να διαιρεθούν σε

τέσσερις κύριες κατηγορίες: τις κολλαγονάσες, τις ζελατινάσες, τις στρωματολυσίνες και τις μεταλλοπρωτεάσες μεμβρανικού τύπου. Οι μεταλλοπρωτεάσες ανήκουν στις ενδοπεπτιδάσες και η καταλυτική τους δράση εξαρτάται από ένα ιόν μετάλλου στο καταλυτικό τους κέντρο (Ca^{+2} , Zn^{+2}).

Η ζελατινάση εμπλέκεται στη λοιμογόνο δύναμη του *E. faecalis* και από επιδημιολογικά στοιχεία και από μελέτες σε μοντέλα ζώων (Coque *et al*, 1995, Mylonakis *et al*, 2002). Η βιοχημική ανάλυση καθαρής ζελατινάσης έδειξε ότι διασπά μια σειρά υποστρωμάτων *in vitro*, συμπεριλαμβανομένης της β-αλυσίδας της ινσουλίνης, αδιάλυτα θραύσματα κολλαγόνου, της ενδοθηλίνης-1 και κατά κύριο λόγο υδρόφοβων αμινοξέων (Mäkinen *et al*, 1989, Mäkinen *et al*, 1994). Διαπιστώθηκε, επίσης ότι διαλύει τη φερομόνη και πεπτίδια-αναστολείς που εμπλέκονται στην μεταφορά με σύζευξη του πλασμιδίου στον *E. faecalis* (Mäkinen *et al*, 1989). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η ζελατινάση λειτουργεί για να καθαρίσει την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου από τις λάθος διπλωμένες πρωτεΐνες (Waters *et al*, 2003). Η ίδια μελέτη πρότεινε έναν άλλο ρόλο που έχει η ζελατινάση στην ενεργοποίηση μίας αυτολυσίνης και στην διάλυση των πολυμερών του ινώδους (Waters *et al*, 2003). Οι συγγραφείς αυτοί πρότειναν ότι η ζελατινάση δρά για την αύξηση της διάδοσης του *E. faecalis* σε υψηλής πυκνότητας περιβάλλοντα με την εγκατάσταση του μοντέλου δύο σταδίων της λοίμωξης από *Streptococcus pyogenes* όπως περιγράφεται από τους Rasmussen και Bjorck (Rasmussen *et al*, 2002). Στην πρώτη φάση, σε χαμηλή πυκνότητα βακτηριακών κυττάρων, ένα χαμηλό επίπεδο βακτηριακής πρωτεολυτικής δραστηριότητας οδηγεί σε προσκόλληση με τη μεσολάβηση επιφανειακών πρωτεϊνών. Στη δεύτερη φάση, σε μεγάλη βακτηριακή πυκνότητα κυττάρων, τα υψηλά επίπεδα πρωτεολυτικής δραστηριότητας προωθούν τη διάδοση των βακτηρίων διασπώντας τις βακτηριακές πρωτεΐνες στερέωσης και πρωτεΐνες των ιστών υποδοχής.

Η σημασία των εξωκυττάρων πρωτεασών του *E. faecalis* στην παθογένεια έχει αποδειχθεί σε ένα αριθμό βιολογικών μοντέλων (**Hancock et al, 2002**). Στοιχεία-συστατικά της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή είναι γνωστό ότι διασπώνται από τη ζελατινάση και περιλαμβάνουν το LL37 (**Trieu-Cuot et al, 1983**), την α -defensin (**Vuong C et al, 2003**) και τα συστατικά του συμπληρώματος C3a και C3b (**Schwan et al, 2003**), παρέχοντας στους εντερόκοκκους ένα μηχανισμό διαφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ζελατινάση φαίνεται επίσης ότι διασπά το ινώδες, ενισχύοντας, ενδεχομένως, την διάδοση των μικροοργανισμών *in vivo*.

Μια πιθανή συνεισφορά της εντεροκοκκικής ζελατινάσης στην παθογονικότητα αναφέρθηκε το 1975 από τους Gold και τους συνεργάτες (**Gold et al, 1975**). Αυτοί βρήκαν ότι ένα στέλεχος *E. faecalis* που παράγει ζελατινάση, απομονωμένο από ανθρώπους, το 2SaR προκάλεσε την εμφάνιση τερηδόνας σε ποντίκια ενώ τα μη πρωτεολυτικά στελέχη όχι. Σε αντίθεση άλλοι έχουν συνδέσει την παραγωγή ζελατινάσης με την ανθρώπινη προσβολή. Οι Kuhnen και οι συνεργάτες (**Kühnen et al, 1988**) ανέφεραν ότι η παραγωγή ζελατινάσης είναι κοινή μεταξύ στελεχών *E. faecalis* (63.7%) απομονωμένων από χειρουργικές και νευροχειρουργικές μονάδες εντατικής στην Γερμανία. Οι Coque και οι συνεργάτες (**Coque et al, 1993**) μελέτησαν 95 στελέχη εντερόκοκκων από ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα και άλλες νοσοκομειακές λοιμώξεις και βρήκαν ότι το 54% αυτών παρήγαγαν ζελατινάση.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου της ζελατινάσης *gelE* έδειξε μεγάλη ομοιότητα των αμινοξέων που κωδικοποιεί με την 33-kDa ψευδο-μεταλλοπρωτεΐνάση (ελαστάση) της *Pseudomonas aeruginosa* (**Su et al, 1991**). Αυτό το ένζυμο θεωρείται ένας παράγοντας παθογονικότητας σε σοβαρές λοιμώξεις από *Pseudomonas*, ιδιαίτερα σε ασθενείς με κυστική ίνωση (**Vasil, 1986**).

Εκτός από την πρωτεολυτική της δράση στους παράγοντες του ξενιστή, η ζελατινάση έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει ένα θετικό ρόλο στο σχηματισμό βιομεμβρανών από τον *E. faecalis* (**Hancock & Perego, 2004**). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ζελατινάση απαιτείται για το σχηματισμό της βιομεμβράνης και ότι προωθεί τη συγκέντρωση των κυττάρων σε μικροαποικίες ώστε να σχηματισθεί η πρωταρχική τοποθεσία προσκόλλησης και να ακολουθήσει η ανάπτυξη της βιομεμβράνης σε μια τρισδιάστατη δομή.

Υαλουρονιδάση

Μελέτες της υαλουρονιδάσης σε άλλους μικροοργανισμούς δείχνουν ότι αυτό το ένζυμο πιθανώς συμμετέχει στην παθογονικότητα των εντερόκοκκων. Η ανίχνευση της παραγωγής υαλουρονιδάσης από τους μικροοργανισμούς επιτυγχάνεται με ενοφθαλμισμό σε ημιστερεά μέσα που περιέχουν υαλουρονικό οξύ (**Hynes et al, 1989**). Ο Unsworth (**Unsworth, 1989**) παρατήρησε στελέχη του *Streptococcus milleri* σε αποστήματα που παρήγαγαν υαλουρονιδάση πιο συχνά (83%) από ότι στελέχη που ήταν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδος (25%). Η υαλουρονιδάση του πνευμονιόκοκκου φάνηκε να παίζει ρόλο σε φλεγμονές του μέσου ωτός σε ζώα (**Lowell et al, 1979**). Επίσης έχει περιγραφεί ως παράγοντας εξάπλωσης του *Ancylostoma duodenale* και του *Treponema palladium* (**Fitzgerald et al, 1987**). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η υαλουρονιδάση των εντερόκοκκων θα μπορούσε να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των ασθενειών στον άνθρωπο.

AS-48

Το AS-48 είναι ένα πεπτίδιο μεγέθους 7.4 KDa που παράγεται από τον *E. faecalis* και προκαλεί την λύση ευρέως φάσματος Gram θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των εντερόκοκκων (**Gálvez et al, 1989**). Αυτό το πεπτίδιο ασκεί βακτηριοκτόνο δράση στα κύτταρα (**Moellering et al, 1992**), και στόχος του είναι η

κυτταροπλασματική μεμβράνη, στην οποία ανοίγει τους πόρους, με αποτέλεσμα την εκπόλωση και το θάνατο των κυττάρων (**Gastmeier et al, 2006**), με έναν μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο που προτείνεται για την δράση των defensins ή, πιο γενικά, των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (**Evans et al, 1947**). Φαίνεται επίσης ότι προκαλεί λύση των εντερόκοκκων μέσω ενεργοποίησης μιας αυτολυσίνης (**Gálvez et al, 1990**). Το AS-48 σχετίζεται με ένα μεταβιβάσιμο πλασμίδιο (**Martínez Bueno et al, 1990**). Η σημαντικότητα αυτής της βακτηριοσίνης παραμένει αβέβαιη αφού δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί η διάδοση των στελεχών που παράγουν AS-48. Δεν έχει αναφερθεί δραστηριότητα των AS-48 έναντι κυτταρικών μεμβρανών των ευκαρυωτικών.

Λιποτειχοϊκό οξύ

Τα λιποτειχοϊκά οξέα απαντώνται συχνά στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι πολυμερή που αποτελούνται από ένα υδρόφιλο πολυγλυκερολοφωσφατιδικό άξονα που συνδέεται με έναν εστερικό δεσμό με μια υδρόφοβη γλυκολιπιδική ουρά. Για τους εντερόκοκκους αυτά τα μόρια της επιφάνειας (**Toon et al, 1972**) έχει αποδειχθεί ότι είναι όμοια με τα αντιγόνα της ομάδας D (**Wicken et al, 1963**). Διάφορα βιολογικά χαρακτηριστικά των εντεροκοκκικών λιποτειχοϊκών οξέων έχουν ερευνηθεί. Οι Beachey και συνεργάτες (**Beachey et al, 1979**) βρήκαν ότι τα εντεροκοκκικά λιποτειχοϊκά οξέα συνδέονται αναστρέψιμα με τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα όπως και τα λιποτειχοϊκά οξέα από *S. pyogenes*. Τα λιποτειχοϊκά οξέα συνεχώς απελευθερώνονται από τον *S. pyogenes* ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης του κύκλου (**Alkan et al, 1978**). Δεν είναι γνωστό εάν οι εντερόκοκκοι επίσης απελευθερώνουν λιποτειχοϊκά οξέα. Αυτά τα γεγονότα μπορεί να συσχετίζονται με μια τοπική φλεγμονώδη διαδικασία, γιατί τα λιποτειχοϊκά οξέα που συνδέονται με τα ευκαρυωτικά κύτταρα διατηρούν την αντιγονική τους ειδικότητα. Σαν αποτέλεσμα, αυτά τα κύτταρα μπορούν να υποστούν κυτταρική λύση προκαλούμενη από

το συμπλήρωμα (**Hummell et al, 1986**). Συνεπώς η καταστροφή του ιστού στα σημεία της λοίμωξης συμβαίνει λόγω ενεργοποίησης του συμπληρώματος από τα κύτταρα του ξενιστή και τα συνδεδεμένα με αυτά βακτηριακά λιποτειχοϊκά οξέα (**Hummell et al, 1986**).

Οι Bhakdi και οι συνεργάτες (**Bhakdi et al, 1991**) μελέτησαν την ικανότητα των λιποτειχοϊκών οξέων από κλινικά σημαντικούς Gram θετικούς μικροοργανισμούς να διεγείρουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης 1β, ιντερλευκίνης 6 και του TNF-α από καλλιεργημένα ανθρώπινα μονοκύτταρα. Αυτοί παρατήρησαν ότι τα λιποτειχοϊκά οξέα από τους *S. aureus* και *S. pneumoniae* δεν μπόρεσαν να επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών, ενώ τα λιποτειχοϊκά οξέα από διάφορα εντεροκοκκικά είδη σε συγκεντρώσεις από 0.5-5 μg/ml προκάλεσαν την απελευθέρωση και των τριών ειδών κυτταροκινών. Τα επίπεδα των κυτταροκινών μετά από διέγερση με λιποτειχοϊκά οξέα ήταν παρόμοια με τα επίπεδα που παρατηρήθηκαν μετά από έκθεση σε Gram αρνητικούς πολυσακχαρίτες. Παρομοίως οι Tsutsui και οι συνεργάτες (**Tsutsui et al, 1991**) βρήκαν ότι τα εντεροκοκκικά λιποτειχοϊκά οξέα είναι ένας πιθανός εκλυτικός παράγοντας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων και της ιντερφερόνης.

Τελικώς, οι Ehrenfeld και οι συνεργάτες (**Ehrenfeld et al, 1986**) ανέφεραν ότι τα λιποτειχοϊκά οξέα από τον *E. faecalis* ανέστειλαν την επαγόμενη από φερομόνες συνάθροιση των βακτηριακών κυττάρων. Αυτοί υπέθεσαν ότι τα λιποτειχοϊκά οξέα δρουν σαν ουσίες πρόσδεσης που αναγνωρίζονται από την ουσία προσκόλλησης στα κύτταρα του δότη. Η ανάλυση των γονιδίων που επηρεάζουν την ουσία πρόσδεσης έχει αποδειχθεί περίπλοκη και είναι σε εξέλιξη (**Bensing et al, 1993**). Πιθανόν τα εντεροκοκκικά λιποτειχοϊκά οξέα είναι παράγοντες παθογονικότητας ρυθμίζοντας τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και μέσω διευκόλυνσης της μεταφοράς πλασμιδίων.

Πρωτεΐνες και ινίδια της επιφάνειας των εντεροκόκκων

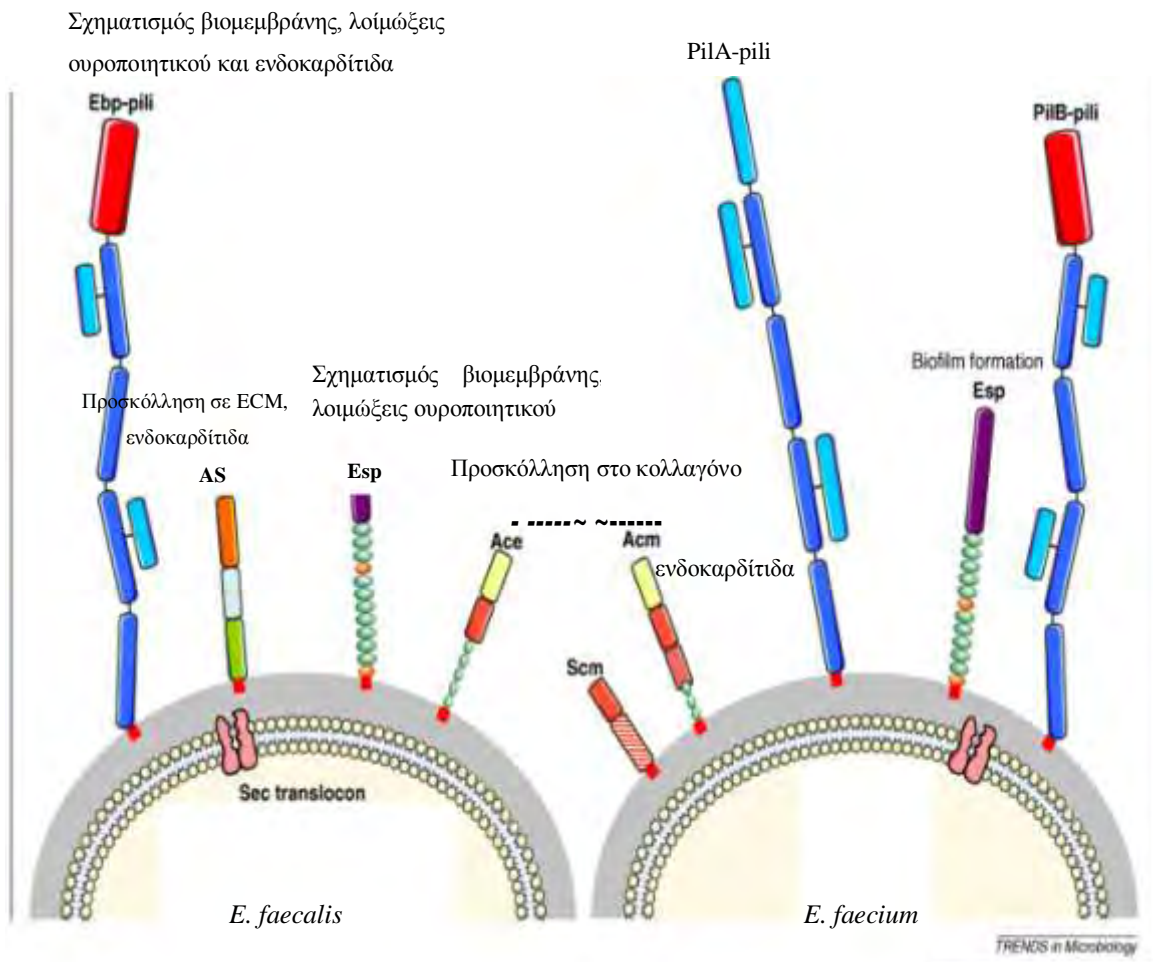
Διάφορα γονίδια των εντεροκόκκων, συμπεριλαμβανόμενου και αυτών που κωδικοποιούν επιφανειακές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην παθογένεση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων. Μία καλά μελετημένη τάξη επιφανειακών πρωτεϊνών στα Gram-θετικά μικρόβια είναι οι πρωτεΐνες LPxTG που βρίσκονται αγκυροβολημένες στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροβίων. Οι επιφανειακές πρωτεΐνες LPxTG χαρακτηρίζονται από ένα μοτίβο αμινοξέων Leu-Pro-x-Thr-Gly, (το x δηλώνει οποιαδήποτε αμινοξύ) το οποίο αναγνωρίζεται από μία τρανσπεπτιδάση, τη σορτάση (sortase). Το ένζυμο αυτό ακινητοποιεί τις επιφανειακές πρωτεΐνες στην πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος (**Dramsi et al, 2008**). Παραδείγματα πρωτεϊνών LPxTG είναι η επιφανειακή εντεροκοκκική πρωτεΐνη Esp, τα επιφανειακά εκτειθέμενα pili όπως το Ebr pili και η πολλαπλών λειτουργιών πρωτεΐνη που ονομάζεται ουσία συνάθροισης (aggregation substance ή AS) (**Hendrickx et al, 2009**). Στελέχη *E. faecium* που προέρχονταν από νοσοκομειακές λοιμώξεις έφεραν πιο συχνά γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Esp, τα pili τύπου PilA και PilB και τις αγκυροβολημένες στο κυτταρικό τοίχωμα επιφανειακές πρωτεΐνες σε σύγκριση με μη νοσοκομειακά στελέχη (**Rice et al, 2003, Leavis et al, 2004, Hendrickx et al, 2007, 2008**).

Η μελέτη του ρόλου των επιφανειακών πρωτεϊνών των εντεροκόκκων στη διαδικασία της λοίμωξης και του σχηματισμού των βιομεμβρανών θα οδηγήσει σε καλύτερη επίγνωση των μηχανισμών με τους οποίους τα ανθεκτικά αυτά μικρόβια προκαλούν μία νόσο και μπορεί να αποκαλύψει καινούριες επιλογές για τη θεραπεία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων.

Εντεροκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη (Esp)

Η Esp είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~202 kDa που εντοπίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου των εντερόκοκκων, αγκυροβολημένη στο κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 1) και αποτελείται από μία εκτεταμένη αλληλουχία από επαναλαμβανόμενα τμήματα καθορισμένα σαν A και C repeats.

Η πρωτεΐνη Esp του *E. faecalis* εμπλέκεται στον αποκισμό και στην επιμονή των λοιμώξεων στον ουροποιητικό σωλήνα (Shankar *et al*, 1999, 2001). Ένα ομόλογο του *esp* έχει αναγνωρισθεί στον *E. faecium* (Eaton & Gasson, 2002). Κλινικά στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium* φέρουν το γονίδιο *esp* πιο συχνά από ότι μη κλινικά στελέχη γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη Esp έχει ρόλο στις νοσοκομειακές λοιμώξεις (Shankar *et al*, 1999, Leavis *et al*, 2004). Η συνολική ομοιότητα των αμινοξέων μεταξύ των πρωτεϊνών Esp του *E. faecium* (Espfm) και του *E. faecalis* (Espfs) είναι υψηλή (>90%) (Leavis *et al*, 2004), υποδηλώνοντας ότι μοιράζονται παρόμοιες λειτουργίες και στους δύο μικροοργανισμούς. Και οι δύο περιέχουν μία αλληλουχία N-τελικού σήματος και μία μεταβλητή N-τελική περιοχή περίπου 700 αμινοξέων, που ακολουθείται από τρεις επαναλαμβανόμενες περιοχές που ονομάζονται A,B και C repeats. Ο αριθμός των A,B και C επαναλαμβανόμενων περιοχών στην πρωτεΐνη Esp ποικίλλει ανάμεσα στα στελέχη (Shankar *et al*, 1999, Leavis *et al*, 2004). Το C-τελικό άκρο της Esp σχηματίζεται από ένα μοτίβο αμινοξέων [Y/F]PXTG που μπορεί να αναγνωρισθεί από το ένζυμο sortase οδηγώντας έτσι στην αγκυροβολήση της Esp στο κυτταρικό τοίχωμα.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών επιφανειακών πρωτεϊνών και ινιδίων του *E. faecalis* (αριστερά) και *E. faecium* (δεξιά) που είναι ομοιοπολικά προσαρτημένα στην πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος (γκρί). Η λειτουργία τους απεικονίζεται πάνω από την κάθε πρωτεΐνη ή δομή (**Hendrickx et al, 2009**).

Οι πρωτεΐνες Esp παρουσιάζουν συγκρίσιμη οργάνωση των περιοχών τους (domain) με τις επιφανειακές πρωτεΐνες C, Rib, R28 και Bar των παθογόνων στρεπτοκόκκων και του *Staphylococcus aureus* (**Cucarella et al, 2001, Stålhammar-Carlemalm et al, 1993, 2007, Michel et al, 1992**). Η βιολογική λειτουργία αυτής της

ομάδας πρωτεϊνών έχει καθορισθεί ελάχιστα αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης στα βακτηριακά κύτταρα (Lindahl *et al*, 2005). Ο τρόπος με τον οποίο η Esp προστατεύει τους εντερόκοκκους έναντι του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή παραμένει ακόμα απροσδιόριστος.

Η Esp έχει συνδεθεί με την παθογονικότητα των εντερόκοκκων πιθανώς μέσω του αποικισμού των ιστών, του σχηματισμού των βιομεμβρανών και της διαφυγής του ανοσολογικού συστήματος (Rice *et al*, 2003, Leavis *et al*, 2004, Hendrickx *et al*, 2007, 2008, Kozłowicz *et al*, 2006, Chandler *et al*, 2005). Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε από τους Scott και συν. (Scott *et al*, 2005) ότι η παρουσία του γονιδίου *esp* του *E. faecium* είναι μια αξιόπιστη ένδειξη της παρουσίας λυμάτων από υπόνομους. Συγκεκριμένα το γονίδιο *esp* έχει προταθεί σαν δείκτης της ανθρώπινης ρύπανσης στα περιβαλλοντικά ύδατα, επειδή σπάνια ανευρίσκεται στα κόπρανα των ζώων. Αν και οι αρχικές έρευνες είναι ενθαρρυντικές λείπουν ακόμα οι μελέτες που επιβεβαιώνουν και επεκτείνουν την υπόθεση αυτή σε μεγάλο εύρος στελεχών ανθρώπινης και ζωϊκής προέλευσης.

AS: μια πολυλειτουργική επιφανειακή πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην λοιμογόνο δύναμη του *E. faecalis*

Ο παράγοντας συσσώρευσης (aggregation substance, AS) ή ουσία συνάθροισης είναι η πρώτη πρωτεΐνη επιφάνειας (LPxTG) που περιγράφηκε στους εντερόκοκκους και αποτελεί μία προσκολλητίνη καλά χαρακτηρισμένη από πλευράς των πολλών λειτουργιών της και της συμβολής της στην παθογονικότητα του *E. faecalis*. Ο όρος AS είναι η κοινή ονομασία για μια ομάδα πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από επαγώγιμα από φερομόνες σύζευκτικά πλασμιδία και που είναι πολύ παρόμοιες σε επίπεδο αμινοξέων. Τα γονίδια *asp1*, *asc10* και *asa1* κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες AS προερχόμενα από τρία, επαγώγιμα από φερομόνες σύζευκτικά πλασμιδία, τα pPD1, pCF10 και pAD1, αντίστοιχα. Η έκφραση

των γονιδίων της AS επάγεται από ένα αυτοκρινές ολιγοπεπτίδιο-φερομόνη, το οποίο εκκρίνεται από άλλους εντερόκοκκους (**Kozlowicz et al, 2006, Chandler et al, 2005**). Η έκφραση της AS στην επιφάνεια του κυττάρου κατευθύνει στη στενή φυσική επαφή μεταξύ του κυττάρου-δότη και του κυττάρου-δέκτη, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά των πλασμιδίων παθογονικότητας.

Η AS περιλαμβάνει ένα domain συσσώρευσης λιπτοιχοϊκού οξέως (LTA), μια μεταβλητή περιοχή, ένα κεντρικό domain συνάθροισης και δύο μοτίβα Arg-Gly-Asp (RGD). Οι τρεις πρωτεΐνες AS μοιράζονται πάνω από το 90% της ακολουθίας των αμινοξέων κατά το μεγαλύτερο μέρος τους, αν και μια κεντρική μεταβλητή περιοχή εμφανίζει μόνο 30-40% ομοιότητα (**Wirth, 1994**). Η δομή της πρωτεΐνης AS δεν έχει αποκαλυφθεί πλήρως και συνεπώς ο μηχανισμός με τον οποίο η AS συνδέεται με τον μόριο-υποδοχέα δεν έχει διευκρινιστεί. Η AS εμπλέκεται επίσης στην προσκόλληση και την εισβολή των κυττάρων που προέρχονται από το παχύ εντέρο και το δωδεκαδακτύλο, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παίζει έτσι ρόλο στη μετατόπιση του *E. faecalis* μέσω του εντερικού τοιχώματος, οδηγώντας σε συστηματική λοίμωξη (**Sartingen et al, 2000, Wells et al, 2000**).

Οι AS πρωτεΐνες Asc10 και Asa1 έχουν ενοχοποιηθεί για τη σύνδεση με συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), όπως το ινώδες, η φιβρονεκτίνη, η thrombospondin, η vitronectin και το κολλαγόνο τύπου I. Μεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή του γονιδίου *asa1* οδηγούν στην ελαττωμένη δέσμευση της φιβρονεκτίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταβλητή περιοχή είναι ένα ECM-δεσμευτικό domain (**Rozdzinski et al, 2001**). Επιπλέον, οι Asc10 και Asa1 έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην ενδοκαρδίτιδα. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές αύξησαν τη σοβαρότητα των εκβλαστήσεων του *E. faecalis* σε αορτικές καρδιακές βαλβίδες κουνελιών (**Chuang et al, 2009**). Ακόμη, η Asc10 αυξάνει την προσκόλληση, την

εσωτερίκευση και την ενδοκυττάρια επιβίωση των εντερόκοκκων στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (**Rakita et al, 1999, Vanek et al, 1999**). Ομοίως, η Asa1 ενισχύει την επιβίωση των εντερόκοκκων μέσα στα μακροφάγα και μεσολαβεί στην προσκόλληση τους στα νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (**Süssmuth et al, 2000**). Εν κατακλείδι, τόσο *in vitro* όσο και τα *in vivo* δεδομένα υποδεικνύουν ότι η AS είναι ένας πολυσύνθετος λοιμογόνος παράγοντας του *E. faecalis*.

1.2.3. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Για πολλά χρόνια πιστευόταν ότι η λοίμωξη από εντερόκοκκο προκαλούνταν ενδογενώς από την χλωρίδα του ασθενούς (**Kaye, 1982**). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι εντερόκοκκοι και τα πλασμίδια τους μεταβιβάζονται μεταξύ των ασθενών (**Boyle et al, 1983, Chow et al, 1993, Zervos et al, 1987**). Το προσωπικό επίσης του νοσοκομείου μπορεί να αποκτήσει και να μεταδώσει με τα κόπρανά του στελέχη εντερόκοκκων, δείχνοντας την σημασία αποικισμού του γαστρεντερικού συστήματος από εντερόκοκκους (**Zervos et al, 1986**). Κλώνοι εντερόκοκκων έχουν επίσης αναφερθεί να προκαλούν ενδημία σε νοσοκομεία από μήνες ως χρόνια (**Rhinehart et al, 1990**). Η μετάδοση του μικροοργανισμού από ασθενή σε ασθενή συνήθως δεν γίνεται άμεσα αλλά έμμεσα από τα μολυσμένα χέρια του προσωπικού ή με μολυσμένα εργαλεία ή συσκευές. Ένα θέμα που έχει μελετηθεί σε πολλές έρευνες είναι η χρήση παρεντερικών αντιβιοτικών χωρίς σημαντική αντι-εντεροκοκκική δραστηριότητα που προηγούνταν της ανάπτυξης λοίμωξης από εντερόκοκκο.

Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι συγκεκριμένα εξωγενή εντεροκοκκικά στελέχη έχουν υψηλές ικανότητες να αποικίζουν, να υπεραναπτύσσονται και να εισβάλλουν στους ιστούς του ξενιστή, και είναι ανθεκτικά σε σχέση με την ενδογενή

εντεροκοκκική χλωρίδα. Παραδείγματα παραγόντων που παρέχουν τέτοια γνωρίσματα μπορεί να περιλαμβάνουν την αιμολυσίνη του *E. faecalis* ή το πεπτίδιο AS-48.

1.2.4. ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ

Οι φερομόνες είναι μικρά υδροφοβα ολιγοπεπτίδια αποτελούμενα από 7 ως 8 αμινοξέα που εκκρίνονται από τον *E. faecalis* και διευκολύνουν τη μεταφορά με σύζευξη του πλασμιδίου του DNA ανάμεσα στα στελέχη (Clewell, 1993). Αυτά τα πεπτίδια αναφέρονται ως φερομόνες γιατί εξάγουν μια ειδική απόκριση από τα κύτταρα που μεταφέρουν τα πλασμίδια. Διάφορες φερομόνες μπορούν να εκκρίνονται ταυτόχρονα από ένα στέλεχος *E. faecalis*. Εκτός από τις φερομόνες, κάθε πλασμίδιο που ανταποκρίνεται στις φερομόνες κωδικοποιεί και ένα εκκρινόμενο πεπτίδιο που δρα σαν συναγωνιστικός αναστολέας στην ίδια την φερομόνη. Οι φερομόνες και τα συσχετιζόμενα ανασταλτικά πεπτίδια είναι χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα *in vitro* και προκαλούν την έκκριση λυσοσωμικών ενζύμων και την παραγωγή υπεροξειδίων (Novak *et al*, 1993).

Οι φερομόνες cAM373 και cPD1 μελετήθηκαν από τους Sannomiya και συνεργάτες (Sannomiya *et al*, 1990) για τη χημειοτακτική τους δράση σε νανο-γραμμομοριακές συγκεντρώσεις. Οι Ember και Hugli (Ember & Hugli, 1989), παρατήρησαν δραστηριότητα δύο με τρεις φορές μειωμένη των ίδιων φερομονών όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες. Αν και στελέχη *E. faecalis* εκκρίνουν πολλαπλές φερομόνες (Clewell *et al*, 1989) και η χημειοτακτική δράση των φερομονών εμφανίζεται και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το ερώτημα αν αυτά τα πεπτίδια ή οι αναστολείς τους ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις *in vivo* παραμένει αναπάντητο. Έχει βρεθεί ότι πράγματι, formylmethionyl-πεπτίδια που προέρχονται από αμινοτελικές

περιοχές νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών σε προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς είναι χημειοτακτικά για τα πολυμορφοπύρρηνα (**Miyake et al, 1983**).

I.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ

Οι εντερόκοκκοι, κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας, έχουν εξελιχθεί σε ένα σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακών λοιμώξεων, τόσο στην Ελλάδα όσο και διεθνώς. Προκαλούν ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων που περιλαμβάνει: την ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία, λοιμώξεις του ουροποιητικού, ενδοκοιλιακές, πυελικές λοιμώξεις και λοιμώξεις των τραυμάτων, καθώς και των μόνιμων γραμμών (**Koch et al, 2004**). Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις μπορούν να οφείλονται τουλάχιστον σε 12 είδη εντερόκοκκων συμπεριλαμβανόμενου των *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* και *E. solitaries* (**Moellering, 2000**). Είδη όπως οι *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. seriolicida* και *E. flavescens* έχουν προταθεί σαν επιπρόσθετα σε αυτή τη λίστα (**Moellering, 2000**). Οι περισσότερες κλινικές λοιμώξεις οφείλονται είτε στον *E. faecalis* ή στον *E. faecium*. Μέχρι πρόσφατα ο *E. faecalis* έχει αποτελέσει το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου και είναι υπεύθυνος για το 80 με 90% των κλινικών λοιμώξεων ενώ ο *E. faecium* είναι υπεύθυνος για το 5 με 15% (**Bhat et al, 1998, Facklam et al, 1998**). Ιστορικά, η αναλογία των λοιμώξεων που οφείλονται στον *E. faecalis* σε σχέση με αυτές που οφείλονται σε άλλα είδη εντεροκόκκων ήταν περίπου 10:1. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία προοδευτική μείωση αυτής της αναλογίας (**Mundy et al, 2000**). Αν και ο *E. faecalis* παραμένει το κυρίαρχο είδος στις κλινικές λοιμώξεις, αυξάνουν σε αναλογία τα στελέχη *E. faecium*. Αυτή η αλλαγή μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί με την εμφάνιση των VRE καθώς ο *E. faecium* αποτελεί το κυρίαρχο είδος που αναγνωρίζεται στους VRE.

Ενδοκαρδίτιδα

Η εντεροκοκκική ενδοκαρδίτιδα ως επιπλοκή της βακτηριαιμίας παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς της κοινότητας παρά σε νοσοκομειακούς ασθενείς. Οι νοσοκομειακές εντεροκοκκικές μικροβιαμίες είναι συχνά πολυμικροβιακές και με αυτή την έννοια σπάνια συνοδεύονται από ενδοκαρδίτιδα. Συχνότερες πύλες του εντερόκοκκου στο αίμα αποτελούν το ουροποιητικό, οι ενδοκοιλιακές ή πυελικές σηπτικές περιοχές, τα τραύματα και ειδικά τα θερμικά εγκαύματα, οι κατακλίσεις, τα διαβητικά έλκη των ποδών, ενδοαγγειακοί καθετήρες και η χολαγγειίτιδα. Η συχνότητα της εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας κυμαίνεται από 5-15%. Οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται στον *E. faecalis* αλλά υπάρχουν και ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα στους οποίους απομονώθηκαν *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* και *E. raffinosus* καθώς και *E. faecium* (Facklam & Collins, 1989).

Αποστήματα και λοιμώξεις μαλακών μορίων

Η ικανότητα των εντερόκοκκων να προσβάλλουν τους μαλακούς ιστούς ή το περιτόναιο σε ζώα (ή ανθρώπους) είναι περιορισμένη (Hite *et al*, 1949, Onderdonk *et al*, 1976) και έχει διερευνηθεί σε μία σειρά σχετικών δημοσιεύσεων (Hite *et al*, 1949, Onderdonk *et al*, 1976, Matlow *et al*, 1989, Martens *et al*, 1993).

Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις

Η σημασία του παθογενετικού ρόλου των εντερόκοκκων στην ενδοκοιλιακή σήψη έχει αμφισβητηθεί (Barie *et al*, 1990). Οι εντερόκοκκοι απομονώνονται μαζί με άλλους εντερικούς μικροοργανισμούς από τέτοιες λοιμώξεις (Burnett *et al*, 1995, Brook, 2004) και πιστεύεται ότι οι εντερόκοκκοι δεν είναι οι κύριοι εισβολείς αλλά δρουν συνεργικά με

άλλους περισσότερο παθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν την λοίμωξη (**Montravers et al, 1994, 1997**).

Μηνιγγίτιδα

Οι εντερόκοκκοι είναι σπάνια αιτία μηνιγγίτιδας αποτελώντας 0 ως 3 % των περιπτώσεων (**Suara & Dermody, 2000, Koorevaar et al, 1992, Anon 2005**). Σε μια έρευνα 1084 περιπτώσεων βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε παιδιά στην Γαλλία, οι εντερόκοκκοι δεν εμφανίστηκαν ανάμεσα στα παθογόνα (**Bingen et al, 2005**).

Λοιμώξεις του ουροποιητικού

Η ουροδόχος κύστη, ο προστάτης και οι νεφροί προσβάλλονται συχνά από εντερόκοκκους, ειδικά σε ασθενείς με ανατομικές ανωμαλίες του ουροποιητικού ή καθετήρες (**Felmingham & Wilson, 1992**). Η λοίμωξη συμβαίνει μέσω μικροοργανισμών που έχουν ανοδική πορεία στην ουρήθρα και τους ουρητήρες. Στελέχη *E. faecalis* που παρήγαγαν αιμολυσίνη και ζελατινάση δεν βρέθηκαν να προκαλούν συχνότερα πυελονεφρίτιδα από ότι στελέχη που δεν είχαν αυτούς τους φαινοτύπους (**Montgomerie et al, 1977**).

Βακτηραιμία

Οι εντερόκοκκοι είναι συχνή αιτία βακτηραιμίας στα υγιή παιδιά (**Boulanger et al, 1991**). Αποτελούν σπάνια αιτία σήψης στα νεογέννητα, ουρηθρικών λοιμώξεων που συνδέονται με βακτηραιμία, και ενδοκαρδίτιδας. Περισσότερο συχνά η εντεροκκική βακτηραιμία είναι νοσοκομειακή λοίμωξη. Οι εντερόκοκκοι είναι αιτία νεογνικής σήψης και βακτηραιμίας και σήψης σε σοβαρά άρρωστα παιδιά όπως σε αιματολογικές/ογκολογικές κλινικές και μονάδες εντατικής θεραπείας και σε αυτά με ενδοαγγειακούς καθετήρες.

1.4. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η θεραπεία των λοιμώξεων από εντερόκοκκους είναι δύσκολη καθώς αυτοί είναι ανθεκτικοί σε ένα μεγάλο συνδυασμό αντιμικροβιακών παραγόντων όπως αντισταφυλοκοκκικές β-λακτάμες, κεφαλοσπορίνες, κλινδαμυκίνη, αμινογλυκοσίδες και μπορούν να αποκτήσουν επίκτητη αντοχή σε άλλους παράγοντες όπως χλωραμφαινικόλη, σιπροφλοξασίνη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη, τριμεθοπρίμη και βανκομυκίνη .

Μέχρι σήμερα η βανκομυκίνη έχει αποτελέσει το φάρμακο εκλογής για τις λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικούς εντερόκοκκους. Η δραματικώς αυξανόμενη επίπτωση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE), κατά την τελευταία δεκαετία ωστόσο αποτελεί πολύ σοβαρό πρόβλημα. Αν και η αντοχή στη βανκομυκίνη εμφανίζεται σε λιγότερο από 10% των στελεχών των *E. faecium* στην Ευρώπη, είναι τώρα ορατή μέχρι και σε 60% των περιπτώσεων στις Η.Π.Α. Σαν αποτέλεσμα περιορίζονται οι επιλογές θεραπείας, ιδιαίτερα επειδή πολλά στελέχη VRE από ανθρώπους είναι τώρα ανθεκτικά σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως η χλωραμφαινικόλη, η δοξυκυκλίνη, η σιπροφλοξασίνη, η υψηλής δόσης πενικιλίνη, η αμπικιλλίνη-σουλμπακτάμη και η νιτροφουραντοΐνη (για λοιμώξεις του κατώτερου ουροποιητικού) (Edmond *et al*, 1999, Bolmstrom *et al*, 2002).

Το πιο κυρίαρχο είδος των εντερόκοκκων, ο *E. faecalis* είναι ενδογενώς ανθεκτικός στη στρεπτογραμίνη Β-Α (κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη) εξαιτίας της παρουσίας μίας ενδογενούς αντλίας εκροής που αυξάνει την αντοχή στη στρεπτογραμίνη Α (δαλφοπριστίνη) (Linden *et al*, 2002, Hill *et al*, 1997). Η αντλία εκροής κωδικοποιείται από το χρωμοσωματικό γονίδιο *lsa* (“lincosamide and streptogramin A” αντοχή), το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία ευθύνεται για την ταυτόχρονη αποβολή λινκοσαμίδης και στρεπτογραμίνης Α. Ο *E. faecalis* είναι ο μόνος από τους εντερόκοκκους που φέρει το *lsa* γονίδιο. Στην παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου που

υπάρχει σε όλα τα στελέχη *E. faecalis* (species specific gene) οφείλεται η ενδογενής αντοχή του *E. faecalis* στις στρεπτογραμίνες (Singh *et al*, 2005).

Σε αντίθεση με τον *E. faecalis* η κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη έχει καλή *in vitro* δραστηριότητα ενάντια στον *E. faecium* (MIC από 0.12-4 µg/ml) και τα περισσότερα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη *E. faecium* είναι ευαίσθητα σε αυτό τον αντιμικροβιακό παράγοντα (Eliopoulos, 2003).

Ένας σημαντικός παράγοντας που συνέβαλε στο να αποκτήσουν οι εντερόκοκκοι αντοχή είναι η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία. Υπάρχει απόδειξη ότι η αυξανόμενη κατανάλωση αντιβιοτικών από τα ζώα έχει συνοδευτεί από παράλληλη αύξηση του αριθμού των ανθεκτικών στελεχών που απομονώνονται. Τα αντιβιοτικά εισάχθηκαν από το 1949 σαν αυξητικοί παράγοντες στις ζωϊκές τροφές. Αυτή η καινούρια χρήση των αντιβιοτικών άσκησε επιλεκτική πίεση και δημιούργησε τεράστια αποθέματα μεταφερόμενης μικροβιακής αντοχής σε αυτά τα οικοσυστήματα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα μέχρι το τέλος της δεκαετία του 60' να έχει παρατηρηθεί μεταφερόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά (π.χ. στην οξυτετρακυκλίνη). Το γεγονός αυτό οδήγησε στο να γίνει σύσταση στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ότι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για θεραπεία στους ανθρώπους δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σαν διατροφικά πρόσθετα στα ζώα. Στις χώρες αυτές, τουλάχιστον, τα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά δεν χρησιμοποιούνταν πλέον σαν αυξητικοί παράγοντες και στη δεκαετία του 70' η πλειοψηφία των ουσιών που χρησιμοποιούνταν στην κτηνοτροφία (avoparcin, virginiamycin, tylosin κ.λ.π.) είχε ένα περιορισμένο εύρος δραστηριότητας στους Gram+ μικροοργανισμούς.

Επιδημιολογικές μελέτες στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη έχουν αναγνωρίσει διαφορετικές πιέσεις επιλογής για τον πολλαπλασιασμό των VRE, αλλά

παρόμοια και γρήγορη εξάπλωση των ανθεκτικών πληθυσμών. Μιας και η αβοπαρσίνη δεν έχει χρησιμοποιηθεί σαν αυξητικός παράγοντας στις Ηνωμένες Πολιτείες, η διασπορά των VRE οφειλόταν πιθανώς στην υπερβολική χρησιμοποίηση της βανκομυκίνης στους ανθρώπους. Από την άλλη μεριά, η διασπορά των VRE στην Ευρώπη μπορεί εν μέρει να αντικατοπτρίζει τη χρήση της αβοπαρσίνης σαν παράγοντα αύξησης για τα ζώα (**Shepard & Gilmore, 2002**). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο αποικισμός με VRE είναι ενδημικός σε πολλά νοσοκομεία και όλο και πιο συχνά οδηγεί σε σοβαρές λοιμώξεις, αλλά αποικισμός δεν υπάρχει στα υγιή άτομα. Στην Ευρώπη, ακόμη συμβαίνουν σποραδικές επιδημίες, συνήθως με λίγες σοβαρές λοιμώξεις, αλλά ο αποικισμός μοιάζει να είναι ενδημικός σε υγιείς ανθρώπους και στα ζώα από φάρμες (**Bonten et al, 2002**). Οι VRE στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι ανθεκτικοί σε πολλά αντιβιοτικά, και πιστεύεται ότι έχουν κυρίως διαδοθεί διαμέσου διασταυρούμενης μόλυνσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον, ενώ φαίνεται να υπάρχει μικρότερη γενετική διακύμανση μεταξύ αυτών των στελεχών (**Low et al, 2001**). Από την άλλη μεριά οι VRE από ανθρώπους στην Ευρώπη είναι συνήθως ευαίσθητοι σε πολλά αντιβιοτικά και πολυκλωνικοί, αν και έχουν αναφερθεί σποραδικές επιδημίες κάποιων κλώνων (**Hayden, 2000, Pournaras et al, 2004**).

Έχει προταθεί ότι όταν οι VRE δεν ρυθμίζονται αμέσως μετά την εισαγωγή σε ένα νοσοκομείο, σποραδικές περιπτώσεις μπορεί να εξελιχθούν σε μία μονοκλωνική επιδημία που μπορεί μετά να εξελιχθεί σε πολυκλωνική ενδημία. Πρόσφατες μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βελτιώσει την κατανόηση του φαινομένου αυτού (**Hayden, 2000**). Εξάλλου, δεν υπάρχει ιδιαίτερη αμφιβολία ότι η ήδη αναπτυγμένη αντοχή σε αυτό το οικοσύστημα είναι αποτέλεσμα της επιλεκτικής πίεσης που ασκείται από τα αντιβιοτικά. Ωστόσο, το μεγάλο ερώτημα που προκύπτει είναι πως τα πολυανθεκτικά εντεροκοκκικά στελέχη των ζωϊκών τροφών μεταφέρθηκαν στους ανθρώπους και πως

αυτά προσαρμόστηκαν στο νέο περιβάλλον και άρχισαν να προκαλούν, μερικές φορές απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις.

1.4.1. Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ANTIBIOTIKA

Η **ενδογενής αντοχή** των εντεροκόκκων σε κάποιες ομάδες β-λακταμικών αντιβιοτικών οφείλεται στην ύπαρξη πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBP₅) (και πιο συγκεκριμένα της PBP₅) που έχουν χαμηλή συγγένεια προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η αντοχή είναι ανεξάρτητη της χρήσης των αντιβιοτικών. Οι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες είναι ανενεργείς, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης των εν λόγω αντιβιοτικών με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες και την αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος.

Η **επίκτητη αντοχή** των εντεροκόκκων οφείλεται κυρίως στην τροποποιημένη συγγένεια της PBP₅ και σπάνια στην παρουσία β-λακταμάσης. Ο έλεγχος ευαισθησίας πρέπει να περιλαμβάνει την αμπικιλίνη και κατά δεύτερο την πενικιλίνη. Υπάρχουν στελέχη που εμφανίζουν αντοχή στην πενικιλίνη και ευαισθησία στην αμπικιλίνη, και για το λόγο αυτό αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ένα εκ των δύο αντιβιοτικών πρέπει να προτιμάται η αμπικιλίνη. Ευαισθησία στην αμπικιλίνη σημαίνει ευαισθησία σε αμοξυκιλίνη, αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό, αμπικιλίνη-σουλβακτάμη, πιπερακιλίνη, πιπερακιλίνη-ταζομπακτάμη. Στελέχη με αντοχή στην αμπικιλίνη λόγω τροποποιημένης συγγένειας της PBP₅ είναι ανθεκτικά και στο συνδυασμό αμπικιλίνης-κλαβουλανικού, ενώ αντιθέτως στελέχη με μηχανισμό αντοχής στην αμπικιλίνη λόγω παραγωγής β-λακταμάσης, εμφανίζουν

ευαισθησία στο συνδυασμό αμπικιλίνης-κλαβουλανικού. Στην Ελλάδα στελέχη ανθεκτικά στην αμπικιλίνη ανήκουν κυρίως στο είδος *E. faecium*.

Ο έλεγχος για παραγωγή β-λακταμάσης είναι απαραίτητος ιδιαίτερα για στελέχη που απομονώνονται από αίμα ή ENY. Αυτό γίνεται με τη μέθοδο της χρωμογόνου κεφαλοσπορίνης νιτροσεφίνης και είναι απαραίτητος γιατί η παρουσία β-λακταμάσης επηρεάζει ελάχιστα τη ζώνη αναστολής γύρω από την αμπικιλίνη ή την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται τα στελέχη ψευδώς ως ευαίσθητα παρά την παρουσία ενζύμου. Η δράση των β-λακταμασών αναστέλλεται από τους αναστολείς (Murray, 1992, Πετεινάκη, 2007).

Το να διευκρινίσουμε ποιος είναι ακριβώς ο μηχανισμός αντοχής είναι σημαντικό για τη σωστή ερμηνεία του αντιβιογράμματος. Διότι όπως ήδη προαναφέρθηκε αντοχή στην αμπικιλίνη οφειλόμενη σε τροποποιημένη PBP5 σημαίνει αντοχή και στο συνδυασμό β-λακταμικών-αναστολέων, ενώ αντοχή που οφείλεται σε παραγωγή β-λακταμασών σημαίνει ότι είναι δυνατή η θεραπευτική αντιμετώπιση με το συνδυασμό β-λακταμικών-αναστολέων.

1.4.2. ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Οι αμινογλυκοσίδες είναι μικροβιοκτόνα αντιβιοτικά που συνδέονται στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Η **ενδογενής αντοχή** των εντερόκοκκων στις αμινογλυκοσίδες είναι χαμηλού επιπέδου και οφείλεται κυρίως:

- 1) στη μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος στα αντιβιοτικά αυτής της ομάδας. Η συγχορήγηση αμινογλυκοσίδης με αντιβιοτικό που καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα όπως π.χ. β-λακταμικό ή γλυκοπεπτίδιο, βοηθά την αμινογλυκοσίδα να εισέλθει ενδοκυττάρια.

- 2) Το είδος *E. faecium* παράγει φυσικά μία ακετυλοτρανσφεράση χρωμοσωμική [AAC(6')] η οποία αδρανοποιεί τις καναμυκίνη, τομπραμυκίνη, νετιλμυκίνη και λιγότερο την αμικασίνη.

Η **επίκτητη αντοχή** μπορεί να οφείλεται ή σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλοίωση του ριβοσωμικού στόχου δράσης με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης της αμινογλυκοσίδης στο στόχο δράσης αλλά σε κυρίως σε παραγωγή τροποποιητικών ενζύμων, που αποτελεί και τον κύριο μηχανισμό αντοχής. Η παραγωγή των εν λόγω ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα εμφάνιση υψηλού επιπέδου αντοχής στις αμινογλυκοσίδες. Τα τροποποιητικά ένζυμα κατατάσσονται ανάλογα με την αντίδραση που καταλύουν σε 3 τάξεις, τις ακετυλοτρανσφεράσες (AAC), φωσφοτρανσφεράσες (APH) και νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες (ANT). Το πιο συχνό ένζυμο για υψηλού επιπέδου αντοχή στη γενταμυκίνη είναι το διπλής δραστηριότητας ένζυμο 6-ακετυλοτρανσφεράση + 2-φωσφοτρανσφεράση [AAC (6') + APH (2'')] (**Ferretti et al, 1986**). Εκτός της γενταμυκίνης το ένζυμο αυτό τροποποιεί όλες τις άλλες αμινογλυκοσίδες που διατίθενται στην Ευρώπη, εκτός της στρεπτομυκίνης (δηλ. Νετιλμυκίνη, καναμυκίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, σισομυκίνη). Δεύτερο πιο συχνό ένζυμο που προκαλεί υψηλού επιπέδου αντοχή στη στρεπτομυκίνη είναι το ένζυμο 6-αδενυλτρανσφεράση [ANT (6') Ia]. Λόγω της συχνότερης παρουσίας των δύο αυτών ενζύμων, ο έλεγχος των εντεροκόκκων για ευαισθησία σε αμινογλυκοσίδες περιλαμβάνει αποκλειστικά τη γενταμυκίνη και τη στρεπτομυκίνη (**Ferretti et al, 1986**).

Στον έλεγχο ευαισθησίας των εντεροκόκκων σε αμινογλυκοσίδες χρησιμοποιούνται ειδικοί δίσκοι με συγκεκριμένη-υψηλή περιεκτικότητα σε γενταμυκίνη (120μg/disk) και στρεπτομυκίνη (300μg/disk). Αν με τη δοκιμασία αυτή το στέλεχος είναι ευαίσθητο μπορεί να συν-χορηγηθεί με αντιβιοτικό που δρα στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ επί αντοχής δε χορηγείται (**Chow, 2000**).

Σε σοβαρές εντεροκοκκικές λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, βακτηραιμίες) η μονοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική, και έτσι χορηγείται ο συνεργικός συνδυασμός αμινογλυκοσίδης και β-λακταμικού.

1.4.4. ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ (MLS_B)

Οι εντερόκοκκοι (με εξαίρεση τον *E. faecium* και *E. durans*) εμφανίζουν ενδογενή αντοχή στις λινκοσαμίδες και την στρεπτογραμίνη Α, λόγω παρουσίας μίας αντλίας LSA η οποία “πετά” το αντιβιοτικό έξω από το μικροβιακό κύτταρο. Ως εκ τούτου τα στελέχη αυτά δεν είναι ευαίσθητα και στο συνδυασμό νταλφοπριστίνης/κινόπριστίνης (Synecid). Ο *E. faecium* ο οποίος δε φέρει την εν λόγω αντλία, και δυνητικά είναι ευαίσθητος στο συνδυασμό, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία ή ακόμη και αντοχή στο Synecid. Ο κυριότερος μηχανισμός είναι η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από ένζυμα, τα οποία κωδικοποιούνται από τα *satA* και *satG* γονίδια (Soltani *et al*, 2000).

Όσον αφορά το μηχανισμό αντοχής των εντεροκόκκων στις μακρολίδες, αυτός σχετίζεται με την παρουσία του *ermB* γονιδίου, το οποίο τροποποιεί το στόχο δράσης (υποομάδα 50S του ριβοσώματος) μέσω παραγωγής μίας μεθυλάσης. Ο μηχανισμός αυτός ενοχοποιείται για διασταυρούμενη αντοχή και σε λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνη Β (Weisblum *et al*, 1995).

1.4.5. ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ (ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ)

Η λινεζολίδη είναι ο πρώτος παράγοντας που έχει εγκριθεί για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus* σε >40 χρόνια και ο δεύτερος (πρώτος από του στόματος) που έχει εγκριθεί για τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από τους VRE (Meka & Gold, 2004). Η λινεζολίδη έχει ένα ολοκληρωμένο φάσμα δράσης ενάντια των κύριων νοσοκομειακών Gram-θετικών

παθογόνων, όπως οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι, οι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκοι, οι ανθεκτικοί στις μακρολίδες στρεπτόκοκκοι και οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (**Livermore, 2003**).

Τα κριτήρια ευαισθησίας (breakpoint) για τον *Enterococcus* spp. είναι: 2 µg/ml ή λιγότερο ευαισθησία, 4 µg/ml ενδιάμεση ευαισθησία, και 8 µg/ml ή μεγαλύτερο υποδηλώνει αντοχή (**Moellering, 2003**).

Πολυάριθμες δημοσιευμένες μελέτες που έλεγξαν ένα μεγάλο αριθμό εντεροκοκκικών στελεχών έχουν δείξει εξαιρετική δράση της λινεζολίδης εναντίον τόσο του *E. faecalis* όσο και του *E. faecium*, με MICs μεταξύ 0.12-4 µg / ml. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από πολυκεντρικές μελέτες στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (**Henwood et al, 2000**). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτή η καλή *in vitro* δράση της λινεζολίδης διατηρείται μέχρι σήμερα, παρά την αυξανόμενη χρήση του φαρμάκου αυτού στην κλινική πράξη (**Simonsen et al, 2004**).

Η λινεζολίδα δρά αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Σήμερα με την αυξημένη χρήση του αντιβιοτικού στην κλινική πράξη έχουμε στελέχη ανθεκτικά στη λινεζολίδα (**Bersos et al, 2004**). Ο μηχανισμός αντοχής βασίζεται στην τροποποίηση του στόχου δράσης μέσω μίας σημειακής μετάλλαξης G2576T στην περιοχή V του 23S RNA γονιδίου. Το επίπεδο αντοχής στο αντιβιοτικό σχετίζεται άμεσα τόσο με τον αριθμό των μεταλλάξεων του στελέχους όσο και με το χρόνο θεραπείας με το αντιβιοτικό. Τονίζεται ότι στελέχη με οριακή αντοχή στο αντιβιοτικό (MIC: 4 mg/L) που απομονώνονται από ασθενείς υπό θεραπεία με λινεζολίδα θα πρέπει να αποστέλλονται σε ειδικό κέντρο και να ελέγχονται για τυχόν παρουσία μετάλλαξης.

I.4.6. ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ (BANKOMYKINH)

Τα γλυκοπεπτίδια δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω σύνδεσης τους στο διπεπτίδιο D-alanyl-D-alanine, το οποίο και αποτελεί υπόστρωμα των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της σύνδεσης γλυκοπεπτιδίου-διπεπτιδίου είναι η αδυναμία δημιουργίας της χιαστής σύνδεσης με τελικό αποτέλεσμα το κυτταρικό τοίχωμα να παραμένει ημιτελές και να προκαλείται η καταστροφή του βακτηριακού κυττάρου. Η αντοχή των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπτίδια συνδέεται με αλλαγή του διπεπτιδίου D-ala-D-ala ή σε D-alanyl-D-lactate (VanA, VanB, VanD φαινότυποι) ή σε D-alanyl-D-serine (VanC, VanE, VanG φαινότυποι) (**Centinkaya et al, 2000**).

I.5. ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΙ ΣΤΗ BANKOMYKINH (VRE)

I.5.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ VRE

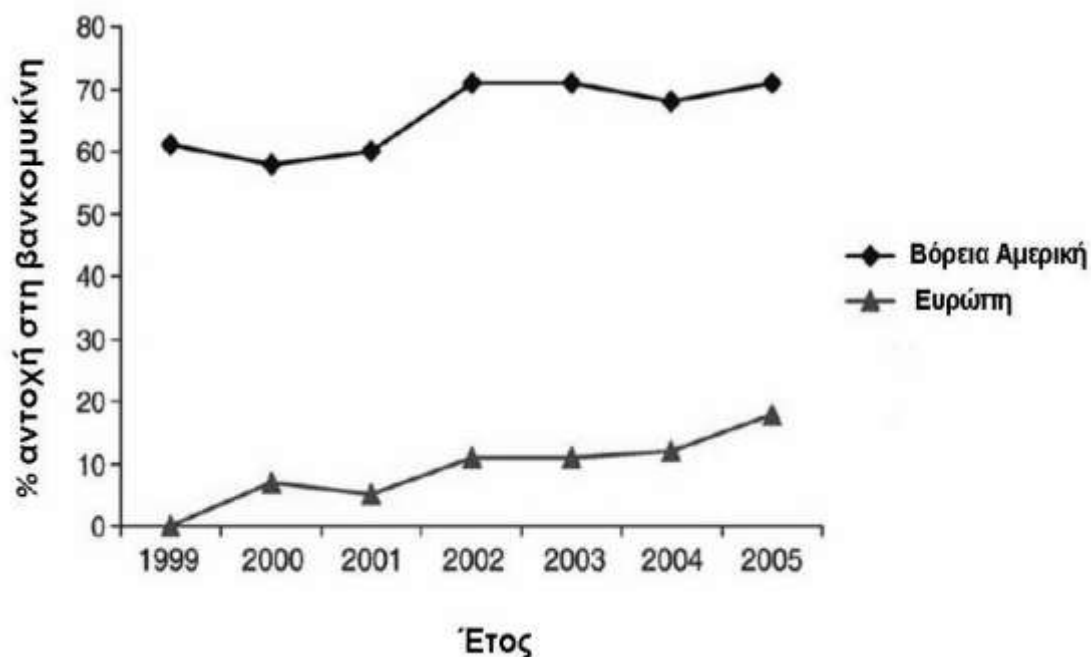
Το 1986 τα πρώτα κλινικά στελέχη ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων απομονώθηκαν στην Αγγλία και στην Γαλλία (**Leclercq et al, 1988**) και ένα χρόνο μετά στις ΗΠΑ (**Uttley et al, 1988**). Από τότε η συχνότητα των VRE αυξάνεται σε όλο τον κόσμο με μεγάλες διαφορές μεταξύ των διάφορων χωρών. Οι VRE είναι ευρέως διαδεδομένοι στα νοσοκομεία στις ΗΠΑ. Η επίπτωση των λοιμώξεων από VRE στο αίμα ανέβηκε από 0.4% το 1989 σε 25.2% το 1999, με μια ταυτόχρονη αύξηση των VRE ανάμεσα στα στελέχη *E. faecium* (60% στους *E. faecium* έναντι 2% στους *E. faecalis*) (**National Nosocomial Infections Surveillance, 1992**). Η γρήγορη εξάπλωση των VRE στις ΗΠΑ αποδόθηκε στη μεγάλη κλινική χρήση της βανκομυκίνης είτε παρεντερικά είτε από το στόμα.

Στην Ευρώπη, η επικράτηση των στελεχών είναι ευρεία μεταξύ των χωρών και φαίνεται να είναι υψηλή στην Ιταλία και την Μ. Βρετανία (**Menichetti, 2005**). Στελέχη VRE έχουν βρεθεί από διάφορες πηγές ζώων σε διαφορετικές χώρες της Ευρώπης (**Klare et al, 1995**). Αυτό φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της χρήσης του γλυκοπεπτιδίου ανοραrcin ως αυξητικού παράγοντα στην εκτροφή ζώων (**Wegener et al, 1999**) με επακόλουθο τον αποικισμό των ζώων με στελέχη ανθεκτικά σε γλυκοπεπτίδια και, ακολούθως, τη μεταφορά τους στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αυτή η σύνδεση επιπλέον υποστηρίζεται από την παρουσία *vanA* γονιδίων σε στελέχη VRE από ανθρώπινες και ζωϊκές πηγές και από τη μείωση στον αποικισμό VRE στην Ευρώπη μετά από απαγόρευση του ανοραrcin (**Simonsen et al, 1998**). Η αντοχή των εντερόκοκκων σε άλλα αντιμικροβιακά κλινικού ενδιαφέροντος είναι ένα βασικό πρόβλημα ιδιαίτερα με την συνεχώς αυξανόμενη αντοχή του *E. faecium* (**Treitman et al, 2005**).

Δραματική αύξηση των VRE (από 0% στο 25.9%) παρατηρήθηκε τη δεκαετία 1989-1999 στις ΗΠΑ και αυτή η τάση συνεχίζεται (**Chavers et al, 2003**). Σύμφωνα με τη μελέτη LEADER ProGram του 2007 τα ποσοστά αντοχής 705 στελεχών εντεροκόκκου στις ΗΠΑ ήταν 33% στην αμπικιλίνη, 25.2% στη γενταμικίνη (υψηλού βαθμού), 77.3% στην ερυθρομυκίνη, 29.4% στη βανκομυκίνη, 53.6% στη σιπροφλοξασίνη και 1.1% στη λινεζολίδη (**Jones et al, 2008**).

Το SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram μελετά επίσης την επιδημιολογία των λοιμώξεων από εντερόκοκκο, όπως και την αντοχή του στα αντιβιοτικά στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Ο *E. faecalis* ήταν το πιο συχνό στέλεχος εντερόκοκκου που απομονώθηκε (56%-76%) και στη συνέχεια, ο *E. faecium* (5-19%). Όταν αναλύθηκαν μόνο τα VRE στελέχη ο *E. faecium* αποτελούσε το 93% των VRE στελεχών στη Βόρεια Αμερική και το 74.1% στην Ευρώπη. Επίσης, από την ίδια ερευνητική ομάδα, καταγράφηκε από το 1999 έως το 2005 αύξηση της συχνότητας των

VR στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος τόσο στη Βόρεια Αμερική όσο και στην Ευρώπη (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ποσοστό % αντοχής στη βανκομυκίνη στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. SENTRY, 1999-2005 (Deshpande *et al*, 2007).

Το 2009 από τον Jones και τους συν. (Jones *et al*, 2009) δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μελέτης της αντοχής Gram-θετικών παθογόνων που συλλέχθηκαν από την Λατινική Αμερική, την Ευρώπη, τον Καναδά και τις χώρες της Ασίας-Ειρηνικού Ωκεανού (ZAAPs Surveillance ProGram για το 2004-2008). Η αντοχή σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες των 864 στελεχών εντεροκόκκου που συλλέχθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ποσοστό (%) αντοχής σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες στελεχών εντερόκοκκου. ZAAPS Surveillance ProGram, 2004-2008 (Jones *et al*, 2009).

	MIC (µg/ml)		Ποσοστό αντοχής %
	50%	90%	
Όλοι οι Εντερόκοκκοι (n=864)			
Αμπικιλλίνη	2	>16	36.2
Γενταμικίνη	≤500	>1000	49.0
Πενικιλλίνη	4	32	40.3
Ερυθρομυκίνη	2	2	76.0
Λινεζολίδη	2	2	0.6
Σιπροφλοξασίνη	>4	>4	56.5
Βανκομυκίνη	1	4	8.9
Ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη (n=86)			
Λινεζολίδη	1	2	2.3
Ευαίσθητοι στη βανκομυκίνη (n=778)			
Λινεζολίδη	2	2	0.4

Από το EARS-Net 2010 σε σύνολο 5.577 στελεχών *E. faecium* υπήρχε συνολικά αντοχή 7.4% στην βανκομυκίνη (**Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2010**). Οι περισσότερες χώρες είχαν ποσοστό αντοχής <10% (8 είχαν <1%), 5 χώρες από 10 μέχρι 25% και μόνο μία χώρα, η Ιρλανδία είχε αντοχή >25%. Όσο αφορά την υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες του *E. faecalis* υπήρχε συνολικά 34.5% αντοχή σε 7533 στελέχη. Στις περισσότερες χώρες η αντοχή κυμάνθηκε το 2010 από 20 έως 50%. Το Βέλγιο, η Ισλανδία, η Σουηδία και η Γαλλία είχαν αντοχή <20% και μόνο η Ουγγαρία είχε αντοχή >50%.

Το 2001 περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το πρώτο στέλεχος VRE (**Routsis et al, 2001**). Από στοιχεία του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας της Ελλάδας (www.mednet.gr/whonet, **2012**) το τελευταίο εξάμηνο του 2010 η αντοχή των εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος σε ασθενείς ήταν υψηλή. Ήταν δε ακόμη μεγαλύτερη όταν αυτοί νοσηλεύονταν σε Χειρουργικές Κλινικές ή ΜΕΘ (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αντοχή στελεχών *Enterococcus* spp. που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος σε ασθενείς στην Ελλάδα το 2^ο εξάμηνο του 2010 (www.mednet.gr/whonet, **2012**).

Αντιμικροβιακός παράγοντας	Παθολογικές Κλινικές % αντοχή	Χειρουργικές Κλινικές % αντοχή	ΜΕΘ % αντοχή
Πενικιλίνη G	37.1	43.5	29.1
Αμπικιλίνη	37.9	41.6	34.1
Υψηλή αντοχή στη γενταμικίνη	41.6	47.4	49.2
Υψηλή αντοχή στη στρεπτομυκίνη	50.8	64.8	56.2
Βανκομυκίνη	10.2	11.4	13.5
Τεϊκοπλανίνη	11.7	10.1	17.4
Λινεζολίδη	0.4	2.7	0.6

Σε μία συγκριτική μελέτη του NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance System) των παθογόνων από το 1994 έως και το Μάιο του 1999 παρατηρήθηκε μια αύξηση κατά 47% των VRE (**Hospital Infections Program, 1999**). Στην περίπτωση του *E. faecium* υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ της αντοχής στην αμπικιλίνη και στη βανκομυκίνη. Στελέχη *E. faecium* που είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη ανιχνεύονται πολύ συχνά πριν ανιχνευθεί αντοχή στη βανκομυκίνη. Η ύπαρξη γενετικής σύνδεσης στον

E. faecium μεταξύ αντοχής στην αμπικιλίνη, PBP- 5 και αντοχής στη βανκομυκίνη σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα κλινικών μελετών δείχνουν ότι η χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων όπως οι κεφαλοσπορίνες συμβάλλει στην εμφάνιση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη *E. faecium* (Elston & Barlow, 2009). Η σύνδεση αυτή μεταξύ μίας ανθεκτικής στα β-λακταμικά πενικιλλοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP και της αντοχής στη βανκομυκίνη δε φαίνεται να παρουσιάζεται στον *E. faecalis*, γεγονός που μπορεί να ευθύνεται για την σποραδική ανίχνευση της αντοχής στη βανκομυκίνη στον *E. faecalis*.

1.5.2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ VRE

Φαινοτυπική κατάταξη

Υπάρχουν 6 αναγνωρισμένοι φαινότυποι αντοχής στη βανκομυκίνη: οι VanA, VanB, VanC, VanD, VanE και VanG (Arthur *et al*, 1993, Fines *et al*, 1999, Perichon *et al*, 1997). Οι πέντε είναι επίκτητοι (VanA, VanB, VanD, VanE και VanG) ενώ ο έκτος, ο VanC, είναι ενδογενής, μη μεταβιβάσιμος και ειδικός των ειδών *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/ E. flavescens*. Οι φαινότυποι VanA και VanB περιγράφηκαν αρχικά στον *E. faecalis* και στον *E. faecium*. Τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στη βανκομυκίνη με φαινότυπο VanA εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στη βανκομυκίνη (MICs > 64 µg/ml) και στην τεϊκοπλανίνη (MICs >16 µg/ml) (Arthur *et al*, 1993). Η αντοχή αυτή οφείλεται σε ένα γονίδιο που ονομάζεται *vanA* και βρίσκεται στο μεταθετό στοιχείο Tn1546.

Τα στελέχη με φαινότυπο VanB έχουν αντοχή σε πιο μέτρια επίπεδα βανκομυκίνης (MICs 32 με 64 µg/ml) αλλά είναι ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη. Είναι πλέον γνωστό ότι τα επίπεδα αντοχής στη βανκομυκίνη στα στελέχη με φαινότυπο VanB μπορεί να κυμαίνονται από 4 έως και ≥ 1000 µg/ml ενώ παράλληλα διατηρείται η ευαισθησία στη

τεϊκοπλανίνη. Οι καθοριστικοί παράγοντες για το φαινότυπο VanB επίσης βρίσκονται σε μεγάλα κινητά τμήματα που μπορούν να μεταφερθούν από ένα στέλεχος εντεροκόκκου σε ένα άλλο (Quintiliani *et al*, 1993, 1994). Ο φαινότυπος αντοχής VanC περιγράφηκε στους *E. gallinarum* (VanC₁), *E. casseliflavus* (VanC₂), *E. flavescens* (VanC₃) και χαρακτηρίζεται από ενδογενή χαμηλού επιπέδου αντοχή στη βανκομυκίνη (MICs από 2 έως 32 µg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη (Dutka-Malen *et al*, 1994). Οι φαινότυποι VanD, VanE και VanG εμφανίζονται με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη βανκομυκίνη (MICs 12-64 µg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη (MICs 1-4 µg/ml).

Πίνακας 5: Φαινότυποι αντοχής στα γλυκοπεπτίδια στους εντερόκοκκους (Werner *et al*, 2008).

Φαινότυπος	VanA	VanB	VanC	VanD
Τύπος της αντοχής	Επίκτητη	Επίκτητη	Ενδογενής	Επίκτητη
MIC Βανκομυκίνης	≥ 64 mg/L	≥8 mg/L	8-32 mg/L	64-128 mg/L
MIC Τεϊκοπλανίνης	≥ 8 mg/L	≤ 4 mg/L	≤ 4 mg/L	4-64 mg/L
Έκφραση	Επαγωγή	Επαγωγή	Ιδιοσυστασιακή	Ιδιοσυστασιακή
Εντόπισμός των γονιδίων αντοχής	Πλασμίδια ή χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα πλασμίδια	Χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα
Μεταφερόμενα πλασμίδια	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
Τρανσποζόνια	Ναι (Tn1546)	Ναι (Tn1547)	Όχι	?
Τερματικά κατάλοιπα πεπτιδογλυκάνης	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser	D-ala-D-lac

Γονοτυπική κατάταξη

vanA-αντοχή στα γλυκοπεπτίδια: Το γονίδιο *vanA* και άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση και στην έκφραση της αντοχής στη βανκομυκίνη (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX* και *vanZ*) εντοπίζονται σε ένα τρανσποζόνιο 10,581-bp (Tn1546) του *E. faecium* το οποίο

συχνά βρίσκεται σε πλασμίδιο (**Arthur et al, 1993**). Η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση ανώμαλων πρόδρομων μορφών πεπτιδογλυκάνης που καταλήγουν σε D-Ala-D-lactate αντί του D-Ala-D-Ala. Η βανκομυκίνη δεσμεύεται στο D-Ala-D-Lac με αξιοσημείωτα χαμηλότερη συγγένεια από ότι στο κανονικό διπεπτιδικό προϊόν (**Bugg et al, 1991**).

vanB-αντοχή στα γλυκοπεπτίδια: Η *vanB* γλυκοπεπτιδική αντοχή ρυθμίζεται στους εντεροκόκκους από τη VanB-λιγάση που συγγενεύει δομικά με τη VanA-λιγάση. Συγκεκριμένα, ευνοείται η παραγωγή ενός πενταπεπτιδίου που καταλήγει σε D-Ala-D-Lac (**Evers et al, 1993**). Τα γονίδια είναι αντίστοιχα με αυτά της *vanA* αντοχής και χαρακτηρίζονται σαν *vanHB*, *vanXB*, *vanYB*, *vanRB*, και *vanSB* (**Baptista et al, 1996**). Ωστόσο δεν υπάρχει ανάλογο γονίδιο του *vanZ* σε αυτούς τους εντερόκοκκους. Το ρυθμιστικό σύστημα στα στελέχη της τάξεως αυτής φαίνεται ότι είναι μη ευαίσθητο στην επαγωγή από την τεϊκοπλανίνη (**Clewell, 1990**). Η τεϊκοπλανίνη επάγει την σύνθεση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το τύπο αντοχής VanA αλλά δεν επάγει τη σύνθεση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το τύπο VanB. Από την άλλη μεριά η βανκομυκίνη επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών αντοχής και των δύο συστημάτων και στην πραγματικότητα εάν ένας εντερόκοκκος που είναι ευαίσθητος στη βανκομυκίνη και έχει το γονίδιο *vanB*, έχει προηγουμένως εκτεθεί στη βανκομυκίνη, το στέλεχος στη συνέχεια γίνεται ανθεκτικό και στην τεϊκοπλανίνη (**Evers et al, 1996**).

I.5.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ VRE

Οι λοιμώξεις από ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντεροκόκκους αναπτύσσονται σε ασθενείς που έχουν ήδη αποικισθεί με VRE (**Zirakzadeh et al, 2006**). Οι τύποι των λοιμώξεων είναι παρόμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται στους τυπικούς εντερόκοκκους και περιλαμβάνουν τις ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, τις λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών

μορίων, τις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, τις λοιμώξεις του αίματος και την ενδοκαρδίτιδα. Το 3% των ασθενών με βακτηριαιμία από VRE αναφέρεται ότι αναπτύσσουν ενδοκαρδίτιδα (**Vergis et al, 2001**). Οι λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και οι αναπνευστικές λοιμώξεις από VRE δεν είναι συχνές.

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε VRE είναι πιο δαδεδομένες σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (**Zirakzadeh et al, 2006**). Οι ασθενείς με τον υψηλότερο κίνδυνο είναι αυτοί με κακοήθεις αιματολογικούς όγκους και ιδιαίτερα όσοι αντιμετωπίζονται με μεταμόσχευση μυελού των οστών. Οι ασθενείς με συμπαγή αλλομοσχεύματα επίσης αντιπροσωπεύουν μία ομάδα υψηλότερου κινδύνου για λοιμώξεις από VRE. Οι ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος μπορούν να αναπτύξουν λοιμώξεις από VRE που σχετίζονται με τα χοληφόρα πιθανώς εξαιτίας της ενδογενούς ικανότητας των εντερόκοκκων να επιβιώνουν σε περιβάλλον όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων.

1.5.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ VRE

Παλαιότερες μελετές στις Ηνωμένες Πολιτείες αποκάλυψαν ότι οι περισσότεροι ασθενείς με ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους βρισκόταν σε μονάδες εντατικής θεραπείας (**Karanfil et al, 1992**). Ωστόσο, οι VRE παρατηρούνται πλέον με αυξημένη συχνότητα ανάμεσα σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, με καρκίνο, σε μεταμοσχευμένους, και σε ασθενείς με παρατεταμένη νοσοκομειακή περίθαλψη. Τείνουν να εμφανίζονται στους πιο καταβεβλημένους, βαριά ασθενείς που έχουν εισαχθεί στο νοσοκομείο (**Karanfil et al, 1992, Garbutt et al, 1999, Livornese et al, 1992**).

Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται η μεγάλη διάρκεια της νοσοκομειακής περίθαλψης, η μεγάλη διάρκεια παραμονής σε μονάδες εντατικής θεραπείας, ο αποικισμός του γαστρεντερικού με VRE (μπορεί να προηγείται της λοίμωξης

σε πολλούς ασθενείς χωρίς ωστόσο όλοι οι αποικισμένοι ασθενείς να υφίστανται κάποια λοίμωξη), η προηγούμενη αντιμικροβιακή θεραπεία (ιδιαίτερα με πολλαπλά αντιβιοτικά), η βαρύτητα της ασθένειας, η έκθεση σε μολυσμένο ιατρικό εξοπλισμό, η εγγύτητα σε γνωστό ασθενή με VRE, η έκθεση σε νοσοκόμα που έχει ανατεθεί στην ίδια βάρδια με κάποιο γνωστό ασθενή με VRE, οι αιματολογικές κακοήθειες, η μεταμόσχευση μυελού των οστών, η ενδοφλέβια ή από του στόματος χορήγηση βανκομυκίνης και η λήψη κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς και φαρμάκων με δράση έναντι των αναερόβιων (**Karanfil et al, 1992, Tornieporth et al, 1996**). Η βανκομυκίνη προδιαθέτει τους ασθενείς σε αποικισμό και λοίμωξη από VRE αναστέλλοντας την ανάπτυξη των φυσιολογικών Gram+ βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας και εξασφαλίζοντας έτσι επιλεκτικό πλεονέκτημα για τους VRE που μπορεί να είναι παρόντες σε μικρούς αριθμούς στο έντερο των ατόμων αυτών. Η από του στόματος χρήση βανκομυκίνης μπορεί επίσης να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον αποικισμό από VRE (**Boyce et al, 1995**) και αυτό οδήγησε σε συστάσεις αποφυγής της χρήσης του παράγοντα αυτού για την πρωτογενή θεραπεία των διάρροιας σχετιζόμενων με αντιβιοτικά (**Centers for Disease Control and Prevention, 1995**).

Η ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε κεφαλοσπορίνες και των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη λοιμώξεων οφείλεται στην αποκλειστικά νοσοκομειακή φύση των λοιμώξεων αυτών. Η μοξαλακτάμη, μία κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς που χρησιμοποιήθηκε στη δεκαετία του 80' με εξειδικευμένη δράση έναντι των αναερόβιων αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον αποικισμό και την απόκτηση των VRE. Το ίδιο ισχύει για την μετρονιδαζόλη και την κλινδαμυκίνη (**Centinkaya et al, 2000**).

Η εμφάνιση των VRE έχει αφυπνίσει την παγκόσμια κοινότητα μολυσματικών ασθενειών για διάφορους λόγους. Εξαιτίας των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών που υπάρχουν για τη θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από τους εντερόκοκκους, οι λοιμώξεις αυτές αποτελούν μεγάλη κλινική πρόκληση για τους

γιατρούς. Τα περιορισμένα αποτελέσματα τη τελευταία δεκαετία από την πρόληψη και τις στρατηγικές για τον έλεγχο της αντοχής στη βανκομυκίνη (αλλά και στην αντοχή στη μεθικιλίνη στον *Staphylococcus* spp.) υπογραμμίζουν τη δυσκολία επίλυσης του προβλήματος.

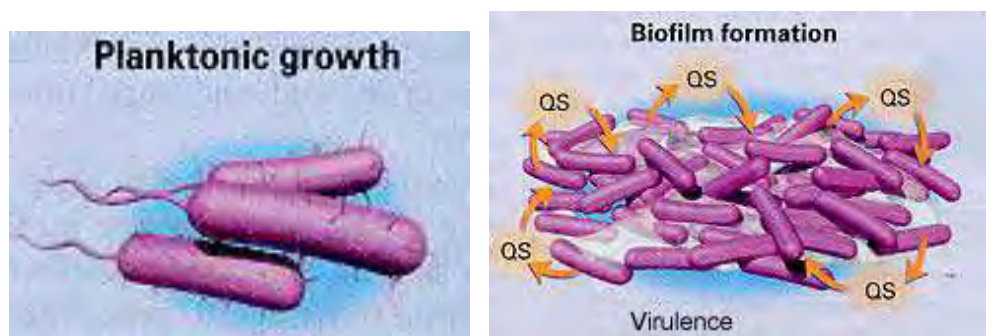
II. BIOMEMBRANES ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

II.1. ΟΡΙΣΜΟΣ BIOMEMBRANΗΣ

Πάνω από ένα αιώνα η Μικροβιολογία μελετά τις ιδιότητες και συμπεριφορές των μικροβίων που αναπτύσσονται ελεύθερα σε υγρά θρεπτικά υλικά. Οι μελέτες αυτές, αν και παρέχουν εξαιρετικές πληροφορίες, δεν εξετάζουν τις ιδιότητες και συμπεριφορές των μικροβίων που συγκροτούν οργανωμένες κοινότητες σε στερεές ή ρευστές επιφάνειες, τις ονομαζόμενες βιομεμβράνες (biofilms). Επιπρόσθετα, περιβαλλοντικές παρατηρήσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πλειονότητα των μικροβίων επιβιώνει στη φύση με την μορφή των ανωτέρω οικοσυστημάτων στις διάφορες επιφάνειες, και όχι ως ελεύθερα κινούμενοι μικροοργανισμοί (**Costerton *et al*, 1995**).

Τα βακτηριακά κύτταρα επιβιώνουν στη φύση σε δύο καταστάσεις, την ελεύθερη (planktonic) και την ακίνητη (sessile) (Εικόνα 3). Πιστεύεται ότι η ελεύθερη κατάσταση είναι σημαντική για τον ταχύ πολλαπλασιασμό και τη διασπορά των βακτηρίων σε νέους χώρους, ενώ η ακίνητη ή βραδέως αναπτυσσόμενη σχετίζεται με τη διατήρηση και επιβίωσή τους. Έχει αποδειχθεί ότι τα ακίνητα και προσκολλημένα σε διάφορες επιφάνειες μικροβιακά κύτταρα, συγκροτούν οργανωμένες κοινότητες, γνωστές ως βιομεμβράνες. Οι βιομεμβράνες απαντώνται πρακτικά σε όλα τα οικοσυστήματα, φυσικά ή παθολογικά (**Costerton *et al*, 1987**). Τα δεδομένα στα οποία στηρίζεται αυτή η θεωρία προέρχονται από φυσικά υδρόβια οικοσυστήματα, στα οποία άμεση μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι περισσότερο από το 99.9% των βακτηρίων αναπτύσσονται σε βιομεμβράνες σε μεγάλη

ποικιλία επιφανειών. Αυτή η επικράτηση των βιομεμβρανών είναι καθιερωμένη σε όλα τα φυσικά οικοσυστήματα εκτός από τα βαθιά νερά και τους ωκεανούς, και πλέον αντιλαμβανόμαστε ότι αυτοί οι ακίνητοι (sessile) πληθυσμοί είναι υπεύθυνοι για τις περισσότερες φυσιολογικές διαδικασίες στα οικοσυστήματα αυτά (Costerton *et al*, 1995).



Planktonic cells (Ελευθέρως κινούμενα) Σχηματισμός βιομεμβράνης (biofilm)

Εικόνα 3: Οι δύο φάσεις ανάπτυξης των μικροβίων (α) Ελευθέρως δρώντα (πλανκτονικά) κύτταρα (β) Σχηματισμός βιομεμβράνης (biofilm).

Ως βιομεμβράνη (biofilm) ορίζεται μία κοινότητα μικροβιακών κυττάρων η οποία προσκολλάται σε αδρανείς ή ζώσες επιφάνειες και περικλείεται εντός μίας θεμέλιας εξωπολυμερούς ουσίας, που παράγεται από αυτά (Costerton *et al*, 1999).

Η πρώτη περιγραφή των βιομεμβρανών έγινε από τον Leeuwenhoek τον 16^ο αιώνα ο οποίος μελέτησε ξέσματα από τις επιφάνειες των δοντιών του, που προφανώς έπασχαν από τερηδόνα, και περιέγραψε με το πρωτόγονο μικροσκόπιό του την παρουσία μικροβίων σ' αυτά που τα ονόμασε *animalcules*. Το 1943 δημοσιεύθηκε η πρώτη επιστημονική μελέτη επί βιομεμβρανών από τον Zobell (Zobell, 1943). Ωστόσο, μόλις το 1970 άρχισε η επιστημονική κοινότητα να συζητά για την ύπαρξη μικροβίων υπό μορφή βιομάζας σε πολλά και ποικίλα περιβάλλοντα. Ουσιαστικά, την δεκαετία του 1980 και κυρίως του 1990 άρχισαν να διερευνώνται οι τρόποι επικοινωνίας και οργάνωσης των μικροβιακών κυττάρων εντός των βιομεμβρανών (Lawrence *et al*, 1991).

Οι βιομεμβράνες θεωρούνται περιβάλλοντα όπου νέες ή προηγούμενα άγνωστες, βιολογικές ιδιότητες των μικροβιακών κυττάρων μπορούν να εκφραστούν. Αντιπροσωπεύουν βιολογικά συστήματα υψηλού επιπέδου οργάνωσης, όπου τα βακτήρια σχηματίζουν δομημένες, ενορχηστρωμένες και λειτουργικές κοινότητες. Αναπτύσσονται σε νεκρές ή ζώσες επιφάνειες. Στη φύση απαντώνται στα στάσιμα ή βραδείας ή διακοπτόμενης ροής νερά (ποτάμια, λίμνες, θάλασσες), σε υπόγειους αγωγούς, σε συγκεντρώσεις αποβλήτων. Στους ανθρώπους και τα ζώα, μπορούν να αναπτυχθούν σε όργανα όπως οι πνεύμονες, το έντερο και στα διάφορα εμφυτεύματα.

Στη φύση επικρατούν συχνότερα οι μικτοί μικροβιακοί πληθυσμοί εντός των βιομεμβρανών. Ενώ οι βιομεμβράνες που έχουν κλινικό ενδιαφέρον και ευθύνονται για την πρόκληση λοιμώξεων εμπεριέχουν ένα είδος μικροβίου. Αποδεικνύεται δε, ότι η ικανότητα παραγωγής βιομεμβρανών είναι κοινό χαρακτηριστικό όλων και όχι ορισμένων μόνο μικροβίων. Το δε 99.9% των μικροβίων στη φύση συγκροτούν τέτοιες οργανωμένες κοινότητες.

Ο ρόλος των βιομεμβρανών είναι σημαντικός, τόσο στο έμβιο περιβάλλον, ως πηγών χρόνιων κυρίως λοιμώξεων, όσο και στο φυσικό περιβάλλον, ως πηγών διαβρώσεων των μετάλλων και άλλων καταστροφών. (**Zuo et al, 2004**).

Σύμφωνα με εκτιμήσεις των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των ΗΠΑ (NIH), υπολογίζεται ότι άνω των 80% όλων των μικροβιακών λοιμώξεων που καταγράφονται τα τελευταία χρόνια είναι νόσοι από βιομεμβράνες (**Lewis, 2001**). Το υψηλό ανωτέρω ποσοστό των λοιμώξεων αυτών οφείλεται στη μεταβολή της παθογένεσης και του αιτιολογικού υπόβαθρου των λοιμώξεων στις βιομηχανικές χώρες. Συγκεκριμένα έχουν μειωθεί οι οξείες λοιμώξεις οφειλόμενες σε ελευθέρως κυκλοφορούντα μικροβιακά κύτταρα όπως ο τυφοειδής πυρετός (*S. typhi*) και έχουν αυξηθεί οι χρόνιες λοιμώξεις οφειλόμενες σε μικροοργανισμούς του νοσοκομειακού μικροπεριβάλλοντος που παράγουν

βιομεμβράνες όπως οι σταφυλόκοκκοι (*Staphylococcus* spp.) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.). Η μεταβολή αυτή συμβαδίζει και με την αύξηση της απομόνωσης των Gram-θετικών μικροβίων τα οποία έχουν υπερκεράσει τα Gram-αρνητικά βακτήρια στις βακτηριαμίες (Lewis, 2001).

Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι οι βιομεμβράνες χαρακτηρίζονται από αντοχή στα διάφορα αντισηπτικά, τα αντιμικροβιακά φάρμακα και την ικανότητά να ανθίστανται στους μηχανισμούς χυμικής και κυτταρικής άμυνας του ξενιστή (Donlan & Costerton, 2002). Τα καθηλωμένα (sessiles) μικροβιακά κύτταρα μίας ώριμης βιομεμβράνης μπορεί να ανέχονται συγκεντρώσεις ενός αντιβιοτικού, 10-1000 φορές υψηλότερες, από αυτές που απαιτούνται για την αναστολή της ανάπτυξης των ελευθέρων (πλανκτονικών, planktonic) κυττάρων. Συνεπώς, θεραπείες με τις κλασικές συγκεντρώσεις αντισηπτικών και αντιμικροβιακών είναι αναποτελεσματικές στην εκρίζωση των μικροβιακών πληθυσμών εντός των βιομεμβρανών (Lewis, 2001).

Με το δεδομένο ότι ή κλασική αντιμικροβιακή θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται σε βιομεμβράνες είναι αναποτελεσματική, και με στόχο την πρόληψη σχηματισμού ή την εκρίζωση των ήδη σχηματισθέντων βιομεμβρανών, απαιτείται η πλήρης γνώση των μηχανισμών της αρχικής προσκόλλησης των μικροβιακών κυττάρων στα διάφορα υποστρώματα, η ανάπτυξη, η ωρίμανση, η απόσπαση και μετεγκατάσταση των βιομεμβρανών και γενικά των σχετικών ρυθμιστικών διεργασιών σε μοριακό επίπεδο.

Οι εντερόκοκκοι στις βιομεμβράνες είναι πολλαπλώς ανθεκτικότεροι από τους ελευθέρως κυκλοφορούντες εντεροκόκκους, συνεπώς η ανάπτυξη βιομεμβρανών από τους εντεροκόκκους συνιστά σημαντική επιπλοκή.

Οι Costerton και συνεργάτες (Costerton *et al*, 1978) παρατήρησαν ότι οι κοινότητες των προσκολλημένων βακτηρίων περικλείονται σε μια θεμέλια ουσία (matrix) που αποτελείται από εξωπολυμερικές ουσίες, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά

οξέα και που αποδείχθηκε ότι μεσολαβεί στην προσκόλληση. Επίσης, το 1987 ανέφεραν ότι η βιομεμβράνη αποτελείται από μονά μικροβιακά κύτταρα και μικροαποικίες περικλειόμενα σε μια ενυδατωμένη ανιονική εξωπολυμερική θεμέλια ουσία και ότι οι βιομεμβράνες μπορούν και προσκολλώνται σε επιφάνειες και μεταξύ τους (**Costerton et al, 1987**). Παράλληλα, οι Costerton και συν. (**Costerton et al, 1995**) παρατήρησαν ότι η έκφραση γονιδίων ελέγχει την παραγωγή βακτηριακών συστατικών απαραίτητων για την προσκόλληση και τον σχηματισμό βιομεμβρανών, δίνοντας έμφαση στο ότι η διαδικασία του σχηματισμού βιομεμβρανών ρυθμίζεται από συγκεκριμένα γονίδια που αντιγράφονται κατά την διάρκεια της αρχικής κυτταρικής προσκόλλησης. Π.χ. σε μελέτη της *Pseudomonas aeruginosa* οι Davies και Geesey (**Davies & Geesey, 1995**) βρήκαν ότι το γονίδιο *algC* που ελέγχει την φωσφομανομουτάση εμπλέκεται στην σύνθεση αλγινικού (εξωπολυσακχαριδική ουσία) και σχετίζεται με την προσκόλληση σε μια σταθερή επιφάνεια. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα *algD*, *algU*, *proS* και τα γονίδια που ελέγχουν την σύνθεση της πολυφωσφοκινάσης ρυθμίζουν όλα τον σχηματισμό βιομεμβρανών.

Ο νέος ορισμός για τις βιομεμβράνες είναι μια άθροιση ακίνητων βακτηριακών κυττάρων προσκολλημένα μη αναστρέψιμα σε διάφορες βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες ή μεταξύ τους που περικλείονται σε μια θεμέλια ουσία η οποία αποτελείται από εξωκυττάρια πολυμερείς ουσίες. Τα βακτηριακά κύτταρα στις βιομεμβράνες έχουν ένα τροποποιημένο φαινότυπο όσο αφορά το ρυθμό αύξησης και την έκφραση των γονιδίων τους.

II.2. ΣΤΑΔΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η πρώτη έκπληξη για την ιατρική κοινότητα ήταν ότι τα βακτήρια σχηματίζουν βιομεμβράνες κατά προτίμηση σε απογυμνωμένες επιφάνειες. Τα ελεύθερα (plaktonic)

βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες και να ξεκινήσουν τον σχηματισμό βιομεμβρανών παρουσία δυνάμεων που υποβιβάζουν αυτές των καρδιακών βαλβίδων και υπερβαίνουν το νούμερο Reynolds των 5000 (Characklis & Marshall, 1990). Το νούμερο Reynolds είναι ένα νούμερο χωρίς διάσταση που περιγράφει την στροβιλώδη ροή ενός υγρού. Εάν το νούμερο αυτό είναι υψηλό σημαίνει ότι υπάρχει στροβιλώδης ροή. Εάν είναι χαμηλό επικρατεί στρωτή ροή. Υποστηρίζεται ότι η στροβιλώδης ροή διευκολύνει την βακτηριακή προσκόλληση και τον σχηματισμό βιομεμβρανών, αλλά όποιος και αν είναι ο μηχανισμός οι βιομεμβράνες σχηματίζονται κατά προτίμηση σε απογυμνωμένες επιφάνειες.

Έρευνες της βακτηριακής προσκόλλησης σε εργαστηριακά στελέχη βακτηρίων έδειξαν ότι οι πολύ λείες επιφάνειες μπορεί να διαφεύγουν του αποικισμού βακτηρίων. Παρόλαυτά σε άλλες μελέτες φάνηκε ότι οι λείες επιφάνειες αποικίζονται τόσο εύκολα όσο οι σκληρές επιφάνειες και ότι τα φυσικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας επηρεάζουν την βακτηριακή προσκόλληση μόνο σε μικρό βαθμό (Costerton *et al*, 1995). Όταν οι βιομεμβράνες σχηματίζονται σε λίγο απογυμνωμένο περιβάλλον σπάνε περισσότερο εύκολα, ενώ οι βιομεμβράνες που σχηματίζονται σε πολύ απογυμνωμένο περιβάλλον είναι δυνατές και ανθεκτικές στην μηχανική καταπόνηση.

Με βάση την παρατήρηση στο μικροσκόπιο τα στάδια του σχηματισμού βιομεμβρανών είναι: μικροβιακή προσκόλληση, σχηματισμός μικροαποικιών, ωρίμανση των βιομεμβρανών και αποκόλληση (Εικόνα 4). Οι ώριμες βιομεμβράνες συχνά δείχνουν πολύπλοκη αρχιτεκτονική που αποτελείται από πύργους που διαχωρίζονται με κανάλια νερού τα οποία διευκολύνουν την παροχή θρεπτικών συστατικών. Η τρισδιάστατη αρχιτεκτονική των βιομεμβρανών είναι αποτέλεσμα μίας συνεχούς ανάπτυξης που καταλήγει σε μια δομική ετερογένεια.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων που περιλαμβάνει η δημιουργία του biofilm.

Οι βιομεμβράνες όπως άλλες κοινότητες σχηματίζονται σταδιακά στο χρόνο. Υπάρχει ένας κύκλος ανάπτυξης της βιομεμβράνης πέντε σταδίων με κοινά χαρακτηριστικά ανεξάρτητα από το φαινότυπο των μικροοργανισμών. Το στάδιο 1 είναι η φάση προσκόλλησης που μπορεί να χρειαστεί μόνο δευτερόλεπτα για να ενεργοποιηθεί και είναι πιθανόν να προκληθεί από περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αυτά τα ερεθίσματα ποικίλλουν για τους μικροοργανισμούς αλλά περιλαμβάνουν αλλαγές στα διατροφικά συστατικά και στη συγκέντρωση τους, αλλαγές του pH, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης του οξυγόνου, της ωσμωτικότητας και του σιδήρου. Οι τραχειές επιφάνειες είναι πιο επιρρεπείς στο σχηματισμό βιομεμβρανών. Αυτό συμβαίνει πιθανώς λόγω της ελάττωσης των δυνάμεων συναφείας και λόγω της αυξημένης περιοχής της επιφάνειας. Μελέτες υποδεικνύουν ότι οι βιομεμβράνες τείνουν να σχηματίζονται πιο εύκολα σε υδρόφοβα υλικά όπως στο τεφλόν και σε άλλα πλαστικά από ότι σε γυαλί και μέταλλο. Η αρχική προσκόλληση στο στάδιο 1 είναι αναστρέψιμη καθώς κάποια κύτταρα

αποκολλώνται μπορεί ο σχηματισμός της βιομεμβράνης να υποχωρήσει. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου τα βακτηριακά κύτταρα παρουσιάζουν ένα λογαριθμικό ρυθμό ανάπτυξης.

Το στάδιο 2 χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη προσκόλληση και ξεκινάει λεπτά μετά από το στάδιο 1. Αφού προσκολληθούν στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, τα βακτήρια αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται στέλνοντας παράλληλα χημικά σήματα με τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους. Όταν η ένταση των σημάτων υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο, ενεργοποιούνται γενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην έκκριση εξωπολυσακχαριδικών μορίων (EPS) γεγονός που οδηγεί στην παγίδευση τροφικών συστατικών και πλακτωνικών βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια του σταδίου 2 συσσωρεύματα βακτηριακών κυττάρων σχηματίζονται, και η κινητικότητα μειώνεται. Όταν τα συσσωματώματα κυττάρων σχηματίσουν στιβάδα πάχους μεγαλύτερου από 10 μm , ο σχηματισμός βιομεμβράνης βρίσκεται στο στάδιο 3 γνωστό και σαν ωρίμανση 1 (**Monroe, 2007**). Όταν οι βιομεμβράνες φθάσουν στο μεγαλύτερο πάχος τους γενικά μεγαλύτερο από 100 μm αυτό ονομάζεται στάδιο 4 του σχηματισμού βιομεμβρανών ή ωρίμανση 2. Κατά τη διάρκεια του σταδίου 5 παρατηρείται διασκορπισμός των κυττάρων. Κάποια από τα βακτήρια αναπτύσσουν τον πλανκτονικό φαινότυπο και αφήνουν τη βιομεμβράνη. Αυτό ξεκινάει αρκετές μέρες μετά το στάδιο 4 (**Monroe, 2007**). Αν και συγκεκριμένες συνιστώσες είναι κοινές σε όλες τις βιομεμβράνες, σημαντική για την κατασκευή μίας βιομεμβράνης είναι η συμβολή παραγόντων του ξενιστή όπως είναι τα συστατικά της άμυνας του και οι φυσικές τοποθεσίες του. Διάφορα σημαντικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος επηρεάζουν το σχηματισμό μίας βιομεμβράνης.

II.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Με την εμφάνιση των λοιμώξεων που σχετίζονται με βιομεμβράνες, προέκυψαν σημαντικά διαγνωστικά προβλήματα για το κλινικό εργαστήριο. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κατηγορίες: ψευδώς αρνητικές καλλιέργειες, ορατοί αλλά όχι καλλιεργήσιμοι μικροοργανισμοί, υποτίμηση ή χαμηλή εκτίμηση της αποικίας, ακατάλληλο δείγμα και απώλεια ή ελάττωση της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά. Οι βιομεμβράνες είναι ελαστικές, προσκολλώνται με τις εξωκυττάρειες πολυμερείς ουσίες και είναι αρκετά ανθεκτικές κατά την καλλιέργεια με ξέστρα.

Κύριες μέθοδοι ανίχνευσης των βιομεμβρανών

- **Μέθοδος του σωληναρίου (Tube Method) (Christensen *et al*, 1982)**

Είναι μια ποιοτική εκτίμηση του σχηματισμού βιομεμβρανών κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε TSB (trypticase soy broth) με 1% γλυκόζη σε σωληνάκια για 24 ώρες. Τα σωληνάκια στη συνέχεια αποσταλάζονται και ξεπλύνονται με PBS (phosphate buffer saline) και χρωματίζονται με κρυσταλλικό ιώδες (0.1%). Κατόπιν, τα σωληνάκια ξεπλύνονται, στεγνώνονται και θεωρούμε θετικό το σχηματισμό βιομεμβράνης όταν σχηματίζονται ορατές λεπτές γραμμές στο τοίχωμα και στον πάτο του σωληναρίου.

- **Μέθοδος πλακών μικροτιτλοποίησης.**

Η μέθοδος αυτή που περιγράφηκε από τους Christensen *et al*. (Christensen *et al*, 1985), χρησιμοποιείται πιο ευρέως και θεωρείται μία καθιερωμένη εξέταση για την ανίχνευση του σχηματισμού βιομεμβρανών. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε πλάκες πολυστυρένιου για 24 ώρες, και στη συνέχεια μετά από ξέπλυμα, χρωματίζονται με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδες (0.1%) (Εικόνα 5). Ο σχηματισμός

βιομεμβρανών ανιχνεύεται μετρώντας την οπτική πυκνότητα με ένα φασματοφωτόμετρο ELISA.

- **Η μέθοδος του ερυθρού του Congo (Freeman *et al*, 1989).**

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε BHI (brain heart infusion) άγαρ με 5% σουκρόζη και κόκκινο του Congo. Τα θετικά αποτελέσματα υποδεικνύονται από μαύρες αποικίες με μία ξηρή κρυσταλλική υφή (Εικόνα 6).

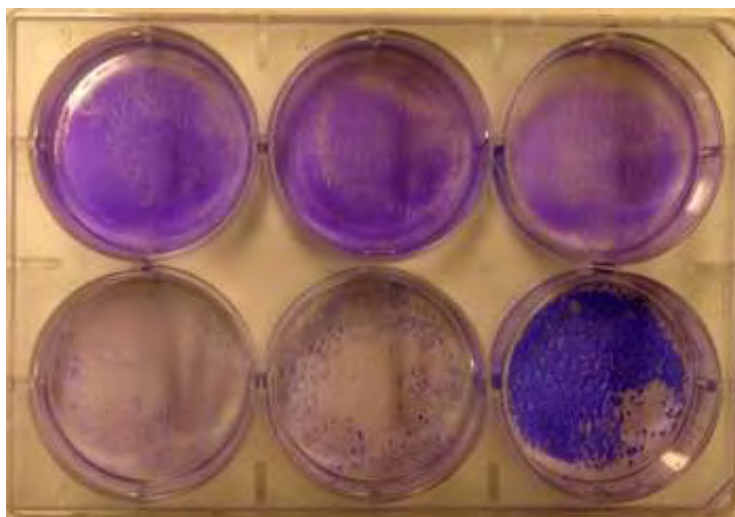
- **Βιοφθορίζουσα έκθεση (Bioluminescent Assay) (Oliveira & Cunha, 2010)**
(Εικόνα 7).

- **Αραιωμένη ολική ανακλούμενη φασματοσκοπία**

-Attenuated Total Reflecting Spectroscopy (ATR).

- **Πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες.**

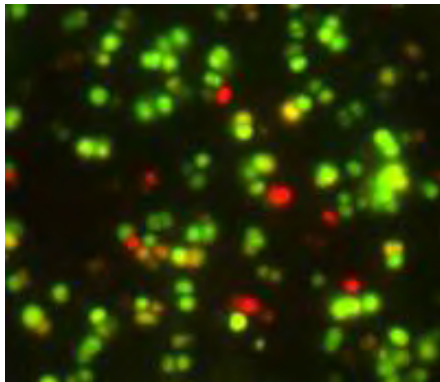
Όπου ελέγχονται οι μεταβολές της συχνότητας καθώς η βιομάζα συσσωρεύεται στην επιφάνεια του αισθητήρα.



Εικόνα 5: Η χρώση με κρυσταλλικό ιώδες επιτρέπει την ποσοτική μέτρηση της παραγωγής βιομεμβράνης και τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών στελεχών και σε διαφορετικές συνθήκες (Christensen *et al*, 1985).



Εικόνα 6: Ανάπτυξη στελεχών *S. aureus* S30 σε τριβλίο με άγαρ που περιέχει ερυθρό του Κογκό. Η παραγωγή βιομεμβράνης για κάθε στέλεχος αξιολογείται ανάλογα με το χρώμα της κηλίδας (Freeman *et al*, 1989).



Εικόνα 7: Σχηματισμός βιομεμβράνης από τον *S. aureus* ορατός μέσα από μικροσκόπιο φθορισμού (Bioluminescent Assay), που, σε συνδυασμό με ειδική χρώση επιτρέπει την καταμέτρηση του ποσοστού των ζωντανών και νεκρών στελεχών *S. aureus*. Τα νεκρά μικρόβια απεικονίζονται κόκκινα και τα ζωντανά πράσινα (Oliveira & Cunha, 2010).

Για την αξιόπιστη ανίχνευση της βιομεμβράνης συνίσταται πριν την καλλιέργεια του κλινικού δείγματος να γίνεται προσπάθεια απομάκρυνσης των μικροοργανισμών που πιθανώς εμπλέκονται με βιομεμβράνες από το υπόστρωμα μέσω μηχανικών δυνάμεων,

όπως στροβιλισμός ή υπέρηχοι, πριν από εξέταση και μέτρηση. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για την μέτρηση των βιομεμβρανών είναι η μέθοδος πλάκας μικροτιτλοποίησης, στην οποία τα διασκορπισμένα κύτταρα των βιομεμβρανών τοποθετούνται σε ένα στερεό μικροβιολογικό μέσο, επωάζονται και μετρώνται (**Christensen et al, 1985**). Ακόμα, έχει περιγραφεί και μία άλλη μέθοδος όπου χρησιμοποιούνται καθετήρες σιλικόνης των οποίων η μετρούμενη διαφορά βάρους μετά την ανάπτυξη των προσκολληθέντων μικροβίων υποδεικνύει την παρουσία βιομεμβράνης (**Papavasileiou et al, 2010, Chandra et al, 2001**).

II.4. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται μέσα στις βιομεμβράνες έχουν ένα αριθμό ιδιοτήτων που τα διακρίνουν ξεκάθαρα από τους πλανκτονικούς πληθυσμούς. Σε αυτές περιλαμβάνονται: η προστασία κατά την οποία η κατασκευή ή ο φαινότυπος της βιομεμβράνης προστατεύει τα βακτήρια από τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ουσίες, οι διαφορές στην έκφραση του φαινοτύπου και στα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης, ο ανταγωνισμός και η ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών που επηρεάζει την απόκτηση των θρεπτικών συστατικών και η επικοινωνία των μικροβίων.

Προστασία από το περιβάλλον

Η ανάπτυξη μέσα στη θεμέλια ουσία των βιομεμβρανών παρέχει προστασία στα μικροβιακά κύτταρα από συχνά ακραίες συνθήκες του περιβάλλοντος (**Stickler 1999**). Τα κύτταρα που αναπτύσσονται μέσα στις βιομεμβράνες είναι ικανά να διαφεύγουν του ανοσιακού συστήματος του ξενιστή (**Anwar et al, 1992**) και είναι συχνά 1000 φορές πιο ανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες από ότι είναι τα πλακτωνικά κύτταρα (**Nickel et al, 1985**). Η θεμέλια ουσία των βιομεμβρανών από μόνη της μπορεί να δημιουργεί ένα

φυσικό φραγμό στην έκθεση σε ανοσογενικούς επιτόπους και στην ανοσολογική απάντηση. Ερευνητές βρήκαν ότι η *P. aeruginosa* μέσα στις βιομεμβράνες επιβίωσε της δράσης από τον κανονικό ανθρώπινο ορό (Anwar *et al*, 1992) και είχε μία χαμηλότερη διαδοχική ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τον πλανκτονικό πληθυσμό (Jensen *et al*, 1990, 1993). Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να ξεκινήσει από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPSs) των Gram-αρνητικών μικροβίων και την πεπτιδογλυκάνη των Gram-θετικών βακτηρίων (Hoiby *et al*, 1995). Σε λοιμώξεις που σχετίζονται με βιομεμβράνες η ενεργοποίηση του συμπληρώματος δε συμβαίνει μόνο από τα πλανκτονικά βακτήρια που είναι διασκορπισμένα στην περιοχή της λοίμωξης αλλά και από τμήματα των μικροβιακών κυττάρων. Η θεμέλια ουσία των βιομεμβρανών στη συνέχεια προστατεύει την πλειοψηφία των κυττάρων από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα (PMNs) και από τα αντισώματα. Οι βιομεμβράνες με αυτόν τον τρόπο συνδέονται με χρόνιες λοιμώξεις όπου υπάρχει συσσώρευση ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων με αποτέλεσμα τη φλεγμονή και οδηγώντας τελικά σε τοπική καταστροφή του ιστού. Ένα κύριο παράδειγμα όπου οι βιομεμβράνες προκαλούν καταστροφή του ιστού είναι οι πνεύμονες των ασθενών με κυστική ίνωση που έχουν χρόνια λοίμωξη με βλενώδη *P. aeruginosa*. Αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση της οξειδωτικής έκρηξης των PMNs (Jensen *et al*, 1990) και του συστήματος του συμπληρώματος (Jensen *et al*, 1993).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι βιομεμβράνες των βακτηρίων δείχνουν αυξημένη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί. Η θεμέλια ουσία των βιομεμβρανών φαίνεται ότι παρέχει ένα φυσικό φραγμό σε κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες ελαττώνοντας τη διείσδυση μέσα στη βιομεμβράνη. Παρόλαυτά αυτό από μόνο του δεν μπορεί να εξηγήσει το υψηλό επίπεδο αντοχής που συχνά παρατηρείται. Η EPS είναι μία πολυανιονική θεμέλια ουσία που είναι δυνατό να

δεσμεύσει κατιονικά συμπλέγματα όπως είναι οι αμινογλυκοσίδες. Ενδιαφέρον έχει ότι η αντοχή δεν περιορίζεται στους θετικά φορτισμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες και συνεπώς πρέπει να εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί. Η αυξημένη συγκέντρωση ενζύμων που εκφυλίζουν τα αντιβιοτικά μέσα στις βιομεμβράνες όπως οι β-λακταμάσες μπορεί να συντελούν στην αντοχή σε κάποιες πενικιλίνες (**Giwerzman et al, 1990**). Ωστόσο φαίνεται ότι η θεμέλια ουσία μπορεί μόνο να καθυστερήσει την μεταφορά των αντιβιοτικών στα κύτταρα και όχι να αποτρέψει την είσοδο τους (**Gilbert & McBain, 2001**).

Ένας σημαντικός παράγοντας είναι ότι τα μικροβιακά κύτταρα μέσα στις βιομεμβράνες αναπτύσσονται αργά και είναι φαινοτυπικά διαφορετικά από τα πλανκτονικά κύτταρα. (**Gilbert et al, 1990**). Η θεμέλια ουσία των βιομεμβρανών περιέχει ένα μεγάλο αριθμό από διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα όπου τα βακτήρια έρχονται σε επαφή με θρεπτικά συστατικά, παραπροϊόντα και απόβλητα που μπορούν να αναπαράγουν ανθεκτικούς φαινότυπους και αργούς ρυθμούς ανάπτυξης.

Ο ελαττωμένος ρυθμός ανάπτυξης οφείλεται συχνά σε περιορισμό των διατροφικών συστατικών που μπορεί να οδηγήσει σε πρώιμη έναρξη της γενικής αντίδρασης του στρες. Για παράδειγμα το *RpoS* κωδικοποιεί τον παράγοντα σς, ο οποίος ρυθμίζει ένα αριθμό γονιδίων που απαιτούνται για την επιβίωση στη στατική φάση της *Escherichia coli*. Τα βακτήρια με έλλειψη του *rpoS* ήταν ανίκανα να παράγουν βιομεμβράνες και να αποκτήσουν με τον τρόπο αυτό την προστασία που παρείχαν οι βιομεμβράνες (**Adams & McLean, 1999**). Κατά τον σχηματισμό βιομεμβρανών μπορεί να επιλέχθούν συγκεκριμένοι φαινότυποι που είναι επίσης ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια μέσα στις βιομεμβράνες έρχονται σε επαφή με διατροφικά στοιχεία, μεταβολές οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα και ετερογενή τοπικά μικροπεριβάλλοντα (**Dillon & Fauci, 2000**) που μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και στη

φυσιολογία και να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης στις αντιμικροβιακές ουσίες. Αυτές οι μεταβολές μπορεί να οδηγήσουν στην επιλογή των ανθεκτικών κλώνων. Για παράδειγμα, μετάλλαξη σε ένα μόνο σημείο μπορεί να καταστήσει τα *Enterobacteriaceae* ανθεκτικά στην τρικλοζάνη. Επιπλέον, οπερόνια που ευθύνονται για την πολυανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, όπως το *mar* και για τις αντλίες εκροής όπως το *acrAB* μπορεί να συμβάλλουν στην προστασία των βακτηρίων. Η παραγωγή των γονιδίων *acrAB* παρείχε χαμηλά επίπεδα προστασίας από τη σιπροφλοξασίνη και η έκφραση αυτών των γονιδίων επηρεάστηκε αντίστροφα από τον ρυθμό ανάπτυξης και συνεπώς μαζί μπορεί να ενισχύουν την προστατευτική φύση του φαινότυπου των βιομεμβρανών (**Maira-Litran et al, 2000**).

Έχει αποδειχθεί ότι οι εξωκυττάρειες πολυμερείς ουσίες (EPS) έχουν και άλλες προστατευτικές λειτουργίες. Η θεμέλια ουσία των EPS αποτελείται κυρίως από νερό που είναι στενά δεσμευμένο με τη θεμέλια ουσία και προστατεύει τα κύτταρα από τη γρήγορη αφυδάτωση. Το νερό που είναι δεσμευμένο με τέτοιο τρόπο είναι συχνά πιο δύσκολο να απελευθερωθεί και με αυτόν τον τρόπο εξατμίζεται πιο αργά. Οι EPS και άλλες προσκολλητίνες συγκρατούν τη θεμέλια ουσία της βιομεμβράνης στη θέση της, ακινητοποιώντας τους μικροοργανισμούς. Με τον τρόπο αυτό τα βακτήρια μέσα στις βιομεμβράνες είναι ικανά να επιμένουν κάτω από δύσκολες υδροδυναμικές συνθήκες και μηχανισμούς κάθαρσης του ξενιστή (Sanin nd Vesilind 1994). Επίσης, τα κύτταρα μέσα στις βιομεμβράνες προστατεύονται από την ακτινοβολία UV (υπεριώδη), τις διακυμάνσεις του pH και από το οξειδωτικό και το ωσμωτικό σοκ.

Φαινοτυπική μεταβλητότητα

Οι βιομεμβράνες χαρακτηρίζονται από ετερογενείς μικροβιακούς πληθυσμούς που προσαρμόζονται ταχέως στα νέα περιβάλλοντα και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα από

φαινότυπους. Τα βακτήρια μέσα στη βιομεμβράνη μπορούν να αποκτήσουν νέα χαρακτηριστικά, είτε οικοδομώντας ένα διαφορετικό φαινότυπο που οφείλεται στις ανομοιογενείς συνθήκες ανάπτυξης (**Prigent-Combaret et al, 1999**) ή σε γενετικό επίπεδο, με την ανταλλαγή των γονιδίων ή με μεταλλάξεις (**Mathee et al, 1999**). Η φαινοτυπική πλαστικότητα, ή η ικανότητα των βακτηρίων να αλλάζουν το φαινότυπο τους για την αντιμετώπιση του άμεσου περιβάλλοντος τους, είναι κατανοητό να εμφανίζεται στις βιομεμβράνες. Συγκεκριμένα, κύτταρα που αναπτύσσονται σε μια βιομεμβράνη εκφράζουν διαφορετικά γονίδια και είναι συνεπώς φαινοτυπικά διαφορετικό από τα πλακτωνικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε ομογενή περιβάλλοντα (**Prigent-Combaret et al, 1999**). Η ποικιλομορφία των προϋποθέσεων ανάπτυξης κατά τα στάδια της ανάπτυξης των βιομεμβρανών έχει ως αποτέλεσμα τις πολλαπλές φαινοτυπικές εκφράσεις των χαρακτηριστικών που απαιτούνται για την επιβίωσή τους (**Sauer et al, 2002**). Οι Sauer *et al.* (2002) διαπίστωσαν ότι περισσότερες από 800 πρωτεΐνες έχουν μεταβάλλει την έκφραση τους από τις αντίστοιχες του πλακτωνικού πληθυσμού, ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% του συνόλου των πρωτεϊνών (**Sauer et al, 2002**).

II.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αντοχή είναι i) καθυστερημένη διαπερατότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα διαμέσου της θεμέλιας ουσίας της βιομεμβράνης ii) ο τροποποιημένος ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις βιομεμβράνες iii) άλλες φυσιολογικές αλλαγές λόγω της ανάπτυξης των βιομεμβρανών.

Καθυστερημένη διαπερατότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα

Τα αντιμικροβιακά μόρια πρέπει να διαχυθούν διαμέσου της θεμέλιας ουσίας των βιομεμβρανών για να απενεργοποιήσουν τα έγκλειστα κύτταρα. Οι εξωκυττάρια πολυμερικές ουσίες που αποτελούν αυτή τη θεμέλια ουσία αποτελούν ένα φραγμό για αυτά τα μόρια επηρεάζοντας είτε τον ρυθμό της μεταφοράς του μορίου στο εσωτερικό της βιομεμβράνης ή την αντίδραση του αντιμικροβιακού υλικού με το υλικό της θεμέλιας ουσίας.

Τροποποιημένος ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις βιομεμβράνες

Ένας άλλος μηχανισμός για την αντοχή των βιομεμβρανών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι ότι τα μικροβιακά κύτταρα που σχετίζονται με τις βιομεμβράνες αναπτύσσονται αρκετά πιο αργά από τα πλακτωνικά κύτταρα και συνεπώς προσλαμβάνουν τους αντιμικροβιακούς παράγοντες πιο αργά.

II.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Είναι φανερό από επιδημιολογικά δεδομένα ότι οι βιομεμβράνες παίζουν ρόλο στις λοιμώξεις, τόσο σε ειδικές καταστάσεις όπως η κυστική ίνωση και η περιοδοντίτιδα όσο και σε λοιμώξεις του αίματος και του ουροποιητικού συστήματος σαν αποτέλεσμα χρήσης μηχανικών συσκευών. Η διαδικασία μπορεί να σχετίζεται ιδιαίτερα με ανοσοκατασταλμένους ασθενείς που δεν έχουν την ικανότητα να αντιμετωπίζουν τους εισβαλλόμενους μικροοργανισμούς. Οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μικροοργανισμοί που συνδέονται με βιομεμβράνες προκαλούν ασθένεια στον ανθρώπινο ξενιστή δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί είναι 1) αποκόλληση των κυττάρων ή των συναθροίσεων κυττάρων από τις βιομεμβράνες των μηχανικών συσκευών, καταλήγοντας σε λοιμώξεις του κυκλοφορικού ή του

ουροποιητικού συστήματος 2) παραγωγή ενδοτοξινών 3) αντοχή στο σύστημα ανοσίας του ξενιστή 4) παραγωγή ανθεκτικών μικροοργανισμών (μέσω εξαλλαγής πλασμιδίων αντοχής).

Συνοπτικά οι παθογενετικοί μηχανισμοί των βιομεμβρανών που έχουν προταθεί περιλαμβάνουν:

- Οι βιομεμβράνες επιτρέπουν την προσκόλληση σε στερεές επιφάνειες.
- Ο 'καταμερισμός εργασίας' αυξάνει τη μεταβολική ικανότητα της αποικίας.
- Ξεφεύγουν από άμυνες του ξενιστή όπως η φαγοκυττάρωση.
- Αποκτούν μία υψηλή πυκνότητα από μικροοργανισμούς.
- Ανταλλάσσουν γονίδια, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πιο παθογονικά στελέχη μικροοργανισμών.
- Παράγουν υψηλή συγκέντρωση τοξινών.
- Προστατεύουν από αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- Η αποκόλληση των μικροβιακών συμπλεγμάτων μεταφέρει τους μικροοργανισμούς σε άλλες περιοχές.

ΙΙΙ. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ

Η ικανότητα των εντερόκοκκων να προσκολλώνται σε διάφορες ιατρικές συσκευές όπως ουρητηρικά stent, (Keane *et al*, 1994), ενδοφλέβιους καθετήρες (Sandoe *et al*, 2003), χοληφόρα stent (Dowidar *et al*, 1991) και σιλικονούχα υλικά (Dautle *et al*, 2003), έχει συσχετιστεί με την ικανότητα τους να παράγουν βιομεμβράνες. Επίσης, έχει τεκμηριωθεί ο

σχηματισμός βιομεμβρανών από στελέχη *E. faecalis* σε υλικά οφθαλμικών φακών όπως πολυμεθυλμεθακρυλικό, σιλικόνη και ακρυλικό.

III.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ

Η συχνότητα της παραγωγής βιομεμβρανών από εντερόκοκκους ποικίλλει στον κόσμο. Στην Ρώμη το 80% των *E. faecalis* και το 48% των στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν από ασθενείς ήταν ικανά να σχηματίσουν βιομεμβράνες (**Baldassarri et al, 2001**). Στην Ισπανία 57% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* παρήγαγαν βιομεμβράνες (**Toledo-Arana et al, 2001**). Στην Σαρδηνία παραγωγή βιομεμβρανών αναγνωρίστηκε σε 87% των *E. faecalis* και 16% των *E. faecium* (**Dupre et al, 2003**). Στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 109 εντεροκοκκικών στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος και μελετήθηκαν, 100% των *E. faecalis* και 42% των *E. faecium* παρήγαγαν βιομεμβράνες. Στελέχη *E. faecalis* που προέρχονται από βακτηριαμίες σχετιζόμενες με ενδαγγειακούς καθετήρες έχει βρεθεί ότι παράγουν περισσότερο βιομεμβράνη από ότι στελέχη εντερόκοκκων που δεν σχετίζονται με ενδαγγειακούς καθετήρες (**Sandoe et al, 2003**). Στις ΗΠΑ οι Mohamed και συνεργάτες (**Mohamed et al, 2004**) ανέφεραν ότι 93% των *E. faecalis* από κλινικά στελέχη και στελέχη κοπράνων παρήγαγαν βιομεμβράνες. Στην ίδια έρευνα τα στελέχη *E. faecalis* που προκαλούσαν ενδοκαρδίτιδα βρέθηκαν να παράγουν περισσότερο βιομεμβράνη από ότι τα στελέχη μη σχετιζόμενα με ενδοκαρδίτιδα (**Mohamed et al, 2004**). Τα εντεροκοκκικά στελέχη που παρήγαγαν βιομεμβράνες χαρακτηρίστηκαν ως προς την ποιότητα της βιομεμβράνης που παρήγαγαν (δυνατή, μέτρια, αδύναμη, ή μη παραγωγή βιομεμβράνης) με μια κατάταξη οπτικής πυκνότητας (OD₅₇₀) (**Mohamed et al, 2004, Toledo-Arana et al, 2001**). Στην Okayama, Ιαπωνία, οι Seno και συνεργάτες (**Seno et al, 2005**) ανέφεραν ότι 352 στελέχη *E. faecalis* από

λοιμώξεις του ουροποιητικού ήταν ικανά να παράγουν βιομεμβράνες. Στην Πολωνία, 59% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* παρήγαγαν βιομεμβράνες (**Dworniczek et al, 2005**). Μια μελέτη από ένα νοσοκομείο στην Ινδία έδειξε ότι 44 από 171 στελέχη (26%) *E. faecalis* και κανένα από τα 25 *E. faecium* παρήγαγαν βιομεμβράνες (**Prakash, 2005**). Στην Ρώμη, μεταξύ μιας συλλογής 52 στελεχών *E. faecalis* από ορθοπεδικές λοιμώξεις το 96% παρήγαγαν βιομεμβράνες (**Baldassarri et al, 2006**). Άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει παρόμοια αποτελέσματα και υποστηρίζουν ότι τα στελέχη *E. faecalis* (95%) παράγουν βιομεμβράνες πιο συχνά από τα *E. faecium* (29%) (**Di Rosa et al, 2006**). Συνεπώς, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο *E. faecalis* παράγει βιομεμβράνες πιο συχνά από ότι ο *E. faecium* και ότι ο σχηματισμός βιομεμβρανών είναι σημαντικός παράγοντας στην παθογένεση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων.

III.2. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ESP

Η πρωτεΐνη Esp του *E. faecalis* είναι ένας παράγοντας που συντελεί στον αποικισμό και στην επιμονή της λοίμωξης στο ουροποιητικό σύστημα (**Shankar et al, 1999, 2001**). Ένα ομόλογο του γονιδίου *esp* έχει αναγνωριστεί και στον *E. faecium* (**Eaton & Gasson, 2002**).

Ο χαρακτηρισμός της λειτουργικότητας της Esp επικεντρώνεται στον ρόλο που έχει η επιφανειακή πρωτεΐνη στο σχηματισμό των βιομεμβρανών. Η ανάλυση στελεχών που εκφράζανε τις πρωτεΐνες Esp_{fs} και Esp_{fm} και μεταλλαγμένων στελεχών με τον ίδιο γονότυπο που προέρχονταν από αποικισμό του εντέρου τρωκτικών απέτυχε να δείξει ότι η Esp εμπλέκεται στον αποικισμό του εντέρου ή στην προσκόλληση σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του ορθού (**Pultz et al, 2005, Heikens et al, 2005**), παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Esp_{fm} εκφράζεται περισσότερο στους 37°C κάτω από αναερόβιες συνθήκες (**Willem et al, 2007**). Όταν ποντίκια ενέθηκαν διουρηθρικά με ένα θετικό για

esp στέλεχος *E. faecalis* και ένα ισογονικό στέλεχος με μετάλλαξη του *esp*, σημαντικά λιγότερα μεταλλαγμένα στελέχη *E. faecalis* ανακτήθηκαν από τα ούρα και την ουροδόχο κύστη των τρωκτικών δείχνοντας ότι η πρωτεΐνη Espfs παίζει ρόλο στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Shankar *et al*, 2001). Η Espfm έχει έναν παρόμοιο ρόλο στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Leendertse *et al*, **αδημοσίευτα αποτελέσματα**) και εξαιτίας της σημαντικής συμβολής της στο σχηματισμό βιομεμβρανών, θα μπορούσε να συνδέεται και με άλλες εντεροκοκκικές λοιμώξεις στις οποίες εμπλέκονται οι βιομεμβράνες όπως η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα.

Οι ακριβείς λειτουργίες όλων των διαφορετικών περιοχών της Esp παραμένουν ακόμη απροσδιόριστες. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες αποδείξεις ότι το N-τελικό τμήμα της Esp έχει ένα σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βιομεμβρανών. Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *E. faecalis* που έκφραζε την Espfs χωρίς το N-τελικό κομμάτι της ήταν σημαντικά ελαττωματικό ως προς το σχηματισμό βιομεμβρανών σε σύγκριση με το «άγριο» στέλεχος (Tendolkar *et al*, 2005). Επιπλέον, ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που έκφραζε μόνο το N-τελικό τμήμα της Esp παρήγαγε κανονικές βιομεμβράνες (Tendolkar *et al*, 2005). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών της Esp απονέμεται στο N-τελικό κομμάτι της και το κομμάτι αυτό συνεπώς συνδέεται με τις εντεροκοκκικές λοιμώξεις που σχετίζονται με βιομεμβράνες.

Όσον αφορά το ρόλο του γονιδίου *esp* στον σχηματισμό βιομεμβρανών έχουν δημοσιευτεί αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Toledo-Arana και συνεργάτες ανέφεραν ότι 93.5% των *esp*-θετικών στελεχών *E. faecalis* σχημάτιζαν βιομεμβράνες σε αβιοτικές επιφάνειες ενώ κανένα από τα αρνητικά για *esp* στελέχη *E. faecalis* δεν παρήγαγε βιομεμβράνες (Toledo-Arana *et al*, 2001). Σε αυτή τη μελέτη οι ερευνητές βρήκαν επίσης ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *esp* σε δυο μεταλλαγμένα στελέχη *E. faecalis* αλλά όχι σε ένα τρίτο, κατέληξε σε ελαττωματική παραγωγή βιομεμβράνης. Υποστήριξαν ότι το

γονίδιο *esp* προωθεί τον σχηματισμό βιομεμβρανών. Εν τούτοις επιπλέον παράγοντες συντελούν στον σχηματισμό βιομεμβρανών από τον *E. faecalis* (Toledo-Arana *et al*, 2001).

Ο ρόλος της Esp στον σχηματισμό βιομεμβράνης έχει μελετηθεί από μια άλλη γενετική προσέγγιση. Δυο στελέχη *E. faecalis* που είχαν έλλειψη του *esp*, το FA2-2 και OG1RF παρήγαγαν αυξημένες ποσότητες βιομεμβρανών μετά από επιτυχή εισαγωγή και έκφραση του γονιδίου *esp* (Tendolkar *et al*, 2004). Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου *esp* σε δυο διαφορετικούς ετερόλογους ξενιστές, *E. faecium* και *Lactococcus lactis*, δεν είχε καμιά επίδραση στην παραγωγή βιομεμβράνης, δείχνοντας ότι δικοί τους παράγοντες δρουν συνεργικά με αυτή την επιφανειακή πρωτεΐνη για να επαυξήσουν το σχηματισμό των βιομεμβρανών (Tendolkar *et al*, 2005). Τα επίπεδα της έκφρασης της Esp στην επιφάνεια του *E. faecium* συσχετίζονται ποσοτικά με την πρωταρχική προσκόλληση και το σχηματισμό βιομεμβράνης κάτω από διάφορες συνθήκες ανάπτυξης, και η έκφραση της ποικίλει σημαντικά μεταξύ *esp*-θετικών στελεχών (Van Wamel *et al*, 2007).

Ένα πρότυπο στέλεχος, το *E. faecalis* OG1RF παρήγαγε παχιές βιομεμβράνες, όχι μόνο απουσία του *esp* αλλά και απουσία ολόκληρου του νησιδίου παθογονικότητας που παρέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί το *esp* (Kristich *et al*, 2004). Σε μια μελέτη κλινικών εντερόκοκκων, όλα τα 74 *esp*-θετικά στελέχη παρήγαγαν βιομεμβράνες, και 77 από τα 89 αρνητικά για *esp* στελέχη επίσης παρήγαγαν βιομεμβράνη (Mohamed *et al*, 2004). Μεταξύ των στελεχών των εντερόκοκκων που παρήγαγαν βιομεμβράνες, 69% παρουσίαζαν ισχυρή, 46% μέτρια, και 30% ασθενή παραγωγή βιομεμβράνης, και κανένα από τα 12 στελέχη που δεν παράγανε βιομεμβράνη δεν ήταν θετικό για το *esp*. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι το γονίδιο *esp* δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή βιομεμβράνης αλλά υπήρχε μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του *esp* και

υψηλότερων επιπέδων παραγωγής βιομεμβράνης στα *esp*-θετικά στελέχη *E. faecalis* (**Mohamed et al, 2004**).

Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι το γονίδιο *esp* δεν είναι απαραίτητο ούτε επαρκές για την παραγωγή βιομεμβρανών από τον *E. faecalis* και *E. faecium* (**Dworniczek et al, 2005, Ramadhan & Hegedus, 2005**). Η παρουσία του γονιδίου *esp* σε 15 στελέχη *E. faecalis* και 32 κλινικά στελέχη *E. faecium* δεν συσχετίστηκε με την ικανότητα να παράγουν βιομεμβράνες (**Dupre et al, 2003**). Καμιά συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία *esp* και στην ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών δεν βρέθηκε ανάμεσα σε 108 εντεροκοκκικά στελέχη από βακτηριαμίες (**Sandoe et al, 2003**). Μια αναφορά ενός *esp*-θετικού, ανθεκτικού στην βανκομυκίνη, στελέχους *E. faecium* μη συσχετιζόμενου με μεγάλη παραγωγή βιομεμβράνης δημοσιεύτηκε πρόσφατα (**Raad et al, 2005**).

Η αρχική προσκόλληση και παραγωγή βιομεμβράνης είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του *esp*. Ένα αρνητικό για το γονίδιο *esp* στέλεχος βρέθηκε να παράγει βιομεμβράνη και δυο θετικά για το *esp* στελέχη δεν παρήγαγαν βιομεμβράνες (**van Merode et al, 2006**). Οι Di Rosa και συνεργάτες (**Di Rosa et al, 2006**) έδειξαν ότι κάποια στελέχη *E. faecalis* (36 από 83) και *E. faecium* (9 από 45) που βρέθηκαν θετικά για το *esp* δεν συσχετίστηκαν με σχηματισμό βιομεμβρανών. Εντούτοις οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν ότι μερικά *esp*-θετικά στελέχη παρήγαγαν παχύτερες βιομεμβράνες από ότι τα *esp*-αρνητικά στελέχη (**Di Rosa et al, 2006**). Οι ακριβείς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου και του *esp* και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παραγωγή βιομεμβρανών από τους εντερόκοκκους παραμένουν άγνωστοι και αποτελούν αντικείμενο έρευνας.

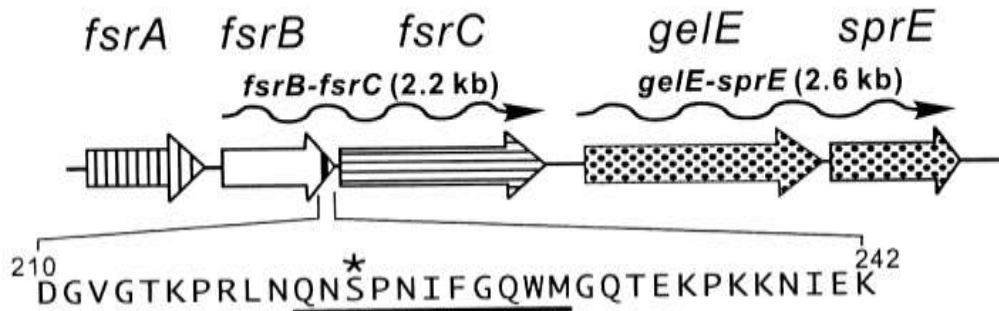
III.3. ΟΠΕΡΟΝΙΟ FSR

Το οπερόνιο *fsr* είναι μία γενετική περιοχή αίσθησης απαρτίας που έχει αναφερθεί και χαρακτηριστεί σε κλινικά στελέχη *E. faecalis* καθώς και σε στελέχη *E. faecium* και *E.*

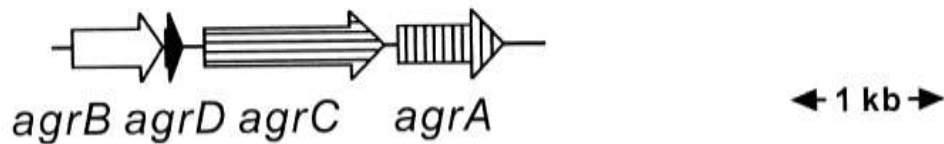
durans από τροφές (**Lopes et al, 2006**). Το *fsr* αποτελείται από 4 γονίδια, τα *fsra*, *fsrB*, *fsrD* και *fsrC* που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση των γονιδίων *gelE* και *sprE* (**Nakayama et al, 2006**). Στον *Enterococcus faecalis* ελέγχει την έκφραση εξωκυττάρων πρωτεασών σχετιζόμενων με την παθογονικότητα όπως είναι η ζελατινάση και η σερινοπρωτεάση μέσω ενός μηχανισμού αίσθησης απαρτίας (**Qin et al, 2001**), και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι επίσης ρυθμίζει το σχηματισμό βιομεμβρανών (**Hancock & Perego, 2004**) και άλλα σημαντικά γονίδια για την παθογονικότητα. Επιπλέον, ρυθμίζει την έκφραση ενός κυκλικού πεπτιδίου που είναι μία φερομόνη που ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση της ζελατινάσης (gelatinase biosynthesis-activating pheromone) (**Nakayama et al, 2001**). Το γονίδιο *fsrB* περιέχει το σήμα που απελευθερώνει το πεπτίδιο- φερομόνη που ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση της ζελατινάσης (GBAP) (**Nakayama et al, 2001**). Όταν το GBAP συσσωρεύεται στην μετάβαση από την υποστηρικτική στην σταθερή φάση, επάγονται τα γονίδια *gelE* και *sprE* που είναι τοποθετημένα ακριβώς κάτω από το *fsr* locus και κωδικοποιούν τη ζελατινάση και σερινοπρωτεάση αντίστοιχα (Εικόνα 8).

Μετά από έρευνες η ακολουθία των αμινοξέων του GBAP εντοπίστηκε στο C-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης FsrB που κωδικοποιείται από την γονιδιακή ομάδα *fsr* (**Qin et al, 2000**). Η FsrB είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα όπως η AgrB, που επίσης δείχνει τμηματική ομοιότητα με κάποιες πρωτεΐνες μεταφορείς όπως είναι ο μεταφορέας του εστέρα γλουταμινικού οξέος στη *Borrelia burgdorferi* (23% ομοιότητα/ 101 κατάλοιπα αμινοξέων) και ένα εσωτερικό μεμβρανικό συστατικό του μεταφορέα ABC της *Escherichia coli* (32% ομοιότητα/75 κατάλοιπα αμινοξέων). Η γονιδιακή ομάδα *fsr* έχει παρόμοια οργάνωση με την γονιδιακή ομάδα *agr* των σταφυλοκόκκων (**van Wamel et al, 1998**) η οποία εμπεριέχει τη σειρά γονιδίων *agrB-agrD-agrC-agrA* (Εικόνα 8).

E. faecalis



S. aureus



Εικόνα 8: Γενετική οργάνωση της περιοχής γύρω από το γονίδιο του πεπτιδίου-φερομόνης στον *E. faecalis* και *S. aureus*. Η περιοχή κωδικοποίησης του πεπτιδίου-φερομόνη που εντοπίζεται στο *fsrB* υποδεικνύεται από την κάθετη έντονη γραμμή. Το δομικό γονίδιο *agrD* που κωδικοποιεί το πεπτιδιο-φερομόνη απεικονίζεται με μαύρο χρώμα και οι πρωτεάσες (ζελατινάση και σερινοπρωτεάση) υποδεικνύονται από τα βέλη με στικτή διαγράμμιση. Η αλληλουχία αμινοξέων αντιστοιχεί στην C-τελική επέκταση της FsrB όπου το τμήμα της GBAP είναι υπογραμμισμένο. Ο αστερίσκος στην ακολουθία των αμινοξέων υποδεικνύει κατάλοιπο σερίνης που συνδέεται με λακτόνη (Nakayama *et al*, 2001).

Η σύγκριση των αλληλουχιών των αμινοξέων της FsrB με την AgrB έδειξε ότι η FsrB έχει επιπλέον μια C-τελική επέκταση που αποτελείται από 40-50 αμινοξέα στην οποία βρέθηκε η ακολουθία της GBAP (Nakayama *et al*, 2001). Αυτό δείχνει ότι η FsrB μεταφράζεται σαν πρόδρομο μόριο της GBAP και στη συνέχεια εξελίσσεται στο να παράγει ώριμη GBAP. Οι θέσεις πρωτεολυτικής δράσης στην FsrB είναι οι δεσμοί Asn-219–Gln-220 και Met-230–Gly-231.

Είναι γνωστό ότι ο *E. faecalis* εκκρίνει πεπτιδικές φερομόνες του φύλου, που πυροδοτούν την μεταφορά με σύζευξη συγκεκριμένων πλασμιδίων. Αυτές οι φερομόνες του φύλου εισάγονται στο κύτταρο όπου μπορούν απευθείας να δεσμευθούν στους υποδοχείς τους (**Fujimoto & Clewell, 1998**). Μελέτες έδειξαν ότι το σήμα-σινιάλο της GBAP μεταφέρεται μέσω ενός ρυθμιστικού συστήματος δύο συστατικών που είναι διαφορετικό από αυτό των φερομονών του φύλου. Αυτό το είδος του ρυθμιστικού συστήματος που μεσολαβείται από ένα πεπτίδιο-φερομόνη είναι γνωστό ότι υπάρχει σε έναν αριθμό Gram θετικών βακτηρίων όπως είναι ο έλεγχος της παραγωγής της βακτηριοσίνης στους γαλακτοβάκιλλους, το σύστημα *agr* (accessory gene regulator) που ελέγχει την παθογονικότητα στους σταφυλοκόκκους, το σύστημα *nis* του *Lactococcus lactis* που ελέγχει την παραγωγή νισίνης, και το σύστημα *com* στον *Bacillus subtilis* που ελέγχει το σχηματισμό σπόρων (**Nes et al, 1996, Kleerebezem et al, 1997**).

Οι Carniol & Gilmore (2004) συζήτησαν το ρόλο της μετατροπής σήματος, της αίσθησης απαρτίας και της δραστηριότητας εξωκυττάρων πρωτεασών στο σχηματισμό βιομεμβράνης από τον *E. faecalis* (**Carniol & Gilmore, 2004**). Η ομάδα του Murray βρήκε ότι στελέχη *E. faecalis* με μεταλλάξεις στα γονίδια του *fsr* (*fsrA*, *fsrB*, *fsrC*) έδειξαν μείωση στο σχηματισμό βιομεμβρανών που κυμαινόταν από ~28 έως 32% σε σύγκριση με το «άγριο» στέλεχος *E. faecalis* OG1RF (**Mohamed et al, 2004**). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από μία άλλη μελέτη που δείχνει την εμπλοκή του *fsr* στο σχηματισμό βιομεμβρανών στο ίδιο στέλεχος (**Pillai et al, 2004**). Οι Hancock & Perego έδειξαν ότι το σύστημα αίσθησης απαρτίας *fsr* του *E. faecalis* V583 ελέγχει την ανάπτυξη βιομεμβράνης μέσω της παραγωγής ζελατινάσης (**Hancock & Perego, 2004**). Στελέχη *E. faecalis* με μεταλλάξεις στα γονίδια *fsra*, *fsrb*, *fsrc* και *gele* που προήλθαν από single cross-over ανασυνδυασμό ήταν σημαντικά ελαττωματικά στην ικανότητα τους να παράγουν βιομεμβράνες. Η αποκατάσταση των μεταλλαγμένων αυτών στελεχών επανέφερε το

σηματισμό βιομεμβρανών (**Hancock & Perego, 2004**). Πρόσφατα αναφέρθηκαν επιπρόσθετοι ρόλοι του *fsr* στο σχηματισμό της βιομεμβράνης (**Mohamed & Murray, 2006**). Η επίδραση του *fsr* στην παραγωγή βιομεμβράνης από τον *E. faecalis* ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της παραγωγής ζελατινάσης ελέγχθηκε με την μέθοδο μικροπλακών, με έλεγχο της πρωταρχικής προσκόλλησης και με μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως (**Mohamed & Murray, 2006**). Μετά την εισαγωγή ενός μεταλλαγμένου *fsr* locus που εμπεριείχε το πλασμίδιο pTEX5249, σε ένα στέλεχος *E. faecalis* με ισχυρή παραγωγή βιομεμβράνης, το καινούριο μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσίασε ελάττωση κατά 41% στην παραγωγή βιομεμβράνης σε σύγκριση με το «άγριο» στέλεχος. Η ίδια μεταβολή παρατηρήθηκε σε ένα στέλεχος με μέτρια παραγωγή βιομεμβράνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *fsr* έχει μια επίδραση στο σχηματισμό βιομεμβρανών από τους εντερόκοκκους ανεξάρτητα από τη ζελατινάση.

III.4. ΖΕΛΑΤΙΝΑΣΗ

Η ζελατινάση του *E. faecalis* είναι μια εξωκυττάρια ψευδαργυρική μεταλλοπρωτεάση που μπορεί και υδρολύει ζελατίνη, κολλαγόνο, και καζεΐνη. Μαζί με τη σερινοπρωτεάση κωδικοποιούνται σε ένα οπερόνιο, *gelE-sprE*, του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται θετικά από το σύστημα *fsr* (**Qin et al, 2001**).

Η ζελατινάση έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει στο σχηματισμό βιομεμβρανών (**Hancock and Perego, 2004**). Ωστόσο η σημασία της ζελατινάσης σε λοιμώξεις από βιομεμβράνες δεν έχει κατανοηθεί καλά. Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή ζελατινάσης ήταν πιο συχνή σε κλινικά στελέχη όταν συγκρίθηκαν με εντερόκοκκους που απομονώθηκαν από κόπρανα υγιών ατόμων (**Coque et al, 1995**). Η αναπλήρωση της απουσίας του γονιδίου *gelE* με εξωτερικά προστιθέμενη ζελατινάση επανέφερε το φαινότυπο των βιομεμβρανών (**Hancock & Perego, 2004**). Παρόλα αυτά μία μελέτη από

τον Roberts και τους συναδέλφους (**Roberts et al, 2004**) δεν επιβεβαίωσε την υψηλή επίπτωση της ζελατινάσης σε κλινικά στελέχη ενώ επίσης αναφέρθηκε έλλειψη συσχέτισης μεταξύ του φαινοτύπου της ζελατινάσης και του σχηματισμού βιομεμβρανών (**Mohamed & Murray, 2005**). Μία πρόσφατη μελέτη (**Arciola et al, 2008**) πρότεινε ότι ένα ισχυρός φαινότυπος ζελατινάσης συμβάλλει στην ανάπτυξη ισχυρών βιομεμβρανών σε επιδημικούς κλώνους *E. faecalis* που απομονώθηκαν από λοιμώξεις ορθοπαιδικών εμφυτευμάτων. Επιπλέον, ο Pillai και συνεργάτες (**Pillai et al, 2002**) παρατήρησαν ότι τα στελέχη που προκαλούσαν ενδοκαρδίτιδα ήταν εμπλουτισμένα με το *fsr* locus και τη δράση της ζελατινάσης σε σύγκριση με στελέχη από κόπρανα δείχνοντας έτσι ότι η περιοχή της λοίμωξης μπορεί να έχει κριτική σημασία στον καθορισμό της κλινικής βαρύτητας και της συμβολής της ζελατινάσης στο σχηματισμό των βιομεμβρανών *in vivo*. Στον γαστρεντερικό σωλήνα τα μικρόβια μπορούν να υπάρχουν σε συσσωρευμένα συμπλέγματα-αποικίες όπως είναι οι βιομεμβράνες ή σε ελεύθερη πλακτωνική κατάσταση. Τα μικρόβια που διαθέτουν ζελατινάση ή άλλα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το σχηματισμό βιομεμβρανών μπορεί να έχουν πλεονέκτημα στον αποικισμό του περιβάλλοντος του ξενιστή όπως είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας.

Στελέχη *E. faecalis* με μετάλλαξη του *gelE* παρουσίασαν σημαντική μείωση στην παραγωγή βιομεμβράνης, σε σχέση με το μη μεταλλαγμένο στέλεχος OG1RF (**Singh et al, 1998, Mohamed et al, 2003, 2004**). Η σημασία του καταρράκτη του *gelE* με το συν-μεταγραφέν γονίδιο *sprE*, στον σχηματισμό των βιομεμβράνης έχει επίσης εξεταστεί. Ένα στέλεχος με μετάλλαξη του γονιδίου *sprE* σχημάτισε παρόμοιες ποσότητες βιομεμβράνης με το «άγριο» στέλεχος OG1RF, ενώ στελέχη με μεταλλάξεις του *gelE* παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή βιομεμβράνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ζελατινάση είναι σημαντική για τον σχηματισμό βιομεμβράνης περισσότερο από ότι η σερινοπρωτεάση (**Mohamed et al, 2004**). Μια έρευνα δεν βρήκε διαφορά στην παραγωγή

βιομεμβρανών ανάμεσα σε ζελατινάση-θετικά και ζελατινάση-αρνητικά στελέχη *E. faecalis* που προέρχονταν από ανθρώπινες κλινικές πηγές και κόπρανα, δείχνοντας ότι δεν υπήρχε συσχέτιση της παραγωγής ζελατινάσης και του σχηματισμού βιομεμβράνης (Mohamed & Murray, 2005). Σε μια ανάλυση εντεροκοκκικών στελεχών με έλλειψη του γονιδίου *esp*, η μέση οπτική πυκνότητα των βιομεμβρανών των ζελατινάση-θετικών στελεχών ήταν υψηλότερη, αν και όχι σημαντικά από ότι των ζελατινάση-αρνητικών στελεχών, δείχνοντας ότι η ζελατινάση συνεισφέρει στις βιομεμβράνες σε ένα υπόβαθρο έλλειψης του *esp* (Mohamed & Murray, 2005). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στον σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ στελεχών που παρήγαγαν ζελατινάση και στελεχών που δεν παρήγαγαν ζελατινάση σε μία μεγαλύτερη συλλογή στελεχών *E. faecalis* (Seno *et al*, 2005).

Ένα ισογονικό στέλεχος *E. faecalis* OG1RF με μετάλλαξη του *gelE* και ένα άλλο με μετάλλαξη του *sprE* ελέγχθηκαν για την παραγωγή βιομεμβράνης. Το στέλεχος με μετάλλαξη του *sprE* και το «άγριο» στέλεχος OG1RF παρουσίαζαν 100% παραγωγή βιομεμβράνης αλλά το στέλεχος με μετάλλαξη του *gelE* παρουσίαζε έλλειψη ικανότητας παραγωγής βιομεμβράνης (Kristich *et al*, 2004). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ζελατινάση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή βιομεμβράνης από τον *E. faecalis* OG1RF. Η απενεργοποίηση του *fsr*-ελεγχόμενου γονιδίου *gelE* σε ένα διαφορετικό στέλεχος, το *E. faecalis* V583 βρέθηκε ότι βλάπτει το σχηματισμό βιομεμβράνης (Hancock & Perego, 2004). Αυτή η έρευνα δείχνει ότι η ενζυμική δραστηριότητα της ζελατινάσης απαιτείται για την παραγωγή βιομεμβράνης (Hancock & Perego, 2004).

Σε μια μελέτη που υποστηρίζει τον ρόλο της ζελατινάσης στην παραγωγή βιομεμβράνης οι ερευνητές εισάγανε το πλασμίδιο pTEX5249 (ένα θραύσμα 6 kb που περιείχε τα γονίδια *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* και τα πρώτα 395 bp του *gelE* κλωνοποιημένα στο

pAT18) στο στέλεχος *E. faecalis* JH2-2 και διαπίστωσαν 53% αύξηση στην παραγωγή βιομεμβράνης σε σχέση με τους μάρτυρες (**Mohamed & Murray, 2006**).

Δυο πρόσφατες έρευνες προσπάθησαν να διερευνήσουν την συσχέτιση της ζελατινάσης και της παραγωγής βιομεμβράνης σε εντεροκοκκικά στελέχη που συλλέχθηκαν στην Ιταλία (**Baldassarri et al, 2006, Di Rosa et al, 2006**). Δεν βρέθηκε τέτοια συσχέτιση μεταξύ στελεχών *E. faecalis* από ορθοπεδικές λοιμώξεις (**Baldassarri et al, 2006**). Σε μια άλλη έρευνα η ζελατινάση δεν απαιτούνταν για παραγωγή βιομεμβράνης μεταξύ 83 στελεχών *E. faecalis* και 45 στελεχών *E. faecium* που εξετάστηκαν (**Di Rosa et al, 2006**). Αν και γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η ζελατινάση είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό βιομεμβρανών, επιδημιολογικές μελέτες δεν υποστηρίζουν την σύνδεση ανάμεσα σε ζελατινάση και παραγωγή βιομεμβράνης σε κλινικά στελέχη *E. faecalis*.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ζελατινάση ρυθμίζει το σχηματισμό βιομεμβράνης είναι μέχρι σήμερα άγνωστος. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η ζελατινάση μπορεί να είναι σε θέση να τροποποιεί την υδροφοβικότητα της επιφάνειας των βακτηριακών κυττάρων λόγω της ικανότητάς της να διασπά τα υποστρώματα σε υδρόφοβα κατάλοιπα (**Mäkinen et al, 1989**). Μια δεύτερη υπόθεση υποστηρίζει την ικανότητα της ζελατινάσης να μεταβάλλει τους ρυθμούς της αυτόλυσης των εντερόκοκκων, ενεργοποιώντας αυτολυσίνες του κυτταρικού τοιχώματος (**Shockman & Cheney, 1969**). Έχει προταθεί η άποψη ότι η ζελατινάση ενεργοποιεί τη λύση ενός υπο-πληθυσμού των μικροβίων και έτσι καταλύει την απελευθέρωση του γενωμικού DNA (eDNA), που αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της θεμέλιας ουσίας των βιομεμβρανών (**Thomas et al, 2008**).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι τα αποτελέσματα της δράσης της σερινοπρωτεάσης είναι αντίθετα με αυτά της ζελατινάσης καθώς η αδρανοποίηση της σερινοπρωτεάσης οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά λύσης, απελευθέρωσης eDNA και στην αύξηση του

σχηματισμού βιομεμβράνης (**Thomas et al, 2008**). Παρά το γεγονός ότι δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί η άμεση αλληλεπίδραση της σερινοπρωτεάσης με μία αυτολυσίνη της επιφάνειας των κυττάρων, υπάρχουν αποδείξεις που δείχνουν ότι η σερινοπρωτεάση μπορεί να τροποποιήσει το ρυθμό της αυτόλυσης (**Thomas et al, 2008**). Στοιχεία δείχνουν ότι η σερινοπρωτεάση αποτρέπει την πρόιμη ωρίμανση των βιομεμβρανών ρυθμίζοντας αρνητικά τη ζελατινάση.

Τα στοιχεία από μία άλλη μελέτη φαίνεται να επιβεβαιώνουν τη σημασία της αυτόλυσης στην ανάπτυξη των βιομεμβρανών από τον *E. faecalis*, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε μεταβολή του ρυθμού της αυτόλυσης, αλλαγές στην απελευθέρωση του eDNA και διαφορές στο σχηματισμό βιομεμβράνης σε εντεροκοκκικά στελέχη με μεταλλάξεις που παρουσίαζαν ελαττωματική παραγωγή των εξωκυττάρων πρωτεασών. Πρωϊότερες μελέτες από τους Shockman και άλλους πρότειναν σαν κυτταρικό στόχο της ζελατινάσης μία αυτολυσίνη (**Shockman & Cheney, 1969**). Τουλάχιστον τρεις αυτολυσίνες (οι AtIA, AtIB και AtIC) έχουν αναγνωριστεί ότι εκκρίνονται από τον *E. faecalis* εκ των οποίων η AtIA θεωρείται ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό της βιομεμβράνης (**Kristich et al, 2008**).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

I.1. Στελέχη-Ταυτοποίηση

Στη μελέτη μας συμπεριλήφθησαν συνολικά 351 στελέχη εντεροκόκκων:

Από τα στελέχη αυτά, 219 προήλθαν από ανθρώπινα δείγματα (141 *E. faecium*, 73 *E. faecalis*, 4 *E. gallinarum* και 1 *Enterococcus durans*). Από αυτά, 133 απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα σε τμήματα με κλινικό πρόβλημα αντοχής και 86 από δείγματα κοπράνων ασθενών που νοσηλεύθηκαν σε διάφορες κλινικές του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας και του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης (Πίνακας 6) τη χρονική περίοδο 2006-2009. Τα δείγματα των κοπράνων συλλέχθηκαν στα πλαίσια επιτήρησης για ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη (VRE). Όπως βρέθηκε με τον προσδιορισμό του φαινοτύπου ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά, η συλλογή των εντεροκοκκικών στελεχών από τα δείγματα ανθρώπων περιλάμβανε 75 στελέχη ευαίσθητα στη βανκομυκίνη (vancomycin-susceptible enterococci, VSE) και 144 στελέχη ανθεκτικά στη βανκομυκίνη.

Επίσης, περιλήφθηκαν 132 στελέχη εντεροκόκκων που απομονώθηκαν από κόπρανα χοίρων (79 *E. faecalis*, 32 *E. faecium*, 18 *E. gallinarum* και 3 *Enterococcus casseliflavus*) τα οποία συλλέχθηκαν από τέσσερα διαφορετικά αγροκτήματα στην περιοχή της Θεσσαλίας τη χρονική περίοδο 2001-2002. Μετά τον προσδιορισμό του φαινοτύπου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά βρέθηκε ότι η συλλογή μας από ζωικά στελέχη περιλάμβανε 128 VSE και 4 VRE στελέχη.

Τόσο τα ανθρώπινα όσο και τα ζωικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 της BioMerieux.

Πίνακας 6: Κλινικά δείγματα από τα οποία απόμονώθηκαν τα ανθρώπινα κλινικά στελέχη εντερόκοκκων.

Κλινικά δείγματα	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Ούρα	7	37
Αίμα	25	8
Πύο	4	1
Βρογχικά	2	0
Τραύματα	1	1
Δερματικά	0	3
Ασκίτης	0	2
Κολπικά	6	8
Άλλες πηγές	7	1
Σύνολο	52	61

1.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία εντεροκοκκικών λοιμώξεων έγινε με τη χρήση της μεθόδου διαχύσεως με δίσκους αντιβιοτικών (disc diffusion test) σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI και με ταινίες E test (BioMerieux, Solna, Sweden).

Τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν ήταν η αμικικιλίνη, βανκομυκίνη, γενταμικίνη, λινεζολίδη, τιγκεκυκλίνη και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα

προτεινόμενα από το CLSI ερμηνευτικά κριτήρια (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010**):

αντοχή στην αμπικιλίνη MIC > 16 µg / ml

υψηλού επιπέδου αντοχή στη γενταμικίνη MIC > 2.000 µg / ml

αντοχή στη βανκομυκίνη MIC ≥ 32 µg / ml

αντοχή στην τιγκεκυκλίνη MIC > 0.25 µg / ml

αντοχή στη λινεζολίδη ως MIC ≥ 8 µg / ml

I.2.1. E tests

Η αρχή της δοκιμής των E test (Epsilometer test) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 και εισήχθη στο εμπόριο το 1991 από την εταιρεία AB Biodisk. Το E test αποτελεί μία μέθοδο κλιμακωτής (gradient) διάχυσης σε άγαρ που χρησιμοποιεί μία ορθογώνιο ταινία (strip) που έχει εμποτιστεί με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (**Mendoza, 1998**). Ένα εναιώρημα του μικροβίου 0.5 McF επιστρώνεται σε τριβλίο με άγαρ Muller-Hinton, και η ταινία E test τοποθετείται με την κορυφή της στο άκρο του άγαρ. Το αντιβιοτικό διαχέεται στο άγαρ, παράγοντας μια εκθετική κλίση. Μετά από 24 ώρες επώασης, μία ελλειπτική ζώνη αναστολής παράγεται. Η ανάγνωση του σημείου στο οποίο η έλλειψη συναντά την ταινία δίνει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του αντιβιοτικού.

Αφού οι ταινίες E-test τοποθετηθούν στα τριβλία, αναστρέφουμε τα τριβλία και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 ° C για 16 έως 18 ώρες. Για τον έλεγχο της βανκομυκίνης σε σταφυλόκοκκο και εντερόκοκκο απαιτείται επώαση στον κλίβανο για 24

ώρες. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων και ο προσδιορισμός της MIC γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού και σύμφωνα με τα κριτήρια από το CLSI.

I.2.2. Σύστημα Vitek 2

Το σύστημα Vitek 2 είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης μικροβίων και αντιβιογράμματος που βασίζεται σε μία μέθοδο μικροαραίωσης. Το σύστημα είναι διαθέσιμο σε τρεις μορφές (Vitek 2 compact, Vitek 2, και Vitek 2 XL), οι οποίες διαφοροποιούνται σε αυξανόμενα επίπεδα αυτοματισμού και χωρητικότητας (**Pinkus, Biomerieux**).

Αποτελείται από μία κάρτα 64-μικροϋποδοχών στους οποίους περιλαμβάνονται μία υποδοχή ελέγχου της ανάπτυξης του μικροβίου και υποδοχές προμετρημένων ποσοτήτων 19-20 αντιμικροβιακών παραγόντων σε συνδυασμό με υλικό καλλιέργειας. Χρησιμοποιείται εναιώρημα του μικροβίου συγκεκριμένης θολερότητας (0.50-0.63 McF). Τα βήματα που ακολουθούνται είναι η πλήρωση, το σφράγισμα της κάρτας και η τοποθέτησή της στην μονάδα επώασης του οργάνου. Ακολουθεί η παρακολούθηση της ανάπτυξης σε κάθε υποδοχή της κάρτας ανά 15min όπου μετράται ο φθορισμός, η θολερότητα και το χρώμα. Ο προσδιορισμός των MIC ολοκληρώνεται σε 4-18 ώρες. Παράλληλα γίνεται επαγωγή των αποτελεσμάτων για 4-10 επιπλέον αντιβιοτικά και τα αποτελέσματα που παίρνουμε είναι για 23-30 αντιβιοτικά ανά κάρτα.

Ενσωματωμένο στο σύστημα Vitek 2 είναι το προηγμένο σύστημα εμπειρογνομόνων Advanced Expert System (AES™), ένα λογισμικό το οποίο επικυρώνει και ερμηνεύει τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας, και ανιχνεύει μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά. Το σύστημα AES είναι το πιο ανεπτυγμένο σύστημα λογισμικού

σε αυτόν τον τομέα, και είναι ικανό να ανιχνεύσει ακόμα και αναδυόμενη και χαμηλού επίπεδου αντοχή.

I.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

I.3.1. Εξαγωγή του γενωμικού DNA (DNA extraction)

Η PCR εκτελείται σε γενωμικό DNA των μικροβίων. Αυτό πρέπει αρχικά να εξαχθεί από τα μικροβιακά κύτταρα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η διαδικασία βρασμού, που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην μοριακή βακτηριολογία, καθώς είναι ταχεία, οικονομική και αποδίδει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για την εξαγωγή του γενετικού υλικού των μικροβίων χρησιμοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες των στελεχών που επωάστηκαν 24 ώρες σε αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια έγινε αραίωση μίας αποικίας από κάθε στέλεχος σε 0.5 ml αποσταγμένου νερού, θέρμανση στους 37 °C στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 14 000 στροφές για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του ιζήματος, πήραμε το απομονωμένο DNA των στελεχών.

I.3.2. Βασικές αρχές της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR χρησιμοποιείται για να ενισχύσει ένα συγκεκριμένο τμήμα δίκλωνου DNA ή cDNA το οποίο είναι εντοπισμένο ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας βάσεων εκατέρωθεν της διπλής έλικας. Χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια που δεν είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους και ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί των περιοχών γνωστής αλληλουχίας στα άκρα του τμήματος του δίκλωνου DNA και έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

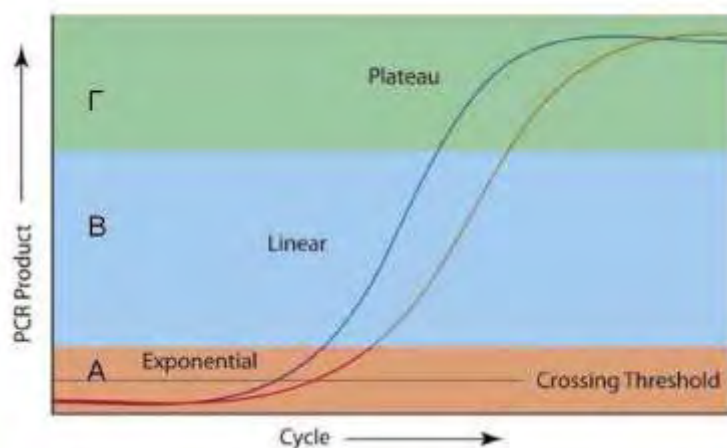
Η πορεία της ενίσχυσης του τμήματος του DNA ξεκινά με την αποδιάταξή του σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία μοριακής περίσσειας των ολιγονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων τριφωσφο- δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε καθορισμένη θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές δεσμεύονται επάνω στις αλληλουχίες-στόχους. Οι εκκινητές προεκτείνονται με τη δράση μίας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης κατά μήκος του τμήματος του DNA. Ο κύκλος της αποδιάταξης και της αναδιάταξης επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε φορά τα προϊόντα του ενός κύκλου αποτελούν μητρικά τμήματα για τα επόμενα, διπλασιάζοντας σε κάθε κύκλο το ποσό του επιθυμητού προϊόντος. Το επιθυμητό προϊόν που μπορεί να πολλαπλασιασθεί καλό είναι να μην υπερβαίνει τις 1000-1300 βάσεις.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (Εικόνα 9Α).

Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων (Εικόνα 9Β).

Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Εικόνα 9Γ) (**Applied Biosystems**).



Εικόνα 9: Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (VanGuilder *et al*, 2008).

1.3.3. Συνθήκες αντίδρασης

Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι θερμοανθεκτική και απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polymerase) (Chien *et al*, 1976). Το συγκεκριμένο ένζυμο διατηρεί τη δραστηριότητά του σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτή της αποδιάταξης του δίκλωνου DNA, και δεν χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο.

Η θερμοκρασία αναδιάταξης παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες η ειδικότητα της ενίσχυσης αυξάνεται, ενώ η απόδοση της μεθόδου μειώνεται. Επίσης, ο χρόνος προέκτασης των ολιγονουκλεοτιδίων εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος που ενισχύεται. Όσο μεγαλύτερο είναι το επιθυμητό προϊόν τόσο μεγαλύτερο χρόνο χρειάζεται για να συντεθεί ολόκληρη η αλληλουχία του προϊόντος.

Μία ποσότητα (5 μ l) του cDNA προστέθηκε σε ένα τελικό όγκο 45 μ l PCR μίγματος, που περιείχε: 10xPCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 100 nM του κάθε εκκινητή και 5 U Taq DNA polymerase (Dupre *et al*, 2003).

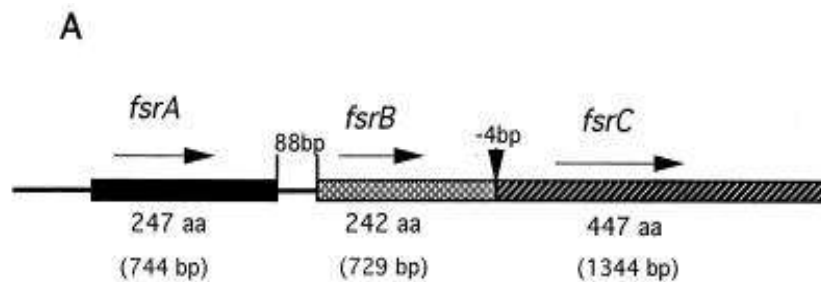
Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε η παρουσία των γονιδίων αντοχής στη βανκομυκίνη *vanA* και *vanB* και τα γονίδια παθογονικότητας *esp* και *fsrB*. Τα γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη *vanA* και *vanB* ανιχνεύθηκαν με τη χρήση εκκινητών (Πίνακας 7), όπως περιγράφεται από τους Dutka-Malen και συν. (Dutka-Malen *et al*, 1995).

Σχετικά με το γονίδιο *esp*, εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε ένα ανθεκτικό στη γενταμικίνη, ισχυρά λοιμογόνο κλινικό στέλεχος *E. faecalis*, το MMH594, που προκάλεσε μία νοσοκομειακή επιδημία στα μέσα της δεκαετίας του 1980 (Huyscke *et al*, 1991). Αργότερα βρέθηκε να εντοπίζεται σε ένα μεγάλο νησίδιο (153-kb) παθογονικότητας στο ίδιο είδος (Shankar *et al*, 1999). Ένα ομόλογο του *esp* έχει αναγνωρισθεί και στον *E. faecium* (Eaton & Gasson, 2002). Η έκφραση του γονιδίου *esp* αυξάνει σημαντικά την υδροφοβικότητα στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων και την προσκόλληση σε ένα υπόστρωμα (Shankar *et al*, 1999). Στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium* που απομονώνονται από θέσεις λοίμωξης συχνά φέρουν το νησίδιο παθογονικότητας που περιέχει το γονίδιο *esp*.

Η ανίχνευση του γονιδίου *esp* έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Esp 11 και Esp 12 (Πίνακας 7) που αντιστοιχούν στις θέσεις των νουκλεοτιδίων 1217–1238 και 2149–2171, αντίστοιχα, στο N-τελικό τμήμα του *esp* (Van Wamel *et al*, 2007). Οι συνθήκες του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι ακόλουθες: θέρμανση στους 95 °C για 10 λεπτά, 40 κύκλοι των 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, 60 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 2 λεπτά και μία τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Σχετικά με το γονίδιο *fsrB*, περιγράφηκε αρχικά από τους Qin *et al.*, οι οποίοι χαρακτήρισαν τρία γονίδια στο οπερόνιο *fsr*, (Qin *et al*, 2001) τα *fsrA*, *fsrB*, και *fsrC* (Εικόνα 10). Οι ίδιοι ερευνητές χρησιμοποιώντας σε μία μελέτη ένα στέλεχος με μετάλλαξη του *fsrB*, έδειξαν ότι η παρουσία του *fsrB* γονιδίου είναι επαρκής ένδειξη της

παρουσίας και έκφρασης του οπερονίου (**Mylonakis et al, 2002, Nakayama et al, 2001**). Η έκφραση των γονιδίων του οπερονίου *fsr* στο στέλεχος *E. faecalis* OG1RF εξαρτάται από την πυκνότητα των μικροβιακών κυττάρων (**Garsin et al, 2001, Mylonakis et al, 2002**). Το σύστημα αίσθησης απαρτίας του Fsr του *Enterococcus faecalis* έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει το σχηματισμό βιομεμβράνης μέσω της παραγωγής της ζελατινάσης, αλλά ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος μέχρι σήμερα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η φερομόνη που ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση της ζελατινάσης κωδικοποιείται από το τμήμα 3' του *fsrB*, στην ομάδα γονιδίων του *fsr* (**Garsin et al, 2001, Mylonakis et al, 2002, Nakayama et al, 2001**).



Εικόνα 10: Απεικόνιση της ομάδας γονιδίων του οπερονίου *fsr*. Αναγράφονται τα μεγέθη των γονιδίων.

Το γονίδιο *fsrB* καθορίστηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *fsrBF1* and *fsrBF2* (Πίνακας 7) (**Klibi et al, 2007**). Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν 5 λεπτά λύσης και αποδιάταξης στους 95 °C, 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδίωσης και προέκτασης στους 94 °C (30 δευτερόλεπτα), 60 °C (30 δευτερόλεπτα) και 72 °C (2.5 λεπτά) αντίστοιχα και μία τελική προέκταση (10 λεπτά) στους 72 °C (**Toledo-Arana et al, 2001**).

Πίνακας 7: Οι εκκινητές και οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων τους.

Γονίδιο	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5'→3')
<i>esp</i>	Esp 11	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC
	Esp 12	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA
<i>fsrb</i>	fsrBF1	GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAAC
	fsrBF2	TTGGTACCCACACCATCACTGACTTTT
<i>vanA</i>	A ₁	GGGAAAACGACAATTGC
	A ₂	GTACAATGCGGCCGTTA
<i>vanB</i>	B ₁	ATGGGAAGCCGATAGTC
	B ₂	GATTTCGTTCCCTCGACC

I.4. Μέθοδοι ηλεκτροφόρησης

Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, τα φορτισμένα μόρια κινούνται προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου υπό την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Η ηλεκτροφόρηση του DNA μπορεί να γίνει σε αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο ή σύνθετο gel αγαρόζης-ακρυλαμίδης. Η πιο κοινή εφαρμογή είναι ο διαχωρισμός του δίκλωνου DNA σε ουδέτερα ως προς το pH τμήματα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο έτσι ώστε τα τμήματα που φορτώθηκαν στο καθοδικό (-) άκρο του gel κινούνται στο gel κατά την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μεγάλων τμημάτων του DNA εξαρτάται από το μέγεθός τους και είναι ανεξάρτητη από την αλληλουχία των βάσεων. Η ηλεκτροφόρηση συμβαίνει σε θερμοκρασία δωματίου. Αν το gel υπερθερμανθεί, τότε οι σειρές του DNA εμφανίζονται παραμορφωμένες. Η παρεχόμενη θερμότητα εξαρτάται από τις διαστάσεις του gel και το ρεύμα. Γενικά, μεγάλα

τμήματα DNA διαλύονται ευκολότερα, στην ηλεκτροφόρηση μεγάλης διάρκειας και χαμηλής τάσης.

Στην παρούσα μελέτη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόστηκε η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Όλες οι ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης πραγματοποιήθηκαν σε πήκτωμα 1.8% και σε 0.5x ρυθμιστικό διάλυμα βορικών-EDTA (TBE). Η διαφορά δυναμικού που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 120 V για χρονικό διάστημα 1 h.

Πίνακας 8: Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA σε πηκτώματα που περιέχουν διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης (Lumpkin, 1989).

Περιεκτικότητα αγαρόζης (%w/v)	Απόδοση εύρους διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση.

I.5. Έλεγχος της παραγωγής αιμολυσίνης

Το αιματούχο άγαρ είναι το καταλληλότερο θρεπτικό υλικό για τον έλεγχο της παραγωγής αιμολυσίνης. Τα συστατικά που περιέχει το αιματούχο άγαρ είναι:

A. Beef Extract 10g

Peptone 10g

Sodium Chloride 5g

Agar 15g

D.W. 950ml

B. Στείρο απινιδωμένο αίμα: Συλλέγεται με άσηπτες συνθήκες αίμα μέσα σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη με εσφυρισμένα τα τοιχώματα του λαιμού και πώμα, η οποία περιέχει γυάλινα σφαιρίδια. Η φιάλη αναταράσσεται δυνατά για να καταστραφούν τα πλέγματα ινικής του αίματος.

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος A διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH (pH: 7.2 ± 0.2), κατανέμεται σε φιάλες σε καθορισμένους όγκους και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 min. Μετά την αποστείρωση, όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ προσθέτονται ασήπτως 50 ml απινιδωμένο αίμα σε 950 ml βασικού υποστρώματος. Το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20 ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους υποβάλλονται υποχρεωτικά σε 24ωρη δοκιμαστική επώαση για έλεγχο στειρότητας. Η αιμόλυση μπορεί να γίνει σαφέστερα αντιληπτή εάν ο πυθμένας των τρυβλίων καλυφθεί με λεπτό στρώμα θρεπτικού άγαρ προτού κατανεμηθεί το αιματούχο άγαρ (**Difco Manual, 1984**).

Η παραγωγή της αιμολυσίνης υποδείχθηκε, από το σχηματισμό διαυγών ζωνών β-αιμόλυσης (Εικόνα 11) που περιέβαλλαν τις αποικίες σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ, τα οποία παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας αιματούχο άγαρ Columbia με 5% ανθρώπινο

αίμα. Τα τριβλία επωάστηκαν στους 37°C και εξετάστηκαν μετά από 24 και 48 ώρες (Franz *et al*, 2001).



Εικόνα 11: β-αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ και συγκρινόμενη με την α- και τη γ-αιμόλυση.

I.6. Έλεγχος της παραγωγής ζελατινάσης

Ο προσδιορισμός μιας μεταλλοπρωτεάσης 28-32 kDa του *E. faecalis* περιγράφηκε 30 χρόνια πριν (Bleiweis *et al*, 2001). Το 1989 οι Makinen και οι συνεργάτες (Mäkinen *et al*, 1989) δημοσίευσαν μια περιγραφή της ζελατινάσης που παράγεται από το στέλεχος *E. faecalis* OG1-10, που απομονώθηκε από ανθρώπους. Το ένζυμο ήταν μια εξωκυττάρια ενδοπεπτιδάση (μεταλλοπρωτεάση 2, μικροβιακή πρωτεϊνάση, EC 3.4.24.4) ικανή για υδρόλυση ζελατίνης, κολλαγόνου, καζεΐνης, αιμοσφαιρίνης, και άλλων μικρών βιολογικά ενεργών πεπτιδίων. Οι Su και οι συνεργάτες (Su *et al*, 1991) ανέφεραν την αλληλουχία του γονιδίου της ζελατινάσης, *gelE*, που κωδικοποιεί ένα προζυμογόνο με ώριμο μοριακό βάρος 34.582. Η παραγωγή ζελατινάσης ανιχνεύτηκε εύκολα από αυτές τις έρευνες χρησιμοποιώντας ημιστερεά μέσα εμπλουτισμένα με 3% ζελατίνη ή 1.5% αποβουτυρωμένο γάλα (Su *et al*, 1991).

Για τον έλεγχο της παραγωγής ζελατινάσης από τα στελέχη εντεροκόκκων χρησιμοποιήθηκε Todd-Hewitt άγαρ. Ο ζωμός Todd-Hewitt συνιστάται για την καλλιέργεια των στρεπτόκοκκων και άλλων απαιτητικών μικροοργανισμών (**Todd & Hewitt, 1932**). Αναπτύχθηκε αρχικά για τον έλεγχο παραγωγής της στρεπτοκοκκικής αιμολυσίνης. Ο ζωμός τροποποιήθηκε από τους Updyke και Nickle και χρησιμοποιείται κατά προτίμηση για την καλλιέργεια β-αιμολυτικών στελεχών (**Updyke & Nickle, 1954**). Το θρεπτικό αυτό υλικό συνιστάται επίσης ως ένα μέσο εμπλουτισμού για τον διαχωρισμό των στρεπτόκοκκων ομάδας Α και Β.

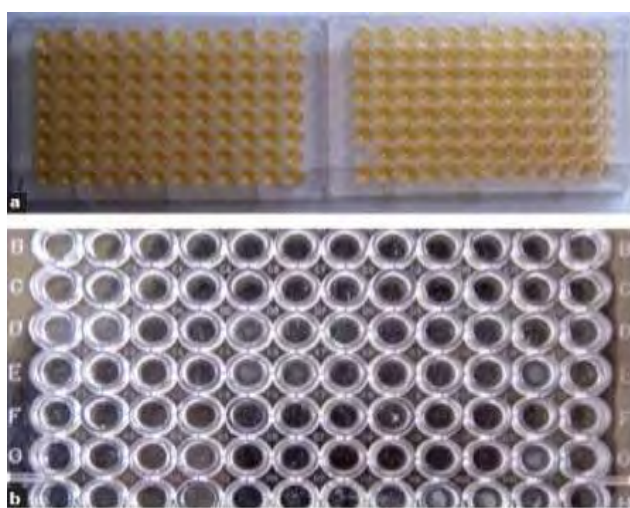
Η πεπτόνη και το Beef Heart infusion παρέχουν άζωτο, βιταμίνες, μέταλλα και αμινοξέα που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη. Το φωσφορικό δινάτριο και το ανθρακικό νάτριο λειτουργούν σαν buffer για να αποτρέψουν την καταστροφή της αιμολυσίνης από το οξύ που παράγεται μέσω της ζύμωσης των υδατανθράκων. Η δεξτρόζη αποτελεί πηγή άνθρακα και ενέργειας και το χλωριούχο νάτριο διατηρεί την οσμωτική ισορροπία του μέσου. Για την προετοιμασία του Todd-Hewitt άγαρ, προσθέτουμε 13 με 15 g/l άγαρ στο ζωμό Todd-Hewitt και αποστειρώνουμε.

Ο έλεγχος για την παραγωγή ζελατινάσης πραγματοποιήθηκε σε τριβλία με Todd-Hewitt άγαρ που περιείχαν ζελατίνη 3% (30 g / L). Μετά από ολονύκτια επώαση στους 37 ° C, τα τριβλία αφέθηκαν να κρυώσουν για 5 ώρες στους 4°C. Η υδρόλυση της ζελατίνης καθορίστηκε ελέγχοντας τα τριβλία για την εμφάνιση ενός θολού φωτοστέφανου γύρω από τις αποικίες (**Hancock & Perego, 2004**).

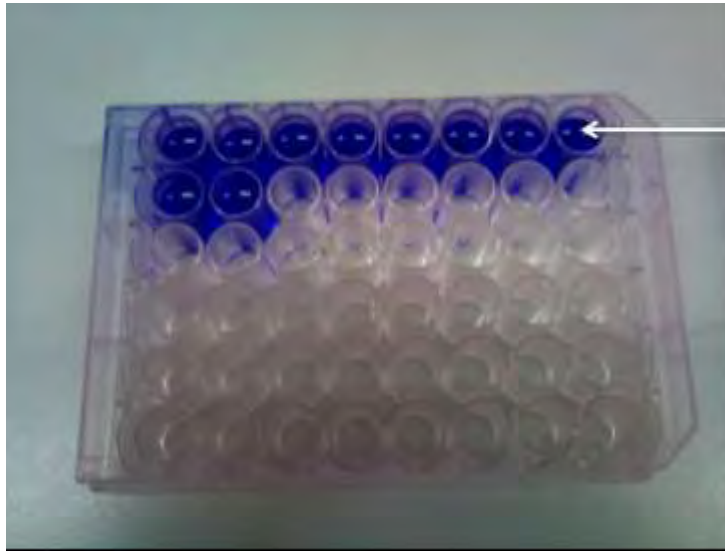
I.7. Έλεγχος της παραγωγής βιομεμβράνης

Για τον έλεγχο της παραγωγής βιομεμβράνης, χρησιμοποιήθηκε μία ποσοτική μέθοδος μικροτιτλοποίησης πλακών που έχει περιγραφεί και προηγουμένως (**Baldassari et al, 2001**). Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με αραιώση 1:10 από ανακαλλιέργειες των μικροβίων

από την προηγούμενη νύχτα σε ζωμό TSB (Tryptone Soy Broth). Στη συνέχεια 200 μl από τις αραιωμένες υγρές καλλιέργειες εμβολιάστηκαν σε πηγαδάκια (wells) μικροπλακών πολυστυρενίου (Εικόνα 12). Μετά από επώαση 24 ωρών στους 37 °C, οι μικροπλάκες πλύθηκαν απαλά τρεις φορές με PBS (phosphate-buffered saline). Η προσκολλημένη βακτηριακή μεμβράνη έμεινε για να στεγνώσει για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν χρωματίστηκε με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους 0.2% για 15 λεπτά (Εικόνα 13). Μετά από απαλό πλύσιμο των μικροπλακών με PBS, το δεσμευμένο στη βιομεμβράνη κρυσταλλικό ιώδες εξήχθη προσθέτοντας στα πηγαδάκια 200 μl διαλύματος οξείκου οξέος (Εικόνα 14) και η απορρόφηση (OD) του εξαχθέντος κρυσταλλικού ιώδους μετρήθηκε στα 595 nm σε ένα αυτόματο φασματοφωτόμετρο. Η ικανότητα παραγωγής βιομεμβρανών βαθμολογήθηκε ως εξής (Baldassari et al., 2001): $OD < 0.120$, μη παραγωγή βιομεμβράνης, $0.120 < OD < 0.240$, ασθενής παραγωγή, $OD > 0.240$, ισχυρή παραγωγή βιομεμβράνης. Σαν κοντρόλ μετρήθηκε η απορρόφηση του δεσμευμένου στις μικροπλάκες κρυσταλλικού ιώδους σε πηγαδάκια που εκτέθηκαν μόνο σε μέσο χωρίς μικρόβια. Οι μετρήσεις των βιομεμβρανών πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές για κάθε στέλεχος.



Εικόνα 12: (a) Καλλιέργειες των μικροβίων σε ζωμό TSB μετά από αραιώση εμβολιάστηκαν σε πηγαδάκια μικροπλακών πολυστυρενίου. (b) Η προσκολλημένη βακτηριακή μεμβράνη έμεινε για να στεγνώσει για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.



Διάλυμα
κρυσταλλικού
ιώδους 0.2%

Εικόνα 13: (c) Προσθήκη στις μικροπλάκες διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους 0.2% για 15 λεπτά.



Εικόνα 14: (d) Το δεσμευμένο στη βιομεμβράνη κρυσταλλικό ιώδες εξήχθη προσθέτοντας στα πηγαδάκια 200 μ l διαλύματος οξεϊκού οξέος και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση του (OD) στα 595 nm σε ένα αυτόματο φασματοφωτόμετρο.

I.8. Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS v.15. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm ΣΑ (σταθερή απόκλιση). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τις μεθόδους T-test, *non Parametric Mann-Whitney U test*, *Crosstabs Chi-square*, *Fischer's exact test* και *Spearman test*. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε σαν στατιστικά σημαντική.

II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

II.1. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών *E. faecium*

Παρατηρήθηκε συχνή εμφάνιση αντοχής στην αμπικιλίνη στα κλινικά στελέχη *E. faecium* (84.6%) και στα στελέχη από κόπρανα ασθενών (93.6%) ενώ από την άλλη λιγότερα στελέχη από ζώα (25.0%) ήταν ανθεκτικά. Μόνο 3.1% από τα στελέχη που προέρχονταν από ζώα παρουσίασε αντοχή στη βανκομυκίνη, σε σύγκριση με υψηλό ποσοστό των κλινικών δειγμάτων και των δειγμάτων από κόπρανα ασθενών (84.6% και 93.6% αντίστοιχα).

Το 1.9% των στελεχών από κλινικά δείγματα εμφάνισαν αντοχή στη τιγκεκυκλίνη ενώ από την άλλη μεριά όλα τα στελέχη από κόπρανα ανθρώπων και ζώων ήταν ευαίσθητα. Διαπιστώθηκε υψηλού επιπέδου αντοχή στη γενταμικίνη σε 23.1%, 17.0% και 18.8% των στελεχών *E. faecium* από κλινικά δείγματα, ανθρώπινα κόπρανα και ζώα, αντίστοιχα. Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός των κλινικών στελεχών και των στελεχών

από κόπρανα ανθρώπων (15.4 και 8.5% αντίστοιχα) ήταν ανθεκτικά στη λινεζολίδη ενώ όλα τα ζωϊκά στελέχη ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό αυτό (Πίνακας 9).

Π.2. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών *E. faecalis*

Όσο αφορά τους *E. faecalis*, 16.4% των κλινικών στελεχών, 14.3% των στελεχών από κόπρανα ανθρώπων και το 3.8% των στελεχών από ζώα ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη. Αντοχή στη βανκομυκίνη παρατηρήθηκε σε ένα μικρό αριθμό στελεχών *E. faecalis* από ζώα (2.6%) και από ανθρώπινα δείγματα (9.8% των κλινικών δειγμάτων και 28.6% των στελεχών από κόπρανα).

Στο 1.6% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* και στο 1.3% των στελεχών από ζώα εντοπίστηκε αντοχή στην τιγκεκυκλίνη, ενώ από την άλλη κανένα από τα στελέχη από κόπρανα ασθενών δεν ήταν ανθεκτικό σε αυτό το αντιβιοτικό. Υψηλού επιπέδου αντοχή στη γενταμικίνη εμφάνισαν το 49.2%, 19.2% και 28.6% των στελεχών *E. faecalis* από κλινικά δείγματα, από ζώα και από ανθρώπινα κόπρανα, αντίστοιχα. Μόνο 1.6% των στελεχών από κλινικά δείγματα και 1.3% των στελεχών από ζώα εμφάνισαν αντοχή στη λινεζολίδη, ενώ όλα τα στελέχη *E. faecalis* από κόπρανα ασθενών ήταν ευαίσθητα (Πίνακας 9).

Δεν μπορεί να γίνει σύγκριση διαφοράς στην αντοχή ανάμεσα στα δύο Νοσοκομεία επειδή από το Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων στα πλαίσια επιτήρησης για εντερόκοκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη (VRE).

Πίνακας 9: Ποσοστά αντοχής στελεχών εντεροκόκκων από ανθρώπους και από ζώα σε διάφορα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (AMP), βανκομυκίνη (VA), τιγκεκυκλίνη (TGC), γενταμικίνη (GM) (HLR: υψηλού βαθμού αντοχή), λινεζολίδη (LZ).

Εντεροκοκκικά στελέχη (n)	n (%) των στελεχών που εμφάνισαν αντοχή				
	AMP	VA	TGC	HLGM	LZ
<i>E. faecium</i>					
κλινικά δείγματα (52)	44 (84.6)	44 (84.6)	1(1.9)	12 (23.1)	8 (15.4)
κόπρανα ασθενών (94)	88 (93.6)	88 (93.6)	0	16 (17.0)	8 (8.5)
κόπρανα ζώων (32)	8 (25.0)	1 (3.1)	0	6 (18.8)	0
<i>E. faecalis</i>					
κλινικά δείγματα (61)	10 (16.4)	6 (9.8)	1(1.6)	30 (49.2)	1 (1.6)
κόπρανα ασθενών (7)	1 (14.3)	2 (28.6)	0	2 (28.6)	0
κόπρανα ζώων (78)	3 (3.8)	2 (2.6)	1(1.3)	15 (19.2)	1 (1.3)

Π.3. Ανίχνευση των γονιδίων *vanA* και *vanB*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR, στο σύνολο των εντεροκοκκικών στελεχών ανιχνεύθηκε μόνο το γονίδιο *vanA* (Πίνακας 10). Στους εντερόκοκκους που απομονώθηκαν από ανθρώπινα δείγματα το γονίδιο *vanA* ανιχνεύθηκε πιο συχνά σε στελέχη *E. faecium* από ότι σε *E. faecalis* γεγονός που αποδίδεται στο ότι τα περισσότερα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη αναφέρονται παγκόσμια ότι είναι *E. faecium*.

Η επίπτωση των *vanA* στα στελέχη από τα κόπρανα ζώων ήταν χαμηλή, λόγω του πολύ χαμηλού αριθμού των VRE στα ζωικά δείγματα.

Πίνακας 10: Συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου *vanA* σε ανθρώπινα και ζωϊκά εντεροκοκκικά στελέχη ανάλογα με την προέλευση των στελεχών.

Προέλευση των στελεχών	Γονίδιο <i>vanA</i>
(n)	n (%)
<i>E. faecium</i>	
κλινικά δείγματα (52)	44 (84.6 %)
κόπρανα ασθενών (94)	88 (93.6 %)
κόπρανα ζώων (32)	1 (3.1 %)
<i>E. faecalis</i>	
κλινικά δείγματα (61)	6 (9.8 %)
κόπρανα ασθενών (7)	2 (28.6 %)
κόπρανα ζώων (78)	2 (2.6 %)

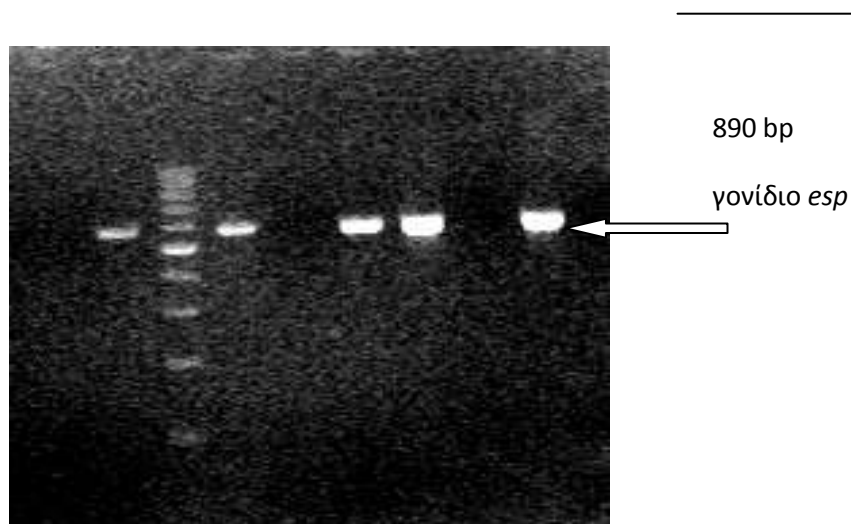
Τα υπόλοιπα πέντε ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη (1 από ζωϊκά δείγματα και 4 από δείγματα από ανθρώπους) δεν ελέχθηκαν για την παρουσία των *vanA* και *vanB* επειδή ήταν στελέχη *E. gallinarum* που έχουν ενδογενή αντοχή στη βανκομυκίνη.

Π.4. Ανίχνευση του γονιδίου *esp*

Όσον αφορά τους *E. faecalis*, 52.5% των κλινικών στελεχών ήταν θετικά για το *esp* όντας παρόμοια με τα θετικά για το *esp* (71.4 %) στελέχη *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα ($P = 0.442$). Αντίθετα, σημαντικά λιγότερα (10.3%) ζωϊκά στελέχη *E. faecalis* έφεραν το γονίδιο *esp* σε σύγκριση με τα ανθρώπινα θετικά για *esp* στελέχη *E. faecalis* από κλινικά δείγματα και από ανθρώπινα κόπρανα ($P < 0.0001$ και $P = 0.001$ αντίστοιχα) (Πίνακας 11).

Στους *E. faecium*, το γονίδιο *esp* εντοπίστηκε σε 69.2% των κλινικών στελεχών, σε σύγκριση με 38.3% των στελεχών από ανθρώπινα κόπρανα (P 0.005), ενώ μόνο 3.1% των ζωικών στελεχών έφερε το *esp* και αυτό το ποσοστό ήταν σημαντικά χαμηλότερο, συγκρινόμενο με τα ποσοστά των θετικών για *esp E. faecium* από κόπρανα ασθενών και από κλινικά δείγματα ($P < 0.0001$ και στις δύο περιπτώσεις) (Πίνακας 11).

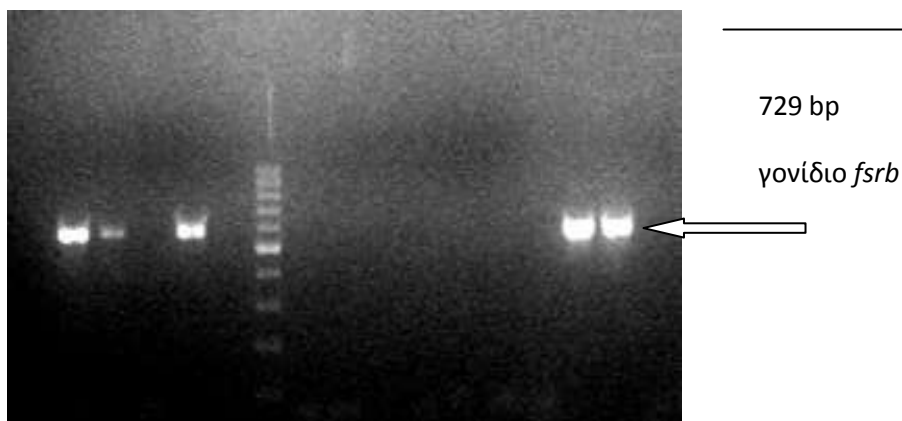
Συνολικά, τα ποσοστά των στελεχών που έφεραν το γονίδιο *esp* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ *E. faecium* και *E. faecalis* ανεξάρτητα από το αν τα στελέχη ανακτήθηκαν από κλινικά δείγματα, από ανθρώπινα κόπρανα και από κόπρανα ζώων (P 0.159, P 0.124 και P 0.28, αντίστοιχα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ένα από τα τέσσερα ανθρώπινα στελέχη *Enterococcus gallinarum* που ελέγχθηκαν βρέθηκε θετικό για το *esp*, για πρώτη φορά σε αυτό το είδος, ενώ κανένα από τα 18 ζωικά *E. gallinarum* που ελέγχθηκαν δεν έφερε το *esp*.



Εικόνα 15: Αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο *esp* σε πήκτωμα αγαρόζης 1.8%.

II.5. Ανίχνευση του γονιδίου *fsrb*

Το γονίδιο *fsrb* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα κλινικά στελέχη *E. faecium* και εντοπίστηκε σε 21.3% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* και σε 1.1% των *E. faecium* και 14.3% των *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα. Αυτό το γονίδιο ήταν σημαντικά πιο συχνό στα ζωϊκά *E. faecium* (12.5%) σε σύγκριση με τα κλινικά και τα στελέχη *E. faecium* από ανθρώπινα κόπρανα (P 0.019 και P 0.015 αντίστοιχα), ενώ η συχνότητα του *fsrb* στα ζωϊκά στελέχη *E. faecalis* (19.2%) ήταν παρόμοια με αυτή των *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα και από κλινικά δείγματα (P 1.000 και P 0.928, αντίστοιχα) (Πίνακας 11). Κανένα από τα τέσσερα ανθρώπινα στελέχη *E. gallinarum* που ελέγχθηκαν και δύο από τα 18 (11.1%) ζωϊκά στελέχη *E. gallinarum* έφεραν το γονίδιο *fsrb*.



Εικόνα 16: Αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο *fsrb* σε πήκτωμα αγαρόζης 1.8%.

II.6. Ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης

Τα στελέχη *E. faecalis* από κλινικά δείγματα και από κόπρανα ασθενών παρουσίασαν μεγάλη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης με 75.4% και 71.4% των στελεχών, αντίστοιχα, να δείχνουν ισχυρή ή αδύναμη παραγωγή βιομεμβράνης. Επίσης, από τα

ανθρώπινα στελέχη *E. faecium* το 71.1% από τα κλινικά στελέχη και το 64.9% από τα στελέχη από κόπρανα, σχημάτισαν βιομεμβράνες. Τα ζωϊκά στελέχη εμφάνισαν σημαντικά μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης (29.5% των ζωϊκών στελεχών *E. faecalis*, 34.4% των ζωϊκών *E. faecium* και 36.8% των ζωϊκών *E. gallinarum*) σε σύγκριση με τα στελέχη από κλινικά δείγματα και από κόπρανα ασθενών ($P < 0.0001$ τόσο στα *E. faecalis* όσο και στα *E. faecium*, (Πίνακας 11). Από την άλλη μεριά, δεν υπήρχε καθόλου στατιστικά σημαντική διαφορά στην ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης μεταξύ των κλινικών στελεχών *E. faecalis* και των στελεχών *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα αλλά ούτε και μεταξύ των κλινικών στελεχών *E. faecium* και των στελεχών *E. faecium* από ανθρώπινα κόπρανα ($P 1.000$ και $P 0.345$, αντίστοιχα).

Πίνακας 11: Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων *esp* και *fsrb* και παραγωγής βιομεμβράνης σε ανθρώπινα και ζωϊκά εντεροκοκκικά στελέχη ανάλογα με την προέλευση των στελεχών.

Προέλευση των στελεχών	Γονίδιο <i>esp</i>	Γονίδιο <i>fsrb</i>	Παραγωγή biofilm
(n)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E. faecium</i>			
κλινικά δείγματα (52)	36 (69.2 %)	0	37 (71.1 %)
κόπρανα ασθενών (94)	36 (38.3 %)	1 (1.1 %)	61 (64.9 %)
κόπρανα ζώων (32)	1 (3.1 %)	4 (12.5 %)	11 (34.4 %)
<i>E. faecalis</i>			
κλινικά δείγματα (61)	32 (52.5 %)	13 (21.3 %)	46 (75.4 %)
κόπρανα ασθενών (7)	5 (71.4 %)	1 (14.3 %)	5 (71.4 %)
κόπρανα ζώων (78)	8 (10.3 %)	15 (19.2 %)	23 (29.4 %)

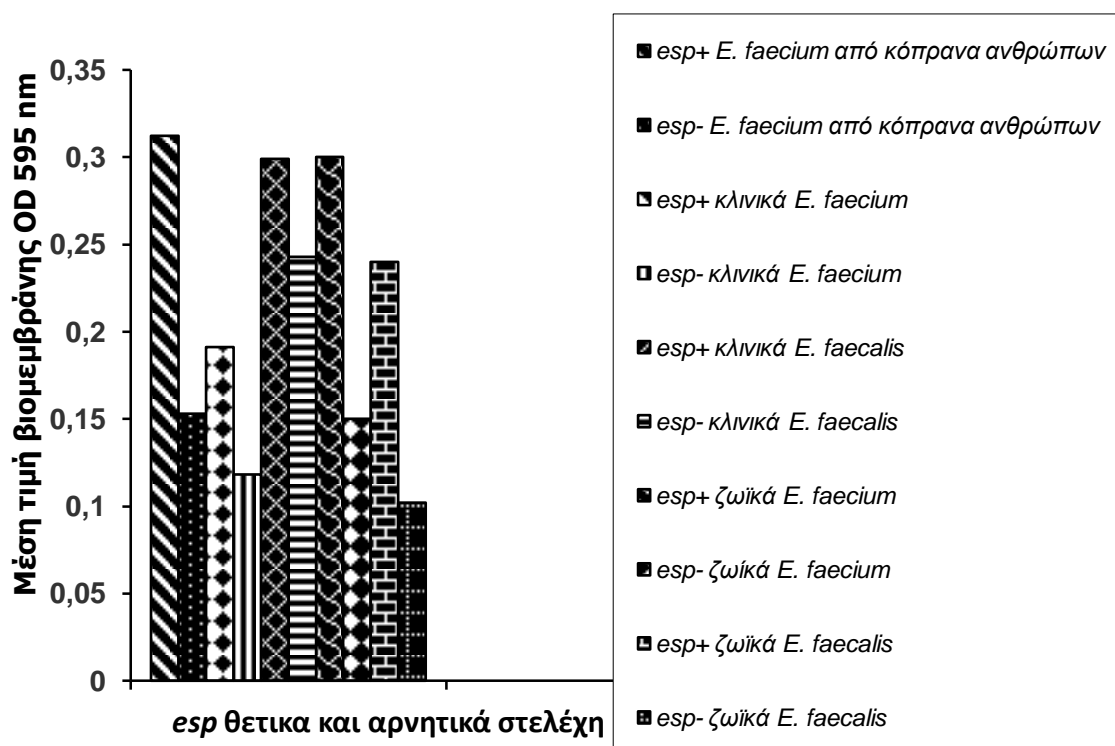
Π.7. Συσχέτιση της παραγωγής βιομεμβράνης με την παρουσία του γονιδίου *esp*

Ένα ποσοστό 83.8% από τα κλινικά στελέχη *E. faecium* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη έφεραν το γονίδιο *esp*, σε σύγκριση με 26.7% από τα στελέχη που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνη ($P < 0.0001$). Επιπροσθέτως, χρησιμοποιώντας T-test βρήκαμε ότι τα κλινικά *E. faecium* που ήταν θετικά για το *esp* παράγαγαν υψηλότερη μέση τιμή βιομεμβράνης (0.191 ± 0.082) από ότι τα στελέχη που ήταν αρνητικά για το *esp* (0.118 ± 0.092) ($P 0.007$). Παρομοίως, το 60.9% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη και το 26.7% από τα στελέχη που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνη έφεραν το γονίδιο *esp* ($P 0.045$). Μη σημαντική διαφορά της μέσης τιμής της παραγόμενης βιομεμβράνης βρέθηκε μεταξύ των *esp*-θετικών και *esp*-αρνητικών κλινικών στελεχών *E. faecalis* ($P 0.316$).

Ανάμεσα στα *E. faecium* από κόπρανα ασθενών, το 61.9% από τα στελέχη που σχημάτιζαν βιομεμβράνη και κανένα από τα στελέχη που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη έφεραν το γονίδιο *esp*, ($P < 0.0001$). Τα *esp*-θετικά στελέχη *E. faecium* από κόπρανα ασθενών βρέθηκαν να παράγουν υψηλότερη μέση τιμή βιομεμβράνης (0.312 ± 0.181) από τα *esp*-αρνητικά (0.153 ± 0.152) ($P < 0.0001$, Εικόνα 17). Όσο αφορά τα στελέχη *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα που σχημάτιζαν βιομεμβράνες, το 83.3% έφερε το γονίδιο *esp*, σε σύγκριση με το 50% των στελεχών που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη ($P 0.464$). Ακόμη, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της βιομεμβράνης μεταξύ των στελεχών *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα που ήταν θετικά για το *esp* και αυτών που ήταν αρνητικά για το *esp* ($P = 0.737$).

Στα ζωϊκά στελέχη, 8.3% από τα *E. faecium* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη ήταν θετικά για το *esp*, ενώ κανένα από τα στελέχη *E. faecium* που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη δεν έφερε το γονίδιο ($P 0.375$). Επιπλέον, 30.4% από τα ζωϊκά *E. faecalis* που σχημάτιζαν

βιομεμβράνη ήταν *esp*-θετικά, ενώ μόνο 1.8% από τα στελέχη *E faecalis* που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη έφεραν το *esp* (P 0.001). Επιπλέον, τα ζωϊκά στελέχη *E faecalis* που βρέθηκαν θετικά για το *esp* παράγανε σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή βιομεμβράνης (0.240 ± 0.107) από ότι τα στελέχη που βρέθηκαν αρνητικά για το γονίδιο (0.102 ± 0.080) ($P < 0.0001$, Εικόνα 17). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά της μέσης τιμής της βιομεμβράνης μεταξύ των *esp*-θετικών και των *esp*-αρνητικών ζωϊκών στελεχών *E faecium* (P 0.213).



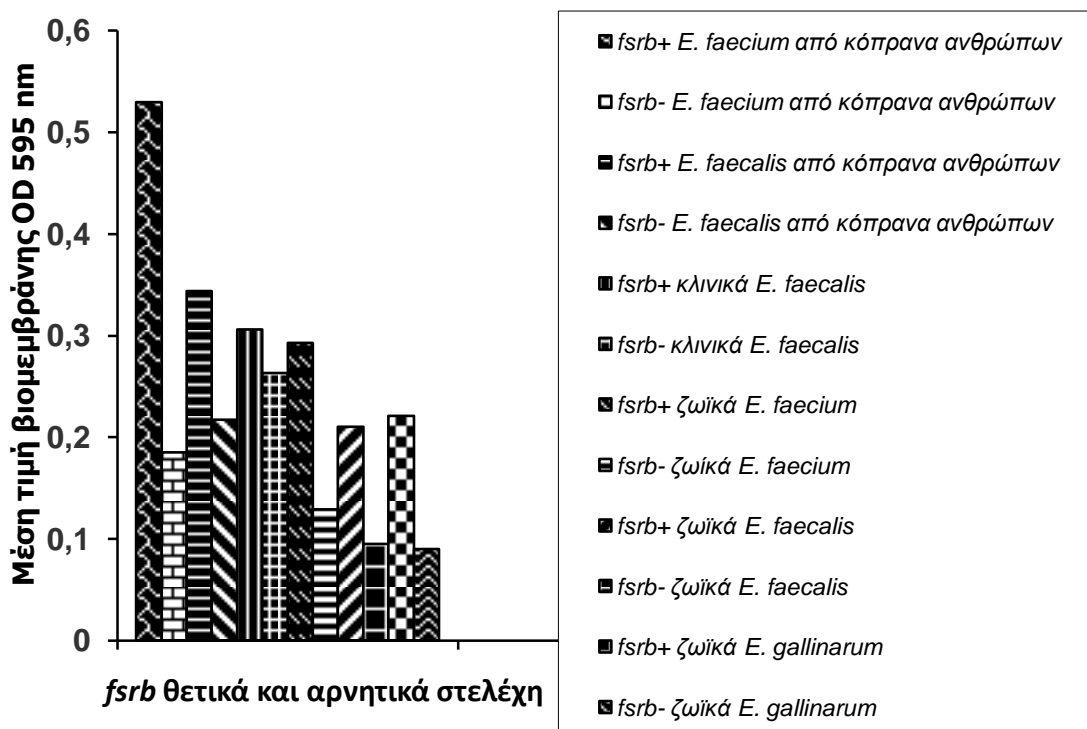
Εικόνα. 17: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης σε *esp*-θετικά και αρνητικά-στελέχη εντερόκοκκων.

Π.8. Συσχέτιση της παραγωγής βιομεμβράνης με την παρουσία του γονιδίου *fsrb*

Ανάμεσα στα κλινικά στελέχη όλα τα *E. faecium* ήταν αρνητικά για το γονίδιο *fsrb* ενώ από τα *E. faecalis*, το 26.1% των στελεχών που σχημάτιζαν βιομεμβράνη, συγκρινόμενο με 6.7% των στελεχών που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη, έφεραν το γονίδιο *fsrb* ($P = 0.156$).

Στα στελέχη από ανθρώπινα κόπρανα παρόμοια ποσοστά στελεχών *E. faecium* και *E. faecalis* που σχημάτιζαν και που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνες έφεραν το γονίδιο *fsrb* ($P = 1.000$). Τα θετικά για το *fsrb* στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* από κόπρανα ασθενών βρέθηκαν να παράγουν μη σημαντικά υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από ότι τα αρνητικά για το *fsrb* στελέχη ($P = 0.124$ και $P = 0.277$ αντίστοιχα).

Όσο αφορά τα ζωϊκά στελέχη 41.7% των στελεχών *E. faecium* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη και κανένα από τα στελέχη *E. faecium* που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνη έφεραν το γονίδιο *fsrb* ($P = 0.004$). Παρομοίως, το 56.5% των ζωϊκών *E. faecalis* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη και το 5.5% από τα ζωϊκά *E. faecalis* που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνες έφεραν το γονίδιο *fsrb* ($P < 0.0001$). Τα ζωϊκά στελέχη *E. faecium*, *E. faecalis* και *E. gallinarum* που βρέθηκαν θετικά για το *fsrb* παράγανε σημαντικά υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης (0.293 ± 0.043 , 0.210 ± 0.103 και 0.221 ± 0.045 , αντίστοιχα) από τα στελέχη που βρέθηκαν αρνητικά για το *fsrb* (0.129 ± 0.096 , 0.095 ± 0.076 και 0.090 ± 0.067 , αντίστοιχα) ($P = 0.001$, $P < 0.0001$ και $P = 0.017$, αντίστοιχα) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης σε *fsrb*-θετικά και αρνητικά στελέχη εντερόκοκκων.

Π.9. Παραγωγή αιμολυσίνης και ζελατινάσης και συσχέτιση με την παραγωγή βιομεμβράνης

Η παραγωγή αιμολυσίνης και ζελατινάσης από εντεροκοκκικά στελέχη από ανθρώπους και από ζώα, ανάλογα με την προέλευση τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Το ποσοστό των στελεχών *E. faecium* που παράγανε αιμολυσίνη ήταν γενικά χαμηλό και δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των *E. faecium* που ανακτήθηκαν από ανθρώπινα και από ζωικά δείγματα. Στους *E. faecalis*, παρόμοιες αναλογίες των κλινικών στελεχών και των στελεχών από κόπρανα ασθενών παράγανε αιμολυσίνη ($P 0.691$), ενώ τα ζωικά *E. faecalis*

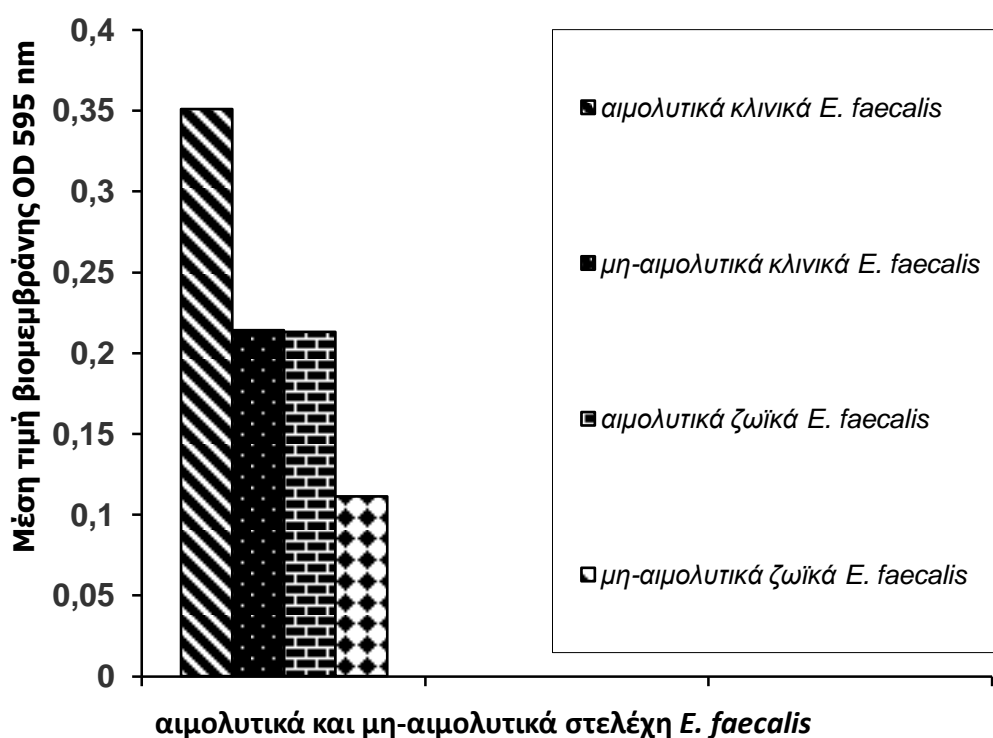
που παράγανε αιμολυσίνη ήταν σημαντικά λιγότερα σε σύγκριση με τα αιμολυτικά κλινικά στελέχη *E. faecalis* ($P < 0.0001$).

Πίνακας 12: Παραγωγή αιμολυσίνης και ζελατινάσης σε ανθρώπινα και ζωϊκά εντεροκοκκικά στελέχη ανάλογα με την προέλευση των στελεχών.

Προέλευση των στελεχών (n)	Παραγωγή αιμολυσίνης n (%)	Παραγωγή ζελατινάσης n (%)
<i>E. faecium</i>		
κλινικά δείγματα (52)	1 (1.9 %)	0
κόπρανα ασθενών (94)	3 (3.2 %)	1 (1.1 %)
κόπρανα ζώων (32)	1 (3.1 %)	5 (15.6 %)
<i>E. faecalis</i>		
κλινικά δείγματα (61)	26 (42.6 %)	21 (34.4 %)
κόπρανα ασθενών (7)	2 (28.6 %)	2 (28.6 %)
κόπρανα ζώων (78)	5 (6.4 %)	21 (26.9 %)

Παρόμοια ποσοστά από τα κλινικά *E. faecium* και *E. faecalis* που σχημάτιζαν και που δεν σχημάτιζαν βιομεμβράνες παράγανε αιμολυσίνη, αλλά τα αιμολυτικά κλινικά στελέχη *E. faecalis* παράγανε υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από τα μη αιμολυτικά στελέχη (0.351 ± 0.272 έναντι 0.214 ± 0.142 , $P 0.044$). Επίσης, παρόμοιες αναλογίες των *E. faecium* και *E. faecalis* από ανθρώπινα κόπρανα που σχημάτιζαν και που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνη ήταν αιμολυτικά και παρόμοιες μέσες τιμές βιομεμβράνης παρήχθησαν από αιμολυτικά και μη αιμολυτικά στελέχη. Μεταξύ των στελεχών από ζώα,

τα αιμολυτικά στελέχη *E. faecalis* παράγανε υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από μη αιμολυτικά στελέχη (0.213 ± 0.106 έναντι 0.111 ± 0.090 , $P 0.018$, Εικόνα 19).

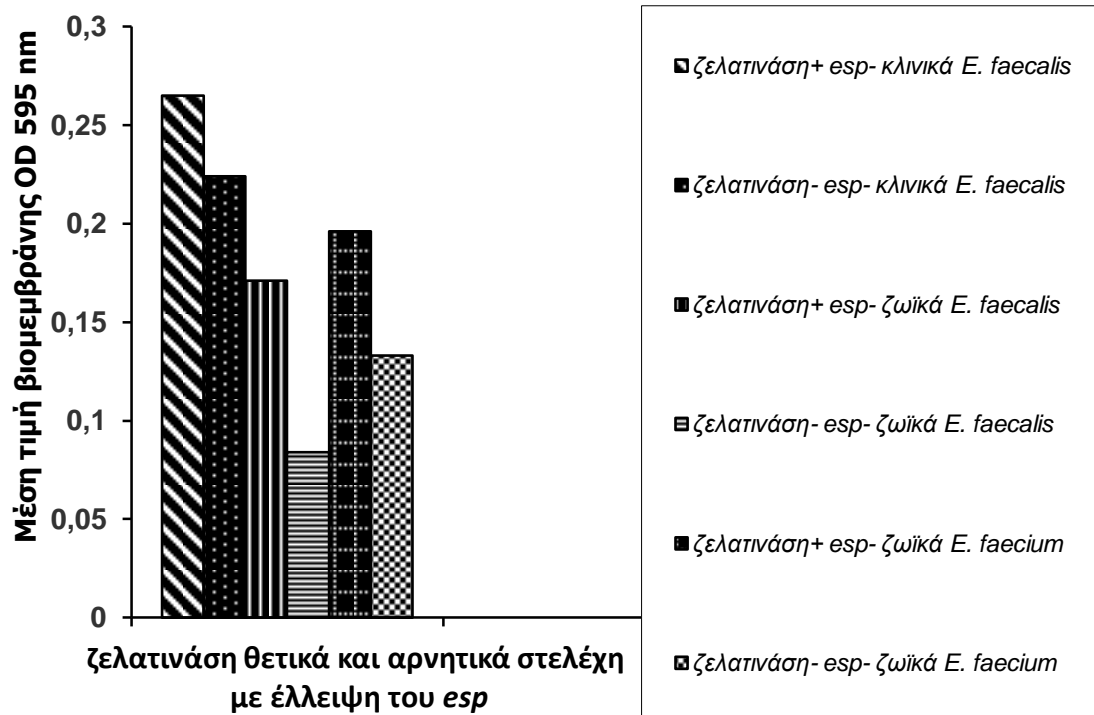


Εικόνα 19: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης σε αιμολυτικά και μη αιμολυτικά στελέχη *E. faecalis*.

Ζελατινάση παρήχθη σημαντικά πιο συχνά από τα ζωϊκά στελέχη *E. faecium* σε σχέση με τα κλινικά και τα στελέχη *E. faecium* από τα ανθρώπινα κόπρανα ($P 0.007$ και $P 0.028$, αντίστοιχα), ενώ παρόμοιες αναλογίες των ζωϊκών και των ανθρώπινων *E. faecalis* παράγανε ζελατινάση. Μεταξύ των κλινικών στελεχών *E. faecalis*, 41.3% των στελεχών

που σχημάτιζαν βιομεμβράνη σε σύγκριση με το 13.3% αυτών που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνη, παράγανε ζελατινάση (P 0.096) και η ποσότητα της βιομεμβράνης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ζελατινάση-θετικών και -αρνητικών στελεχών (P 0.170). Μεταξύ των εντερόκοκκων από ανθρώπινα κόπρανα, ίσες αναλογίες των *E. faecium* και *E. faecalis* που σχημάτιζαν και που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνες παράγανε ζελατινάση, αλλά τα ζελατινάση-θετικά στελέχη παράγανε υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από ό, τι τα ζελατινάση-αρνητικά στελέχη (P 0.244 και P 0.021 αντίστοιχα). Τέλος, μεταξύ των στελεχών από κόπρανα ζώων, παραγωγή ζελατινάσης παρατηρήθηκε στο 80.0% των *E. faecium* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη, έναντι του 20.0% αυτών που δε σχημάτιζαν (P 0.053) και στο 52.2% των *E. faecalis* που σχημάτιζαν βιομεμβράνη, έναντι του 16.4% αυτών που δε σχημάτιζαν (P 0.003), ενώ τα ζελατινάση-θετικά *E. faecium* και *E. faecalis* παράγανε υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από ό, τι τα ζελατινάση-αρνητικά στελέχη (P 0.100 και P 0.003 αντίστοιχα).

Στην υποομάδα των *esp*-αρνητικών στελεχών, διαπιστώσαμε ότι το 58.8% των ζελατινάση-θετικών ζωϊκών *E. faecalis* παράγανε βιομεμβράνη σε σύγκριση με το 11.3% των ζελατινάση-αρνητικών στελεχών (P <0.0001). Μεταξύ των *esp*-αρνητικών ζωϊκών στελεχών *E. faecium*, παραγωγή ζελατινάσης παρατηρήθηκε στο 75.0% των στελεχών που σχημάτιζαν βιομεμβράνη έναντι του 25.9% αυτών που δε σχημάτιζαν βιομεμβράνη (P 0.087). Επιπλέον, με τη χρήση T-test διαπιστώθηκε ότι τα *esp*-αρνητικά ζωϊκά στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium* που ήταν ζελατινάση-θετικά παράγανε υψηλότερες μέσες τιμές βιομεμβράνης από εκείνα που ήταν ζελατινάση-αρνητικά (P <0.0001 και P 0.258 αντίστοιχα, Εικόνα 20). Μεταξύ των *esp*-αρνητικών ανθρώπινων στελεχών η παραγωγή της ζελατινάσης δεν συσχετίστηκε με την παραγωγή βιομεμβράνης.



Εικόνα 20: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης σε ζελατινάση-θετικά και αρνητικά στελέχη που παρουσίαζαν έλλειψη του γονιδίου *esp*.

Π.10. Συσχέτιση της παραγωγής αιμολυσίνης και ζελατινάσης με την παρουσία των γονιδίων *esp* και *fsrb*

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής αιμολυσίνης και της παρουσίας των γονιδίων *esp* και *fsrb* τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ζωικά στελέχη. Επιπλέον, δεν βρήκαμε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ζελατινάσης και της παρουσίας του *esp* στους εντερόκοκκους τόσο από ανθρώπους όσο και από ζώα.

Μεταξύ των κλινικών εντερόκοκκων, όλα τα στελέχη *E. faecium* ήταν αρνητικά για το γονίδιο *fsrb* και για την παραγωγή ζελατινάσης, ενώ μεταξύ των *E. faecalis*, 61.9%

των ζελατινάση-θετικών στελεχών σε σύγκριση με 0% των ζελατινάση-αρνητικών στελεχών έφεραν το *fsrb* ($P < 0.0001$).

Στα στελέχη από κόπρανα ασθενών 100% των ζελατινάση-θετικών και 0% των ζελατινάση-αρνητικών *E. faecium* ήταν θετικά για το *fsrb* ($P 0.019$), ενώ στους *E. faecalis* ίσες αναλογίες των ζελατινάση-θετικών και αρνητικών στελεχών ήταν θετικά για το *fsrb* ($P 0.286$).

Όσον αφορά τα στελέχη από ζώα, το 52.4% των *E. faecalis* που ήταν ζελατινάση-θετικά έφεραν το *fsrb*, σε σύγκριση με το 8.8% εκείνων που ήταν ζελατινάση-αρνητικά ($P < 0.0001$). Παρομοίως 40% των ζελατινάση-θετικών και 7.4% των ζελατινάση-αρνητικών στελεχών *E. faecium* ήταν θετικά για το *fsrb* ($P 0.105$).

Π.11. Συσχέτιση της αντοχής στη βανκομυκίνη με το σχηματισμό βιομεμβράνης, την παρουσία του *esp* και την παρουσία του *fsrb*

Χρησιμοποιήσαμε τα Fisher's exact test, ανάλυση Crosstabs και Chi square test για να εκτιμήσουμε την αντοχή στη βανκομυκίνη σε σχέση με το σχηματισμό βιομεμβράνης. Η διαφορά στο σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ VRE και VSE στελεχών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P 0.704$ και $P 0.189$ σε κλινικά στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* αντίστοιχα, $P 0.681$ και $P 0.429$ σε στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* από κόπρανα, αντίστοιχα).

Μη σημαντική ήταν η συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ της αντοχής στη βανκομυκίνη και της παρουσίας του *esp* στα ανθρώπινα στελέχη ($P 0.475$ και $P 0.147$ σε κλινικά στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis*, $P 0.233$ και $P 0.429$ σε στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* από κόπρανα, αντίστοιχα).

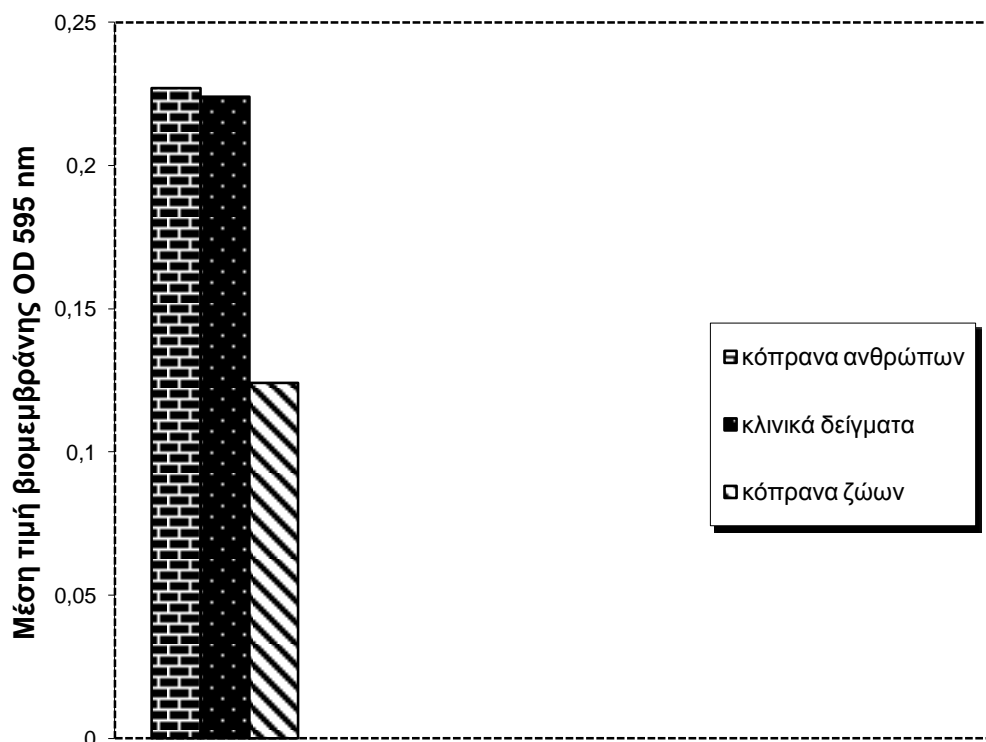
Ακόμη δε βρήκαμε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ αντοχής στη βανκομυκίνη και παρουσίας του γονιδίου *fsrb* στα ανθρώπινα στελέχη (P 0.180 σε κλινικά στελέχη *E. faecalis*, P 1.000 και P 1.000 σε στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* από κόπρανα, αντίστοιχα). Όλα τα κλινικά στελέχη *E. faecium* ήταν αρνητικά για το γονίδιο *fsrb*.

Όσο αφορά το γονίδιο *vanA* δεν βρήκαμε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του και της παραγωγής βιομεμβράνης στους εντερόκοκκους από ανθρώπους. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του *vanA* και της παρουσίας των γονιδίων *esp* και *fsrb* στα ανθρώπινα εντεροκοκκικά στελέχη.

Δεν συσχέτισαμε το σχηματισμό βιομεμβράνης και την παρουσία των γονιδίων *esp* και *fsrb* με την αντοχή στη βανκομυκίνη και την παρουσία του γονιδίου *vanA* στα στελέχη από ζώα, λόγω του πολύ χαμηλού αριθμού των VRE στα ζωικά δείγματα.

Π.12. Παραγωγή βιομεμβράνης και παρουσία του γονιδίου *esp* ανάλογα με τη θέση απομόνωσης

Οι εντερόκοκκοι από κόπρανα ζώων παρουσίασαν ασθενή παραγωγή βιομεμβράνης (μέση τιμή 0.124 ± 0.095) (Εικόνα 21). Η στατιστική ανάλυση (Spearman test) έδειξε ότι αν και τα στελέχη από κόπρανα ασθενών και από κλινικά δείγματα παρουσίασαν ισχυρότερη παραγωγή βιομεμβράνης (μέση τιμή της βιομεμβράνης 0.227 ± 0.187 και 0.224 ± 0.177 , αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα στελέχη από ζώα, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (P 0.347 και P 0.666 αντίστοιχα, Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης ανάλογα με την προέλευση των εντερόκοκκων.

Όσον αφορά τη θέση απομόνωσης, διαπιστώθηκε ότι τα κλινικά στελέχη από ούρα, αίμα ή άλλες πηγές έφεραν το γονίδιο *esp* σε παρόμοια ποσοστά (63.6, 55.9 και 55.6%, αντίστοιχα) και επίσης σχημάτιζαν βιομεμβράνες σε παρόμοια ποσοστά (75, 67.6 και 50%, αντίστοιχα) (Πίνακες 13 και 14).

Πίνακας 13: Συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου *esp* και σχηματισμού βιομεμβράνης στα κλινικά εντεροκοκκικά στελέχη σύμφωνα με τη θέση απομόνωσης.

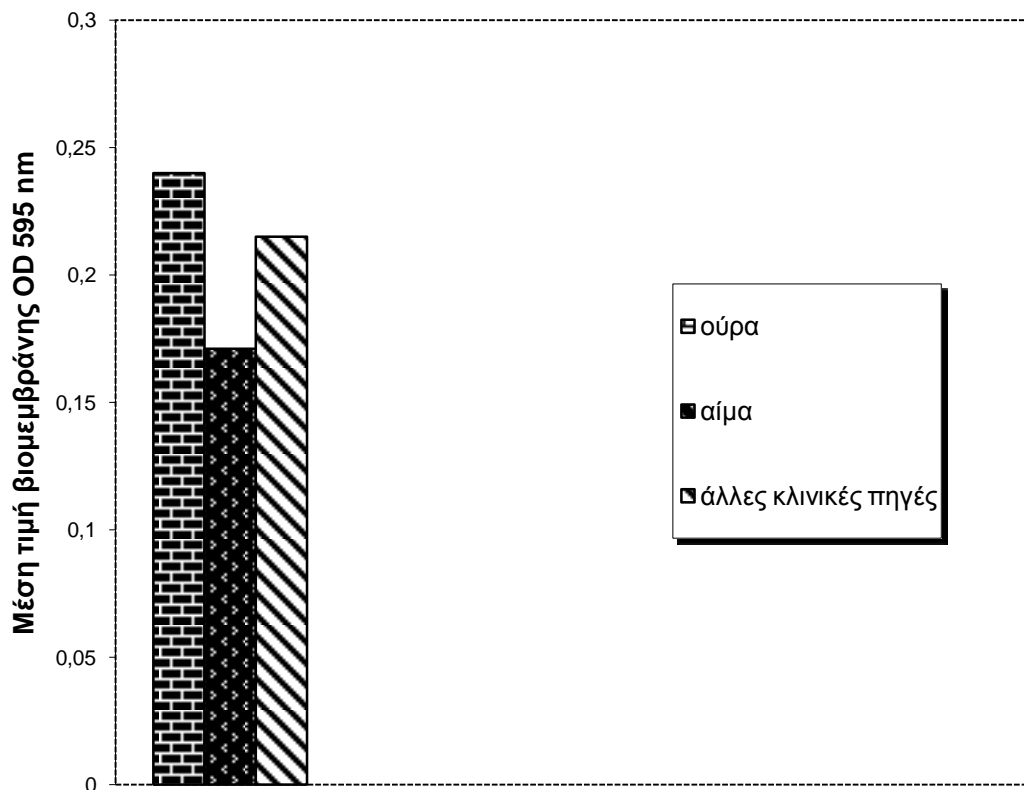
Θέση απομόνωσης (n)	Γονίδιο <i>esp</i> n (%)	Σχηματισμός βιομεμβράνης n (%)
Ούρα (n=44)	28 (63.6 %)	33 (75 %)
Αίμα (n=34)	19 (55.9 %)	23 (67.6 %)
Άλλες πηγές (n=36)	20 (55.6 %)	18 (50 %)

Πίνακας 14: Συνδυασμός εμφάνισης διαφορετικών παραγόντων παθογονικότητας στα ανθρώπινα κλινικά στελέχη ανάλογα με την προέλευση τους.

Προέλευση	E+B(%)	F+B	E+F+B	E	F	B
Ούρα (n=44)	23(52.3)	8(18.2)	2(4.5)	3(6.8)	–	–
Αίμα (n=33)	16(48.5)	2(6.1)	1(3)	3(9.1)	–	4(12.1)
Πύο (n=5)	4(80)	–	–	–	–	1(20)
Καθετήρες (n=6)	4(66.7)	–	–	–	–	–
Κολπικά (n=14)	3(21.4)	1(7.1)	–	1(7.1)	1(7.1)	5(35.7)
Βρογχικά (n=2)	1(50)	–	–	–	–	1(50)
Τραύματα (n=2)	1(50)	–	–	–	–	–
Δερματικά (n=3)	3(100)	–	–	–	–	–
Ασκήτης (n=2)	1(50)	1(50)	–	–	–	–
Άλλες πηγές (n=2)	2(100)	–	–	–	–	–

E + B = στελέχη που έφεραν το *esp* και σχημάτιζαν βιομεμβράνη, F + B = στελέχη που έφεραν το *fsrb* και σχημάτιζαν βιομεμβράνη, E +F+ B = στελέχη που έφεραν και το *esp* και το *fsrb* και σχημάτιζαν βιομεμβράνη, E = στελέχη που έφεραν μόνο το *esp*, F = στελέχη που έφεραν μόνο το *fsrb*, B = στελέχη που σχημάτιζαν μόνο βιομεμβράνη.

Όταν συγκρίναμε την ποσοτική παραγωγή βιομεμβράνης από τους κλινικούς εντερόκοκκους σύμφωνα με την θέση της απομόνωσης, διαπιστώσαμε ότι στελέχη απομονωμένα από λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος εμφάνισαν ισχυρότερη παραγωγή βιομεμβράνης από ό, τι στελέχη από άλλες θέσεις, με τη διαφορά να είναι σημαντική σε σχέση με τα στελέχη από το αίμα ($P 0.046$, Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Ποσοτικός σχηματισμός βιομεμβράνης σε κλινικά στελέχη εντερόκοκκων, σύμφωνα με τη θέση απομόνωσης.

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε πιο συχνή εμφάνιση αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ των εντεροκοκκικών στελεχών από τον άνθρωπο σε σύγκριση με τα ζώα. Αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι τα στελέχη της συλλογής προέρχονταν από τριτοβάθμια νοσοκομεία, ενώ τα δείγματα ανθρώπινων κοπράνων προέρχονταν από επιτήρηση φορείας VRE σε τμήματα με κλινικό πρόβλημα αντοχής και VRE.

Όσον αφορά στη βανκομυκίνη, τα στελέχη από ζώα εμφάνισαν πολύ χαμηλά ποσοστά αντοχής σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους. Μια

αξιοσημείωτη μείωση του επιπολασμού των VRE ανάμεσα στα ζώα στην Ευρώπη έχει παρατηρηθεί και από διάφορες άλλες μελέτες μετά από την απόσυρση του ανοραρίν (Phillips, 2007). Στις Ηνωμένες Πολιτείες σπάνια ανιχνεύονται ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, ενώ στην Ευρώπη έχουν απομονωθεί στο παρελθόν συχνά από εκτρεφόμενα ζώα (Donabedian *et al*, 2010, Hayes *et al*, 2003).

Σχετικά με τον τύπο της αντοχής στη βανκομυκίνη, τα στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα και κόπρανα ασθενών εμφάνισαν μόνο το *vanA* γονίδιο. Ο τύπος VanA είναι πιο ευρέως διαδεδομένος και είναι μακράν ο κυρίαρχος τύπος αντοχής που αναφέρεται στην Ευρώπη (Bonora *et al*, 2001, Low *et al*, 2001, Goossens *et al*, 2003, Hershberger *et al*, 2005). Παρόμοια, στις Ηνωμένες Πολιτείες, παρόλο που στελέχη με τύπο αντοχής VanB είναι αρκετά κοινά, εξακολουθεί να κυριαρχεί ο φαινότυπος VanA (Clark *et al*, 1993).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό αντοχής υψηλού επιπέδου στη γενταμικίνη τόσο στα ζωϊκά στελέχη *E. faecium* (18.8%) όσο και στα ζωϊκά στελέχη *E. faecalis* (19.2%). Σε άλλες μελέτες εντεροκοκκικών στελεχών από εκτρεφόμενα ζώα διαπιστώθηκε ότι εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη γενταμικίνη και στην αμπικιλίνη ήταν σπάνιοι σε ζώα που δεν έλαβαν αντιμικροβιακές ουσίες. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη εντεροκόκκων από χοίρους που συλλέχθηκαν μεταξύ των ετών 1999 και 2000, στις Ηνωμένες Πολιτείες, μόνο 6% των στελεχών εμφάνισε αντοχή υψηλού επιπέδου στη γενταμικίνη (Jackson *et al*, 2005).

Στην ομάδα των κλινικών στελεχών εντεροκόκκων που μελετήσαμε, το ποσοστό αντοχής στην αμπικιλίνη ήταν υψηλότερο μεταξύ των στελεχών *E. faecium* (84.6%) από ό,τι μεταξύ των *E. faecalis* (16.4%) παρόμοια με άλλες μελέτες (Conceição *et al*, 2011). Επίσης, παρατηρήθηκε μέτριο ποσοστό υψηλού επιπέδου αντοχής στη γενταμικίνη στα

κλινικά στελέχη *E. faecium* (23.1%), παρόμοιο με αυτά που παρατηρήθηκαν πρόσφατα σε μελέτες που έγιναν στη Βραζιλία (26.7%) και στις ΗΠΑ (25.2%) (**Gales et al, 2009, Sader et al, 2009**) ενώ στα κλινικά στελέχη *E. faecalis* το ποσοστό ήταν αρκετά υψηλότερο (49.2%).

Όσον αφορά τα γονίδια που συμμετέχουν στις βιομεμβράνες, το οποίο ήταν και το κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης, το γονίδιο *esp* ανιχνεύθηκε σε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό στελεχών *E. faecalis* και *E. faecium* από ανθρώπινα δείγματα από ότι στα δείγματα από ζώα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες (**Rice et al, 2003, Whitman et al, 2007**), που επίσης ανέφεραν υψηλότερη επίπτωση του *esp* σε εντερόκοκκους από κλινικά δείγματα και ανθρώπινα κόπρανα σε σύγκριση με εντερόκοκκους από ζώα καθώς επίσης και με μία άλλη μελέτη που ανέφερε απουσία του *esp* σε ζωϊκά στελέχη *E. faecium* (**Willems et al, 2001**). Περαιτέρω, εντοπίστηκε για πρώτη φορά το γονίδιο *esp* στον *E. gallinarum*.

Παρόλο που οι Scott et al. (**Scott et al, 2005**) έχουν αναφέρει ποσοστό 100% ανίχνευσης του *esp* σε στελέχη *E. faecium* από λύματα και 80% σε στελέχη *E. faecium* από σηπτικές δεξαμενές, σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στα ποσοστά ανίχνευσης του *esp* σε κλινικά στελέχη *E. faecium*, που κυμαίνονταν από 0% έως 78% (**Shankar et al, 1999, Hammerum et al, 2002, Lund et al, 2006, Woodford Lund et al, 2001**). Έχει επίσης διαπιστωθεί υψηλή διακύμανση της συχνότητας του *esp* σε κλινικά στελέχη *E. faecalis*, με τα ποσοστά ανίχνευσης να κυμαίνονται από 29% σε 71% (**Shankar et al, 1999, Eaton & Gasson, 2001, Hammerum et al, 2002, Waar et al, 2002**). Σε σύγκριση με τα ποσοστά αυτά, στη μελέτη μας τα ποσοστά φορέας του γονιδίου *esp* στα κλινικά δείγματα κυμάνθηκαν από 52.5% για τους *E. faecalis* ως 69.2% για τους *E. faecium*.

Μελέτες που εξετάζουν τη σχετική κατανομή του γονιδίου *esp* σε μη κλινικά δείγματα είναι περιορισμένες. Οι Wheeler *et al.* (Wheeler *et al.*, 2002) διαπίστωσαν ότι η εμφάνιση του *esp* στον *E. faecalis* περιοριζόταν σε ανθρώπους και σε λίγες περιπτώσεις σε ζώα, καθώς και το ότι ο δείκτης αυτός μπορεί να ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων (π.χ., το ποσοστό των στελεχών που είχαν το γονίδιο *esp* από ανθρώπινα δείγματα κοπράνων κυμαίνονταν από 0% έως 95% για τον *E. faecalis* και 0% έως 63% για τον *E. faecium*). Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την ύπαρξη του γονιδίου *esp* σε εντερόκοκκους από ζώα επικεντρώθηκαν κυρίως σε κατοικίδια ζώα όπως γάτες και σκύλους (Whitman *et al.*, 2007). Σύμφωνα με διάφορες μελέτες το *esp* εντοπίστηκε σε 5% των στελεχών *E. faecium* που προέρχονται από σκύλους (Harada *et al.*, 2005), σε 4.1% των στελεχών *E. faecalis* από άγρια πτηνά (Poeta *et al.*, 2005) και σε 8% των στελεχών *E. faecalis* από χοίρους (Hammerum *et al.*, 2002).

Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου *esp* σε κλινικά στελέχη μπορεί να αντικατοπτρίζει ένα ρόλο που έχει η πρωτεΐνη Esp στη λοίμωξη. Εκτός από το ρόλο της στην προσκόλληση, η Esp επίσης πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην διαφυγή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, το οποίο αποτελεί σημαντικό στάδιο για την ανάπτυξη της ασθένειας (Shankar *et al.*, 1999). Η χαμηλή παρουσία του *esp* μεταξύ των στελεχών από κόπρανα ζώων θα μπορούσε να υποδηλώνει τη χαμηλότερη παθογονικότητα τους σε σύγκριση με τα κλινικά στελέχη.

Το γονίδιο *fsrb*, που είναι γνωστό ότι βρίσκεται ως επί το πλείστον στον *E. faecalis* (Hancock & Perego, 2004, Qin *et al.*, 2001, Mylonakis *et al.*, 2002), εντοπίστηκε επίσης στο 12.5% των ζωϊκών στελεχών *E. faecium* αλλά μόνο σε ελάχιστες, σημαντικά χαμηλότερες αναλογίες στα ανθρώπινα στελέχη *E. faecium* (0% σε κλινικά και 1.1% σε κόπρανα). Μεταξύ των στελεχών *E. faecalis*, παρόμοιες αναλογίες ζωικών και ανθρώπινων στελεχών έφεραν το γονίδιο *fsrb* (19.2% στα ζώα, 14.3% στα κόπρανα

ασθενών, 21.3% στα κλινικά δείγματα). Σε μία προηγούμενη μελέτη (**Qin et al, 2000**), διαπίστωθηκε ότι το 69% από τα κλινικά στελέχη *E. faecalis* ήταν θετικά για το *fsrb* ενώ σε μία άλλη μελέτη (**Pillai et al, 2002**) παρατήρησαν ότι όλα τα στελέχη *E. faecalis* που προέρχονταν από ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα ήταν θετικά, σε σύγκριση με μόνο 53% των στελεχών που προέρχονται από κόπρανα και βρήκαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του *fsrb* και της προέλευσης των στελεχών από λοιμώξεις, σε σύγκριση με την προέλευση από τον αποικισμό του εντέρου.

Παρόμοια ποσοστά ανθρώπινων στελεχών *E. faecium* (64.9% στα κόπρανα ασθενών, 71.1% στα κλινικά δείγματα) και *E. faecalis* (71.4% στα κόπρανα ασθενών, 75.4% στα κλινικά δείγματα) είχαν ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών. Η επίπτωση της παραγωγής βιομεμβρανών που έχει αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες για κλινικά εντεροκοκκικά στελέχη ποικίλλει (**Mohamed & Huang, 2007**). Σε μία μελέτη στην Ιταλία 80% των στελεχών *E. faecalis* και 48% των *E. faecium* από ασθενείς με λοίμωξη ήταν ικανά να σχηματίζουν βιομεμβράνες (**Baldassarri et al, 2001**), ενώ μία άλλη μελέτη από την Ιταλία ανέφερε την παραγωγή βιομεμβράνης από 87% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* και το 16% των κλινικών στελεχών *E. faecium* (**Dupre et al, 2003**).

Στην παρούσα μελέτη, συγκρίναμε απευθείας το σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ εντερόκοκκων από ζώα και από ανθρώπους και διαπιστώσαμε ότι τα στελέχη από ζώα εμφάνισαν σημαντικά μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης από τα στελέχη από ανθρώπινα δείγματα ($P < 0.0001$). Από τις μέχρι τώρα γνώσεις μας, δεν υπάρχει καμία μελέτη που να κάνει άμεση σύγκριση του σχηματισμού βιομεμβράνης από ζωικά στελέχη εντερόκοκκων έναντι εντερόκοκκων από ανθρώπους, ενώ μόνο μία μελέτη έχει ελέγξει το σχηματισμό βιομεμβράνης σε εντερόκοκκους από ζώα (**Macovel et al, 2009**). Αυτή η μελέτη (**Macovel et al, 2009**), ανέφερε ότι 30.5% από 396 στελέχη εντερόκοκκων από ζώα

είχαν τη δυνατότητα να σχηματίσουν βιομεμβράνη, ενώ στη μελέτη μας 29.5% των *E. faecalis* και 34.4% των *E. faecium* από τα ζωϊκά στελέχη σχημάτιζαν βιομεμβράνες.

Επίσης, παρατηρήσαμε ότι τα ανθρώπινα και ζωϊκά στελέχη που ήταν θετικά για το γονίδιο *esp* παράγανε υψηλότερη μέση τιμή βιομεμβράνης από ότι τα αρνητικά για το *esp* στελέχη. Παρόλα αυτά, στους εντερόκοκκους από κλινικά δείγματα και ανθρώπινα κόπρανα η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στα στελέχη *E. faecium*, ενώ στα ζωϊκά στελέχη το αποτέλεσμα ήταν σημαντικό μόνο στα στελέχη *E. faecalis*.

Η επίπτωση του γονιδίου *esp* ήταν σημαντικά υψηλότερη στα κλινικά στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* που παράγανε βιομεμβράνες από ότι στα κλινικά στελέχη που δεν παράγανε βιομεμβράνες ($P < 0.0001$ and $P 0.045$, αντίστοιχα). Οι Heikens *et al.* επίσης ανέφεραν ότι η επιφανειακή πρωτεΐνη του εντερόκοκκου Esp είναι σημαντική για το σχηματισμό βιομεμβράνης στον *E. faecium* και βρήκαν ότι στελέχη *E. faecium* με μετάλλαξη στο γονίδιο *esp* είχαν σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή βιομεμβράνης σε σύγκριση με τα άγριου τύπου στελέχη (Heikens *et al*, 2007). Επίσης, αναφέρθηκε ότι το 93.5% των *esp*-θετικών στελεχών *E. faecalis* σχημάτιζαν βιομεμβράνες σε αβιοτική επιφάνεια ενώ κανένα από τα *esp*-αρνητικά στελέχη *E. faecalis* δεν παρήγαγε βιομεμβράνες (Toledo-Arana *et al*, 2001). Σε αυτή τη μελέτη οι ερευνητές επίσης βρήκαν ότι η αδρανοποίηση του *esp* σε δύο μεταλλαγμένα στελέχη *E. faecalis* οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή βιομεμβράνης (Toledo-Arana *et al*, 2001). Προτάθηκε έτσι ότι η πρωτεΐνη Esp προωθεί το σχηματισμό βιομεμβράνης αν και επιπρόσθετοι παράγοντες μπορεί επίσης να συμβάλλουν στο σχηματισμό βιομεμβράνης από τον *E. faecalis*. Εν τούτοις, άλλες μελέτες (Van Wamel *et al*, 2007, Kristich *et al*, 2004) δεν βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας ή της απουσίας του γονιδίου *esp* και του σχηματισμού βιομεμβράνης σε στελέχη *E. faecalis*.

Διαπιστώσαμε ότι ορισμένα *esp*-θετικά στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium* δεν παρήγαγαν βιομεμβράνες, όπως έχει αναφερθεί επίσης από άλλες μελέτες (**van Merode et al, 2006, Di Rosa et al, 2006**). Προηγούμενες μελέτες (**Baldassarri et al, 2001, Hufnagel et al, 2004, Xu et al, 1998, 2000**) έχουν δείξει ότι άλλα γονίδια όπως τα *bopD*, locus *epa*, *icaA* μπορεί να είναι παρόντα στον *E. faecalis* και να επηρεάζουν το σχηματισμό της βιομεμβράνης. Η έλλειψη παραγωγής βιομεμβράνης από *esp*-θετικά στελέχη *E. faecium*, μπορεί να εξηγηθεί από την απουσία ή τη χαμηλού επιπέδου έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης Esp, στην επιφάνεια των κυττάρων, παρά την παρουσία του γονιδίου της. Θα μπορούσε να σημειωθεί ότι η έκφραση του γονιδίου *esp* στον *E. faecium*, ρυθμίζεται από ένα εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία μηχανισμό και μπορεί να μεταβληθεί όταν ο *E. faecium* εισέρχεται σε ένα ξενιστή όπως έχει προταθεί από προηγούμενες μελέτες (**Van Wamel et al, 2007**).

Από την άλλη μεριά, τα ζωϊκά στελέχη που βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο *fsrb* παρουσίασαν ισχυρότερη παραγωγή βιομεμβράνης από τα στελέχη που ήταν αρνητικά για το *fsrb*. Αυτό θα μπορούσε να υποδεικνύει ένα διαφορετικό ρόλο που παίζει το *fsrb* στο σχηματισμό των βιομεμβρανών σε στελέχη εντεροκόκκων που προέρχονται από ζώα. Οι Hancock & Perego (**Hancock & Perego, 2004**) έδειξαν ότι στον *E. faecalis* V583 το σύστημα αίσθησης απαρτίας Fsr ελέγχει την ανάπτυξη βιομεμβράνης. Η μελέτη μας αναφέρει για πρώτη φορά ότι το σύστημα αίσθησης απαρτίας Fsr συσχετίζεται με την ανάπτυξη βιομεμβράνης όχι μόνο στον *E. faecalis* όπως και άλλες μελέτες έχουν δείξει (**Hancock & Perego, 2004, Mohamed et al, 2006, Thomas et al, 2008**), αλλά επίσης και στους *E. faecium*.

Η αιμολυσίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη των εντερόκοκκων, καθώς μπορεί να αυξήσει τη βαρύτητα της λοίμωξης (**Huycke et al, 1991, Jett et al, 1994**). Τόσο στα στελέχη *E. faecium* όσο και *E. faecalis*, ένα ποσοστό τους παρήγαγε

αιμολυσίνη, με τη συχνότητα αυτού του χαρακτηριστικού να είναι υψηλότερη για τα κλινικά στελέχη *E. faecalis* (42.6%). Οι Ike *et al.* (Ike *et al.*, 1987) έδειξαν ότι το 60% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* ήταν αιμολυτικά σε σύγκριση με το 17% των στελεχών από μη κλινικά δείγματα. Η συχνότητα των αιμολυτικών κλινικών στελεχών *E. faecalis* στη μελέτη μας ήταν ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή που έχει αναφερθεί από τους Ike *et al.* και παρόμοια με το ποσοστό για στελέχη *E. faecalis* (44%) που αναφέρθηκε από τους Eaton & Gasson (Eaton & Gasson, 2001). Ενδιαφέρον, παρουσιάζει ότι το χαρακτηριστικό της αιμολυσίνης φάνηκε να συνδέεται ποσοτικά με το σχηματισμό βιομεμβράνης στα κλινικά και ζωϊκά στελέχη *E. faecalis*, το οποίο από τις ως τώρα γνώσεις μας, αναφέρεται για πρώτη φορά. Ωστόσο, η παραγωγή αιμολυσίνης δεν παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία των γονιδίων *esp* και *fsrb* ούτε στα ανθρώπινα ούτε στα ζωϊκά στελέχη.

Κανένα από τα κλινικά στελέχη *E. faecium* και 34.4% των κλινικών στελεχών *E. faecalis* βρέθηκαν να παράγουν ζελατινάση. Οι Kühnen *et al.* (Kühnen *et al.*, 1988) ανέφεραν υψηλό ποσοστό (63.7%) παραγωγής της ζελατινάσης μεταξύ κλινικών εντερόκοκκων, ενώ οι Di Rosa *et al.* (Di Rosa *et al.*, 2006) ανέφεραν την παραγωγή ζελατινάσης από 37% των κλινικών *E. faecalis*, παρόμοια με τη μελέτη μας.

Επιπλέον, η παραγωγή ζελατινάσης φάνηκε να συνδέεται με την αναλογία και την ποσότητα της σχηματιζόμενης βιομεμβράνης στα στελέχη *E. faecalis* από κόπρανα ζώων και την ποσότητα της σχηματιζόμενης βιομεμβράνης στα *E. faecalis* από κόπρανα ανθρώπων. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η παραγωγή της ζελατινάσης πιθανώς ευνοεί τον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα από εντεροκοκκικά στελέχη.

Περαιτέρω ανάλυση της υποομάδας των *esp*-αρνητικών ανθρώπινων και ζωϊκών στελεχών έδειξε ότι η ικανότητα παραγωγής ζελατινάσης συσχετίστηκε θετικά με το

σηματισμό βιομεμβράνης μόνο σε στελέχη *E. faecalis* από κόπρανα ζώων και όχι στα ανθρώπινα στελέχη. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι η παραγωγή αυτής της πρωτεΐσης μπορεί να είναι ένας μηχανισμός επιλογής για τα ζωικά στελέχη *E. faecalis*, καθώς μπορεί να δίνει τη δυνατότητα σε στελέχη των ζώων αρνητικά για το *esp* να παράγουν βιομεμβράνες. Αν και γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η ζελατινάση είναι απαραίτητη για το σχηματισμό βιομεμβράνης (Hancock & Perego, 2004, Mohamed & Murray, 2006), επιδημιολογικές μελέτες δεν έχουν υποστηρίξει τη σχέση μεταξύ της παραγωγής ζελατινάσης και του σχηματισμού βιομεμβράνης σε κλινικά στελέχη *E. faecalis* (Di Rosa *et al*, 2006, Baldassarri *et al*, 2006). Παρόμοια με αυτές τις μελέτες, δεν βρήκαμε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ζελατινάσης και του σχηματισμού βιομεμβράνης στα κλινικά στελέχη *E. faecalis*.

Κανένα από τα 52 κλινικά στελέχη *E. faecium* στην παρούσα μελέτη δεν έδειξε δραστηριότητα ζελατινάσης, παρόμοια με τα αποτελέσματα των Eaton & Gasson (Eaton & Gasson, 2001), γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή ζελατινάσης από αυτό το είδος δεν είναι συνήθης. Η παραγωγή ζελατινάσης έδειξε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία του γονιδίου *fsrb* στα κλινικά και ζωικά *E. faecalis* και στα *E. faecium* από ανθρώπινα κόπρανα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η σύνθεση της ζελατινάσης στον *E. faecalis* ρυθμίζεται από το *fsr* locus (Qin *et al*, 2001). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ζελατινάσης και της παρουσίας του γονιδίου *esp* σε ανθρώπινα και ζωικά στελέχη, παρόμοια με μια άλλη μελέτη, όπου το *esp* και η ικανότητα παραγωγής ζελατινάσης σπάνια μόνο συσχετίστηκαν σε κλινικά στελέχη *E. faecalis* ή *E. faecium* (Di Rosa *et al*, 2006).

Καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ της παρουσίας των γονιδίων *esp*, *fsrb* και της αντοχής στη βανκομυκίνη στα στελέχη από ανθρώπινα κόπρανα, κλινικά δείγματα και κόπρανα ζώων. Επιπροσθέτως, δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αντοχής στη

βανκομυκίνη και του σχηματισμού βιομεμβράνης ούτε στα ανθρώπινα, ούτε στα ζωϊκά εντεροκοκκικά στελέχη.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα ούρα, το αίμα ή άλλα κλινικά δείγματα έφεραν το γονίδιο *esp* και σχηματίζανε βιομεμβράνες σε παρόμοια ποσοστά, γεγονός που δείχνει ότι οι παράγοντες αυτοί δεν συσχετίζονται με τη λοίμωξη που προκαλείται από αυτά τα στελέχη. Ωστόσο, τα στελέχη που ανακτήθηκαν από λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος βρέθηκαν να παράγουν μεγαλύτερη μέση τιμή βιομεμβράνης σε σχέση με στελέχη από άλλες πηγές. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με μια άλλη μελέτη (**Giridhara Upadhyaya et al, 2010**), που επίσης διαπίστωσε ότι μεταξύ των κλινικών στελεχών από διαφορετικές πηγές, η παραγωγή βιομεμβράνης ήταν υψηλότερη μεταξύ των στελεχών από λοιμώξεις του ουροποιητικού (**Giridhara Upadhyaya et al, 2010**).

Συνολικά, συγκρίναμε άμεσα το σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ στελεχών *E. faecium* και *E. faecalis* που προέρχονται από ανθρώπους και από ζώα και παρατηρήσαμε ότι το ποσοστό των στελεχών που παράγουν βιομεμβράνη είναι σημαντικά υψηλότερο μεταξύ των ανθρώπινων στελεχών από ό, τι μεταξύ των ζωϊκών στελεχών. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να έχει μεγάλη σημασία για την ικανότητα των εντερόκοκκων που προέρχονται από ζώα έναντι αυτών από ανθρώπινα δείγματα να προκαλούν εμμένουσες λοιμώξεις. Αν και το γονίδιο *esp* δεν απαιτείται για το σχηματισμό βιομεμβράνης, η παρουσία του φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με το ποσοστό και τον βαθμό της παραγωγής βιομεμβράνης τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ζωϊκά στελέχη, ενώ το γονίδιο *fsrB* παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με το σχηματισμό βιομεμβράνης στους εντερόκοκκους από ζώα. Επιπλέον, η παραγωγή αιμολυσίνης συσχετίστηκε ποσοτικά με το σχηματισμό βιομεμβράνης σε κλινικά και ζωϊκά στελέχη *E. faecalis*, ενώ η παραγωγή ζελατινάσης εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με το σχηματισμό βιομεμβράνης κυρίως σε ζωϊκά στελέχη *E. faecalis*.

Τέλος, φαίνεται ότι ο σχηματισμός βιομεμβρανών από τους εντερόκοκκους εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες. Ο αριθμός των γενετικών παραγόντων που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην παραγωγή βιομεμβράνης έχει αυξηθεί κατά τα τελευταία χρόνια, λόγω της διαθεσιμότητας ποικίλων γονιδιωματικών και πρωτεομικών προσεγγίσεων. Απαραίτητη είναι η έρευνα και για άλλους παράγοντες παθογονικότητας των εντερόκοκκων και για το πώς αυτοί ρυθμίζουν το σχηματισμό βιομεμβράνης και σε ποιο στάδιο. Επίσης, παρότι ορισμένοι γενετικοί παράγοντες απαιτούνται για το σχηματισμό βιομεμβράνης *in vitro*, αναγκαία είναι η μελέτη για την ισχύ των εν λόγω ευρημάτων *in vivo*, χρησιμοποιώντας κατάλληλα μοντέλα ζώων που να μιμούνται τη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ βιομεμβρανών και ξενιστή. Μια καλύτερη κατανόηση της ρύθμισης της παραγωγής των βιομεμβρανών μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένες στρατηγικές ελέγχου των λοιμώξεων από τους εντερόκοκκους.

IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των γονιδίων *esp* και *fsrb*, της παραγωγής αιμολυσίνης, ζελατινάσης και του σχηματισμού βιομεμβράνης σε στελέχη εντεροκόκκων από ανθρώπους σε σύγκριση με στελέχη από ζώα. Μελετήθηκαν 219 στελέχη εντερόκοκκων που ανακτήθηκαν από κλινικά δείγματα και από κόπρανα ασθενών και 132 στελέχη από κόπρανα ζώων. Τα στελέχη εξετάστηκαν για την παραγωγή αιμολυσίνης και ζελατινάσης με φαινοτυπικές μεθόδους και για την παραγωγή βιομεμβράνης με τη μέθοδο μικροτιτλοποίησης πλακών. Τα γονίδια *esp* και *fsrb* ανιχνεύθηκαν με PCR. Τα ανθρώπινα στελέχη *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis* τόσο από κόπρανα όσο και από κλινικά δείγματα σχημάτισαν βιομεμβράνες πολύ πιο συχνά από ό, τι τα ζωϊκά στελέχη ($P < 0.0001$ και για τα δύο είδη). Η ποσότητα της βιομεμβράνης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ανθρώπινων και των στελεχών από ζώα, ενώ ήταν σημαντικά υψηλότερη στα *esp*-θετικά σε σύγκριση με τα *esp*-αρνητικά ανθρώπινα στελέχη *E. faecium* ($P < 0.0001$). Η συχνότητα του γονιδίου *esp* ήταν σημαντικά υψηλότερη στα ανθρώπινα σε σύγκριση με τα ζωϊκά στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* ($P < 0.0001$). Το γονίδιο *fsrb* εντοπίστηκε σημαντικά πιο συχνά στα ζωϊκά στελέχη *E. faecium* από τα ανθρώπινα ($P 0.004$). Η παραγωγή της αιμολυσίνης ήταν σημαντικά συχνότερη στα ανθρώπινα κλινικά *E. faecalis* σε σύγκριση με τα στελέχη ζώων ($P < 0.0001$). Παρόμοια ποσοστά των ανθρώπινων και των ζωϊκών *E. faecalis* παράγανε ζελατινάση, η οποία συσχετίστηκε σημαντικά με την παρουσία του γονιδίου *fsrb* ($P < 0.0001$) τόσο στα κλινικά όσο και στα ζωϊκά στελέχη *E. faecalis*. Η ιδιότητα της αιμολυσίνης δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση με την παρουσία των γονιδίων *esp* και *fsrb* αλλά φάνηκε να συνδέεται με αυξημένη ποσότητα της παραγόμενης βιομεμβράνης τόσο των ανθρώπινων κλινικών όσο και των ζωϊκών στελεχών *E. faecalis*. Η παραγωγή

ζελατινάσης συνδέθηκε με το ποσοστό και τον βαθμό της παραγωγής βιομεμβράνης κυρίως σε στελέχη *E. faecalis* από κόπρανα ζώων.

V. SUMMARY

The present study investigated the possible correlation between carriage of the virulence genes *esp* and *fsrb*, production of hemolysin and gelatinase and biofilm formation in human vs. animal enterococcal isolates. A collection of 219 enterococcal isolates recovered from clinical and fecal surveillance samples of hospitalized patients and 132 isolates from animal feces were studied. Isolates were tested for hemolysin and gelatinase phenotypically and for quantitative biofilm production by a microtitre method. Genes *esp* and *fsrb* were detected by PCR. Human *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from both surveillance and clinical samples produced biofilm significantly more often than animal isolates ($P < 0.0001$ for both species). The quantity of biofilm did not differ significantly between human and animal isolates, while was significantly higher in *esp*-positive compared with *esp*-negative human *E. faecium* isolates ($P < 0.0001$). The frequency of *esp* gene carriage was significantly higher in human compared with animal *E. faecium* and *E. faecalis* isolates ($P < 0.0001$). The gene *fsrb* was detected significantly more often in animal than human *E. faecium* isolates ($P 0.004$). Hemolysin production was significantly more common in human clinical compared with animal *E. faecalis* isolates ($P < 0.0001$). Similar proportions of animal and human *E. faecalis* produced gelatinase, which was significantly correlated with the presence of *fsrb* gene ($P < 0.0001$) in both human clinical and animal *E. faecalis* isolates. The hemolysin trait did not exhibit any correlation with the presence of *esp* and *fsrb* genes, but appeared to be linked with enhanced quantity

of biofilm production in both human clinical and animal *E. faecalis* isolates. Production of gelatinase was associated with the proportion and the degree of biofilm production mainly in animal *E. faecalis* isolates.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adams JL**, McLean RJ. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. Appl Environ Microbiol 1999;65:4285-4287.
2. **Alkan ML**, Beachey EH. Excretion of Lipoteichoic Acid by Group A Streptococci: Influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral mucosal cells. J Clin Invest 1978;61:671-677.
3. **Anon**. Bacterial meningitis in Canada: hospitalizations (1994-2001). Can Commun Dis Rep 2005;31:241-247.
4. **Anwar H**, Strap JL, Chen K, Costerton JW. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1208-1214.
5. **Anwar H**, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1347-1351.
6. **Anwar H**, Strap JL, Costerton JW. Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum. FEMS Microbiol Lett 1992;71:235-241.
7. **Applied Biosystems**. Real-Time PCR vs Traditional PCR. Applied Biosystems:1-15. online: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf.
8. **Arciola CR**, Baldassarri L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J, et al. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. Biomaterials 2008;29:580-586.
9. **Arthur M**, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1563-1571.

10. **Arthur M**, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1993;175:117-127.
11. **Baldassarri L**, Bertuccini L, Ammendolia MG, Coconcelli P, Arciola CR, Montanaro L, et al. Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages. *Indian J Med Res* 2004;119:131–135.
12. **Baldassarri L**, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G, Creti R. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet* 2001;357:1802.
13. **Baldassarri L**, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* 2001;190:113–120.
14. **Baldassarri L**, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G, et al. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs* 2006;29:402–406.
15. **Baptista M**, Depardieu F, Courvalin P, Arthur M. Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2291-2295.
16. **Barie PS**, Christou NV, Dellinger EP, Rout WR, Stone HH, Waymack JP, et al. Pathogenicity of the enterococcus in surgical infections. *Ann Surg* 1990;212:155-159.
17. **Barrall DT**, Kenney PR, Slotman GJ, Burchard KW. Enterococcal bacteremia in surgical patients. *Arch Surg* 1985;120:57–63.
18. **Barrett AJ**, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, Inc., New York, N.Y. 1998:350-369
19. **Basinger SF**, Jackson RW. Bacteriocin (Hemolysin) of *Streptococcus zymogenes*. *J Bacteriol* 1968;96:1895–1902.

20. **Bates J**, Jordens Z, Selkon JB. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993;342:490–491.
21. **Bates J**. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J Hosp Infect* 1997;37:89–101.
22. **Bayer AS**, Seidel JS, Yoshikawa TT, Anthony BF, Guze LB. Group D enterococcal meningitis. Clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literature. *Arch Intern Med* 1976;136:883–886.
23. **Beachey EH**, Dale JB, Simpson WA, Evans JD, Knox KW, Ofek I, et al. Erythrocyte binding properties of streptococcal lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1979;23:618-625.
24. **Bensing BA**, Dunny GM. Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1993;175:7421–7429.
25. **Berk SL**, Verghese A, Holtsclaw SA, Smith JK. Enterococcal pneumonia. Occurrence in patients receiving broad-spectrum antibiotic regimens and enteral feeding. *Am J Med* 1983;74:153–154.
26. **Bersos Z**, Maniati M, Kontos F, Petinaki E, Maniatis AN. First report of a linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:685-686.
27. **Bhakdi S**, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1991;59:4614–4620.
28. **Bhat KG**, Paul C, Ananthakrishna NC. Drug resistant enterococci in a south Indian hospital. *Trop Doct* 1998;28:106-107.
29. **Bingen E**, Levy C, de la Rocque F, Boucherat M, Varon E, Alonso JM, et al. Bacterial meningitis in children: a French prospective study. *Clin Infect Dis* 2005;41:1059-1063.

30. **BLEIWEIS AS**, ZIMMERMAN LN. PROPERTIES OF PROTEINASE FROM STREPTOCOCCUS FAECALIS VAR. LIQUEFACIENS. J Bacteriol 1964;88:653–659.
31. **Bliska JB**, Copass MC, Falkow S. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. Infect Immun 1993;61:3914–3921.
32. **Bolmstrom A**, Ballow CH, Qwarnstrom A, Biedenbach DJ, Jones RN. Multicentre assessment of linezolid antimicrobial activity and spectrum in Europe: report from the Zyvox antimicrobial potency study (ZAPS-Europe). Clin Microbiol Infect 2002;8:791-800.
33. **Bonora MG**, Boldrin C, Bragagnolo L, Cirelli L, De Fatima M, Grossato A, et al. Molecular analysis of vanA enterococci isolated from humans and animals in northeastern Italy. Microb Drug Resist 2001;7:247-256.
34. **Bonten MJ**, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? Lancet Infect Dis 2001;1:314-325.
35. **Boulanger JM**, Ford-Jones EL, Matlow AG. Enterococcal bacteremia in a pediatric institution: a four-year review. Rev Infect Dis 1991;13:847–856.
36. **Boyce JM**, Mermel LA, Zervos MJ, Rice LB, Potter-Bynoe G, Giorgio C, et al. Controlling vancomycin-resistant enterococci. Infect Control Hosp Epidemiol 1995;16:634-647.
37. **Boyle JF**, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993;31:1280–1285.
38. **Bradley CR**, Fraise AP. Heat and chemical resistance of enterococci, J Hosp Infect 1996;34:191-196.
39. **Branley J**, Yan B, Benn RA. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Med J Aust 1996;165:292.

40. **Breed RS**, Murray EGD, Hitchens AP. Genus I Diplococcus, In Bergey's manual of determinative bacteriology, 6th ed, Williams and Wilkins, Baltimore.1948:305-328.
41. **Breed RS**, Murray EGD, Smith NR. Genus II Streptococcus. In Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed, Williams and Wilkins, Baltimore.1957:508-524.
42. **Bridge PD**, Sneath PH. Numerical taxonomy of Streptococcus. J Gen Microbiol. 1983;129:565–597.
43. **Brook I**. Intra-abdominal, retroperitoneal, and visceral abscesses in children. Eur J Pediatr Surg 2004;14:265-273.
44. **Budavari SM**, Saunders GL, Liebowitz LD, Khoosal M, Crewe-Brown HH. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in South Africa. S Afr Med J 1997;87:1557.
45. **Bugg TD**, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Molecular basis of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. Biochemistry 1991;30:10408-10415.
46. **Burleson BS**, Ritchie DJ, Micek ST, Dunne WM. *Enterococcus faecalis* resistant to linezolid case series and review of the literature. Pharmacotherapy 2004;24:1225–1231.
47. **Burnett RJ**, Haverstock DC, Dellinger EP, Reinhart HH, Bohnen JM, Rotstein OD, et al. Definition of the role of enterococcus in intraabdominal infection: analysis of a prospective randomized trial. Surgery 1995;118:716-721.
48. **Bush LM**, Calmon J, Cherney CL, Wendeler M, Pitsakis P, Poupard J, et al. High-level penicillin resistance among isolates of enterococci. Implications for treatment of enterococcal infections. Ann Intern Med 1989;110:515–520.
49. **Carniol K**, Gilmore MS. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. J Bacteriol 2004;186:8161-8163.

50. **Centers for Disease Control and Prevention.** Recommendations for preventing spread of vancomycin resistance. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:105-113.
51. **Centinkaya Y, Falk P, Mayhall CG.** Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:686-707.
52. **Chandler JR, Hirt H, Dunny GM.** A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15617-15622.
53. **Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA.** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385-5394.
54. **Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC.** Physiological ecology in biofilm systems. *In* Characklis WG and Marshall KC (ed.). *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.1990:341-394.
55. **Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, et al.** Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003;53:159-171.
56. **Chien A, Edgar DB, Trela JM.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976;127:1550-1557.
57. **Chow JW.** Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31:586-589.
58. **Chow JW, Kuritza A, Shlaes DM, Green M, Sahm DF, Zervos MJ.** Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. *J Clin Microbiol* 1993;31:1609–1611.

59. **Chow JW**, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2474–2477.
60. **Christensen GD**, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982;37:318-326.
61. **Christensen GD**, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996-1006.
62. **Christie C**, Hammond J, Reising S, Evans-Patterson J. Clinical and molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in a pediatric teaching hospital. *J Pediatr* 1994;125:392-399.
63. **Chuang ON**, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ, Dunny GM. Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun* 2009;77:539-548.
64. **Clark NC**, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2311-2317.
65. **Clewell DB**, Weaver KE. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 1989;21:175–184.
66. **Clewell DB**. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993;73:9–12.
67. **Clewell DB**. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:90-102.

68. **Clewell DB**. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. In Bacterial conjugation. Plenum Press, New York 1993:349-367.
69. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement M100-S20. June 2010 Update. CLSI, Wayne, PA. 2010.
70. **Cocconcelli PS**, Porro D, Galandini S, Senini L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. Lett Appl Microbiol 1995;21:376–379.
71. **Colmar I**, Horaud T. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. Appl Environ Microbiol 1987;53:567–570.
72. **Conceição N**, Oliveira Cda C, Silva PR, Avila BG, Oliveira AG. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44:177-181.
73. **Coque TM**, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis 1995;171:1223-1229.
74. **Coque TM**, Steckelberg JM, Patterson JE, Murray BE. Possible virulence factors of enterococci, abstr. 1166. Program Abstr. 33rd Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 1993.
75. **Coque TM**, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States, Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2605–2609.
76. **Coque TM**, Willems RJ, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting

- the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2693-2700.
- 77.**Costerton JW**, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
- 78.**Costerton JW**, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;238:86-95.
- 79.**Costerton JW**, Lappin-Scott HM. Introduction to microbial biofilms. *In* Lappin-Scott HM and Costerton JW (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.1995:1-11.
- 80.**Costerton JW**, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-745.
- 81.**Creti R**, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004;53:13-20.
- 82.**Creti R**, Koch S, Fabretti F, Baldassarri L, Huebner J. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol* 2006;6:60.
- 83.**Cucarella C**, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001;183:2888-2896.
- 84.**Dautle MP**, Wilkinson TR, Gauderer MW. Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *J Pediatr Surg* 2003;38:216–220.
- 85.**Davies, DG**, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:860-867.
- 86.**Deshpande LM**, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from

- North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:163-170.
- 87.**Devriese LA**, Pot B, Collins MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* 1993;75:399–408.
- 88.**Dhanaraj V**, Ye QZ, Johnson LL, Hupe DJ, Ortwine DF, Dunbar JB Jr, et al. Designing inhibitors of the metalloproteinase superfamily: comparative analysis of representative structures. *Drug Des Discov* 1996;13:3-14.
- 89.**Di Rosa R**, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256:145–150.
- 90.**Difco Manual**. Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th ed., Difco Laboratories, Detroit 1984.
- 91.**Dillon R**, Fauci L. A microscale model of bacterial and biofilm dynamics in porous media. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:536-547.
- 92.**Donabedian SM**, Perri MB, Abdujamilova N, Gordoncillo MJ, Naqvi A, Reyes KC, et al. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan counties. *J Clin Microbiol* 2010;48:4156–4160.
- 93.**Donelli G**, Guaglianone E. Emerging role of *Enterococcus* spp in catheter-related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *J Vasc Access* 2004;5:3–9.
- 94.**Donlan RM**, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–193.
- 95.**Donlan RM**. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881–890.

96. **Dougherty SH**, Flohr AB, Simmons RL. 'Breakthrough' enterococcal septicemia in surgical patients. 19 cases and a review of the literature. *Arch Surg* 1983;118:232-238.
97. **Dougherty SH**: Role of enterococcus in intraabdominal sepsis. *Am J Surg* 1984;148:308-312.
98. **Dowidar N**, Moesgaard F, Matzen P. Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprotheses. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:1132–1136.
99. **Doyle PW**, Woodham JD. Evaluation of the microbiology of chronic ethmoid sinusitis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2396–2400.
100. **Draghi DC**, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. In vitro activity of linezolid against key gram-positive organisms isolated in the United States results of the LEADER 2004 surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5024–5032.
101. **Dramsi S**, Magnet S, Davison S, Arthur M. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:307-320.
102. **Duh RW**, Singh KV, Malathum K, Murray BE. In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist* 2001;7:39–46.
103. **Dupont H**, Montravers P, Mohler J, Carbon C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect Immun* 1998;66:2570–2575.
104. **Dupre I**, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003;52:491–498.
105. **Dutka-Malen S**, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1675-1677.

- 106.**Dutka-Malen S**, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:24-27.
- 107.**Dworniczek E**, Kuzko K, Mróz E, Wojciech Ł, Adamski R, Sobieszcańska B, et al. Virulence factors and in vitro adherence of *Enterococcus* strains to urinary catheters. *Folia Microbiol (Praha)* 2003;48:671–678.
- 108.**Dworniczek E**, Wojciech L, Sobieszczanska B, Seniuk A. Virulence of *Enterococcus isolates* collected in Lower Silesia (Poland). *Scand J Infect Dis* 2005;37:630–636.
- 109.**Eaton TJ**, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2002;216:269–275.
- 110.**Eaton TJ**, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1628–1635.
- 111.**Edelstein H**, McCabe RE. Perinephric abscess. Modern diagnosis and treatment in 47 cases. *Medicine (Baltimore)* 1988;67:118–131.
- 112.**Edmond MB**, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29:239-244.
- 113.**Ehrenfeld EE**, Kessler RE, Clewell DB. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J Bacteriol* 1986;168:6–12.
- 114.**Eliopoulos GM**, Eliopoulos CT. Therapy of enterococcal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:118–126.

115. **Eliopoulos GM**, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, Moellering RC Jr. Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:398-399.
116. **Eliopoulos GM**, Wennersten C, Zigelboim-Daum S, Reiszner E, Goldmann D, Moellering RC Jr. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1528-1532.
117. **Eliopoulos GM**. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clin Infect Dis* 2003;36:473-481.
118. **Elston JW**, Barlow GD. Community-associated MRSA in the United Kingdom. *J Infect* 2009;59:149-155.
119. **Ember JA**, Hugli TE. Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am J Pathol* 1989;134:797-805.
120. **Emori TG**, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:428-442.
121. **Evans AC**, Chinn AL. The Enterococci: With Special Reference to Their Association with Human Disease. *J Bacteriol* 1947;54:495-512.
122. **Evans DJ**, Allison DG, Brown MR, Gilbert P. Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to ceftrimide. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:473-478.
123. **Evers S**, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the [VanS.sub.B-] [VanR.sub.B] two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 1996;178:1302-1309.
124. **Evers S**, Sahm DF, Courvalin E. The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala: D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene* 1993;124:143-144.

125. **Facklam RR**, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, Editors. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, ASM, Washington, D.C. 2002:1–54.
126. **Facklam RR**, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989;27:731–734.
127. **Facklam RR**, Teixeira LM. *Enterococcus*. In: Lollier L, Balows A, Sussman M, editors. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections*. 9th ed. New York: Oxford University Press; 1998:669-682.
128. **Felmingham D**, Wilson AP, Quintana AI, Grüneberg RN. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1992;15:295–301.
129. **Ferretti JJ**, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol* 1986;167:631-638.
130. **Fines M**, Perichon B, Reynolds P, Sahn DF, Courvalin E. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2161-2164.
131. **Fitzgerald TJ**, Repesh LA. The hyaluronidase associated with *Treponema pallidum* facilitates treponemal dissemination. *Infect Immun* 1987;55:1023–1028.
132. **Fortún J**, Coque TM, Martín-Dávila P, Moreno L, Cantón R, Loza E, et al. Risk factors associated with ampicillin resistance in patients with bacteraemia caused by *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1003-1009.
133. **Fox J**, Isenberg HD. Antibiotic resistance of microorganisms isolated from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967;23:230–235.

134. **Franz CM**, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4385-9.
135. **Freeman DJ**, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42:872-874.
136. **Fujimoto S**, Clewell DB. Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6430-6435.
137. **Gales AC**, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009;13:90-98.
138. **Gallardo-Moreno AM**, Gonzalez-Martin ML, Perez-Giraldo C, Bruque JM, Gomez-Garcia AC. Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5784-5787.
139. **Gálvez A**, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Res Microbiol* 1989;140:57-68.
140. **Gálvez A**, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J Appl Bacteriol* 1990;69:406-413.
141. **Garbutt JM**, Littenberg B, Evanoff BA, Sahm D, Mundy LM. Enteric carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in patients tested for *Clostridium difficile*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:664-670.
142. **Garsin DA**, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10892-10897.

143. **Gastmeier P**, Schwab F, Bärwolff S, Rüden H, Grundmann H. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J Hosp Infect* 2006;62:181-186.
144. **Gilbert P**, Collier PJ, Brown MR. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1865-1868.
145. **Gilbert P**, McBain AJ. Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. *Am J Infect Control* 2001;29:252-255.
146. **Gilmore MS**, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE. Enterococcal virulence. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, Editors, *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, ASM, Washington DC. 2002: 301–354.
147. **Giridhara Upadhyaya PM**, Umopathy BL, Ravikumar KL. Comparative Study for the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin and Biofilm Among Clinical and Commensal Isolates of *Enterococcus Faecalis*. *J Lab Physicians* 2010;2:100-104.
148. **Giwerzman B**, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Høiby N. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:247-259.
149. **Godfree AF**, Kay D, Wyer MD. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1997;26:110S-119S.
150. **Goh SH**, Facklam RR, Chang M, Hill JE, Tyrrell GJ, Burns EC, et al. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J Clin Microbiol* 2000;38:3953–3959.

151. **Gold OG**, Jordan HV, van Houte J. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* 1975;20:473–477.
152. **Gonzales RD**, Schreckenberger PC, Graham MB, Kelkar S, DenBesten K, Quinn JP. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001;357:1179
153. **Goossens H**, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:iii5-12.
154. **Gordonn CA**, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:667-674.
155. **Hammerum AM**, Jensen LB. Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *J Clin Microbiol* 2002;40:4396.
156. **Hancock L**, Perego M. Two-component signal transduction in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2002;184:5819-5825.
157. **Hancock LE**, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* 2004;23:7951–7958.
158. **Harada T**, Tsuji N, Otsuki K, Murase T. Detection of the *esp* gene in high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* strains from pet animals in Japan. *Vet Microbiol* 2005;106:139-143.
159. **Harrington SM**, Ross TL, Gebo KA, Merz WG. Vancomycin resistance, *esp*, and strain relatedness: a 1-Year study of enterococcal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2004;42:5895-5898.

- 160.**Hasty DL**, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 1992;60:2147–2152.
- 161.**Hatch RA**, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:974-977.
- 162.**Hausner M**, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3710-3713.
- 163.**Hayden MK**. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31:1058-1065.
- 164.**Hayes JR**, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:7153–7160.
- 165.**Heikens E**, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007;189:8233–8240.
- 166.**Heikens E**, Leendertse M, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Bonten MJ, van der Poll T, et al. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol* 2009;9:19.
- 167.**Hendrickx AP**, Bonten MJ, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, Kragten AH, Willems RJ. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology* 2008;154:3212-3223.
- 168.**Hendrickx AP**, van Wamel WJ, Posthuma G, Bonten MJ, Willems RJ. Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. *J Bacteriol* 2007;189:8321-8332.
- 169.**Hendrickx AP**, Willems RJ, Bonten MJ, van Schaik W. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol* 2009;17:423-430.

170. **Henwood CJ**, Livermore DM, Johnson AP, James D, Warner M, Gardiner A. Susceptibility of gram-positive cocci from 25 UK hospitals to antimicrobial agents including linezolid. The Linezolid Study Group. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:931-940.
171. **Hershberger E**, Oprea SF, Donabedian SM, Perri M, Bozigar P, Bartlett P, et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:127-130.
172. **Hill RL**, Smith CT, Seyed-Akhavani M, Casewell MW. Bactericidal and inhibitory activity of quinupristin/dalfopristin against vancomycin- and gentamicin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:23-28.
173. **Hite KE**, Locke M, Heseltine HC. Synergism in experimental infections with nonsporulating anaerobic bacteria. *J Infect Dis* 1949;84:1-9.
174. **Hoepelman AI**, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun* 1992;60:1729–1733.
175. **Hoiby N**, Espersen F, Fomsgaard A, Giwercman B, Jensen ET, Johansen HK, et al. Biofilm, foreign bodies and chronic infections. *Ugeskr Laeger* 1994;156:5998-6005.
176. **Homan WL**, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1963–1971.
177. **Horvitz RA**, Von Graevenitz A. A clinical study of the role of enterococci as sole agents of wound and tissue infection. *Yale J Biol Med* 1977;50:391–395.
178. **Hospital Infections Program**. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990–May 1999. *Am J Infect Control* 1999;27:520–532.
179. **Hoyle BD, Wong CK, Costerton JW**. Disparate efficacy of tobramycin on Ca⁺²-, Mg⁺²-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Can J Microbiol* 1992;38:1214-1218.

- 180.<http://www.mednet.gr/whonet/> accessed in 14th of January 2012.
- 181.**Hufnagel M**, Hancock LE, Koch S, Theilacker C, Gilmore MS, Huebner J. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 2004;42:2548–2557.
- 182.**Hufnagel M**, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. J Infect Dis 2004;189:420–430.
- 183.**Hummell DS**, Winkelstein JA. Bacterial lipoteichoic acid sensitizes host cells for destruction by autologous complement. J Clin Invest 1986;77:1533–1538.
- 184.**Hunt M**. Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina. online: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>. 2006.
- 185.**Huycke MM**, Sahn DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci the nature of the problem and an agenda for the future, Emerg Infect Dis 1998;4:239–249.
- 186.**Huycke MM**, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1626-1634.
- 187.**Hynes WL**, Ferretti JJ. Sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. Infect Immun 1989;57:533–539.
- 188.**Ike Y**, Clewell DB. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. zymogenes can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. J Bacteriol 1992;174:8172-8177.
- 189.**Ike Y**, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. Infect Immun 1984;45:528–530.

- 190.**Ike Y**, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:1524–1528.
- 191.**Iwen PC**, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, Rupp ME, et al. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:494–495.
- 192.**Jackson CR**, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Ladely SR. High-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from swine. *Epidemiol Infect* 2005;133:367-371.
- 193.**Jackson CR**, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2004;42:3558–3565.
- 194.**Jacobs, L**, DeBruyn EE, Cloete TE. Spectrophotometric monitoring of biofouling. *Water Sci Technol* 1996;34:533-540.
- 195.**Jensen ET**, Kharazmi A, Garred P, Kronborg G, Fomsgaard A, Mollnes TE, et al. Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog* 1993;15:377-388. Erratum in: *Microb Pathog* 1994;16:83-84.
- 196.**Jensen ET**, Kharazmi A, Lam K, Costerton JW, Høiby N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect Immun* 1990;58:2383-2385.
- 197.**Jett BD**, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462-478.
- 198.**Johnson AP**. The pathogenicity of enterococci. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1083–1089.
- 199.**Johnston NJ**, Mukhtar TA, Wright GD. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* 2002;3:335-344.

200. **Jones CH**, Jacob-Dubuisson F, Dodson K, Kuehn M, Slonim L, Striker R, et al. Adhesin presentation in bacteria requires molecular chaperones and ushers. *Infect Immun* 1992;60:4445–4451.
201. **Jones RN**, Ross JE, Bell JM, Utsuki U, Fumiaki I, Kobayashi I, et al. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:404-413.
202. **Jones RN**, Ross JE, Castanheira M, Mendes RE. United States resistance surveillance results for linezolid (LEADER Program for 2007). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:416-426.
203. **Jones RN**, Ross JE, Fritsche TR, Sader HS. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004 report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:279–287.
204. **Jones WG**, Barie PS, Yurt RW, Goodwin CW. Enterococcal burn sepsis. A highly lethal complication in severely burned patients. *Arch Surg* 1986;121:649–653.
205. **Kampf G**, Hofer M, Wendt C. Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci in vitro. *J Hosp Infect* 1999;42:143-150.
206. **Kaplan AH**, Gilligan PH, Facklam RR. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J Clin Microbiol* 1988;26:1216-1218.
207. **Karanfil LV**, Murphy M, Josephson A, Gaynes R, Mandel L, Hill BC, et al. A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:195-200.
208. **Kaufhold A**, Ferrieri P. Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J Clin Microbiol* 1991;29:1075–1077.
209. **Kaye D**. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch Intern Med* 1982;142:2006–2009.

- 210.**Keane PF**, Bonner MC, Johnston SR, Zafar A, Gorman SP. Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. *Br J Urol* 1994;73:687–691.
- 211.**Klare I**, Heier H, Claus H, Bohme G, Marin S, Seltsmann G, et al. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist* 1995;1:265–272.
- 212.**Klare I**, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:815–825.
- 213.**Kleerebezem M**, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 1997;24:895-904.
- 214.**Klibi N**, Ben Slama K, Sáenz Y, Masmoudi A, Zanetti S, Sechi LA, et al. Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol* 2007;53:372-379.
- 215.**Koch S**, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004;22:822-830.
- 216.**Koneman EW**, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WJ, editors: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: JB Lippincott. 6th Edition. 2006.
- 217.**Koorevaar CT**, Scherpenzeel PG, Neijens HJ, Derksen-Lubsen G, Dzoljic-Danilovic G, de Groot R. Childhood meningitis caused by enterococci and viridans streptococci. *Infect* 1992;20:118-121.

218. **Kozłowicz BK**, Dworkin M, Dunny GM. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *Int J Med Microbiol* 2006;296:141-147.
219. **Krawczyk B**, Samet A, Bronk M, Hellmann A, Kur J. Emerging linezolid-resistant, vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient of a haematological unit in Poland. *Pol J Microbiol* 2004;53:193–196.
220. **Kreft B**, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992;60:25-30.
221. **Kristich CJ**, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004;186:154–163.
222. **Kristich CJ**, Nguyen VT, Le T, Barnes AM, Grindle S, Dunny GM. Development and use of an efficient system for random mariner transposon mutagenesis to identify novel genetic determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3377–3386.
223. **Kühnen E**, Richter F, Richter K, Andries L. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentbl Bakteriol Hyg A* 1988;267:322–330.
224. **Lawrence JR**, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991;173:6558-6567.
225. **Leavis H**, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 2004;186:672-682.
226. **Leclercq R**, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *E. faecium*. *N Engl J Med* 1988;319:157–161.

- 227.**Lemcke R**, Bulte M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanCl*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. Intern J Food Microbiol 2000;60:185–194.
- 228.**Lewis K**. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:999-1007.
- 229.**Libertin CR**, Dumitru R, Stein DS. The hemolysin-bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. Diagn Microbiol Infect Dis 1992;15:115-120.
- 230.**Lindahl G**, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens Clin Microbiol Rev 2005;18:102-127.
- 231.**Linden PK**. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. Drugs 2002;62:425-441.
- 232.**Liu D**, Wang C, Swiatlo EJ, Lawrence ML. PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol 2005;156:944–948.
- 233.**Livermore DM**. Overstretching the mutant prevention concentration. J Antimicrob Chemother 2003;52:732.
- 234.**Livornese LL Jr**, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, et al. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med 1992;117:112-116.
- 235.**Lopes Mde F**, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJ, Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. Int J Food Microbiol 2006;112:208-214.
- 236.**Low DE**, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the

- SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001;32:S133-145.
- 237.**Lowell SH**, Juhn SK. The role of bacterial enzymes in inducing inflammation in the middle ear cavity. Otolaryngol Head Neck Surg 1979;87:859–870.
- 238.**Lucas GM**, Lechtzin N, Puryear DW, Yau LL, Flexner CW, Moore RD. Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes. Clin Infect Dis 1998;26:1127-1133.
- 239.**Luginbuhl LM**, Rotbart HA, Facklam RR, Roe MH, Elliot JA. Neonatal enterococcal sepsis case-control study and description of an outbreak. Pediatr Infect Dis J 1987;6:1022–1026.
- 240.**Lumpkin O**. One-dimensional translational motion of a two-spring chain with strong nonlinear drag: A possible model for time-dependent DNA gel electrophoresis. Phys Rev A 1989;40:2634-2642.
- 241.**Lund B**, Billstrom H, Edlund C. Increased conjugation frequencies in clinical *Enterococcus faecium* strains harbouring the enterococcal surface protein gene *esp*. Clin Microbiol Infect 2006;12:588-591.
- 242.**Lutticken R**, Kunstmann. Vancomycin-resistant Streptococaceae from clinical material. Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A 1988;267:379-382.
- 243.**MacCallum WG**, Hastings TW. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* with a description of the microorganism. J Exp Med 1899;4:521-534.
- 244.**Macovel L**, Ghosh A, Thomas VC, Hancock LE, Mahmood S, Zurek L. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. Environ Microbiol 2009;11:1540-1547.
- 245.**Maira-Litrán T**, Allison DG, Gilbert P. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to

- moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. J Antimicrob Chemother 2000;45:789-795.
- 246.**Maki DG**, Agger WA. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. Medicine (Baltimore) 1988;67:248–269.
- 247.**Mäkinen PL**, Clewell DB, An F, Mäkinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). J Biol Chem 1989;264:3325-3334.
- 248.**Mäkinen PL**, Mäkinen KK. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. Biochem Biophys Res Commun 1994;200:981-985.
- 249.**Martens MG**, Faro S, Riddle G. Female genital tract abscess formation in the rat. Use of pathogens including enterococci. J Reprod Med 1993;38:719–724.
- 250.**Martinez Bueno MA**, Galvez A, Valdivia E, Maqueda M. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol 1990;172:2817-2818.
- 251.**Martone WJ**. Spread of vancomycin-resistant enterococci why did it happen in the United States? Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19:539–545.
- 252.**Mathee K**, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JI, Jensen P, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. Microbiology 1999;145:1349-1357.
- 253.**Matlow AG**, Bohnen JM, Nohr C, Christou N, Meakins J. Pathogenicity of enterococci in a rat model of fecal peritonitis. J Infect Dis 1989;160:142–145.
- 254.**Megran DW**. Enterococcal endocarditis. Clin Infect Dis 1992;15:63-71.
- 255.**Meka VG**, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. Clin Infect Dis 2004;39:1010-1015.

256. **Melhus A**, Tjernberg I. First documented isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden, Scand J Infect Dis 1996;28:191–193.
257. **Mendoza MT**. What's New in Antimicrobial Susceptibility Testing? Phil J Microbiol Infect Dis 1998;3:113–115.
258. **Menichetti F**. Current and emerging serious gram-positive infections, Clin Microbiol and Infect 2005;11:22–28.
259. **Michel JL**, Madoff LC, Olson K, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM. Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, bca, of group B streptococci. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:10060-10064.
260. **Mittelman MW**, Kohring LL, White DC. Multipurpose laminar-flow adhesion cells for the study of bacterial colonization and biofilm formation. Biofouling 1992;6:39-51.
261. **Miyake Y**, Yasuhara T, Fukui K, Suginaka H, Nakajima T, Moriyama T. Purification and characterization of neutrophil chemotactic factors of *Streptococcus sanguis*. Biochim Biophys Acta 1983;758:181–186.
262. **Moellering RC Jr**, Wennersten C, Weinstein AJ. Penicillin-tobramycin synergism against enterococci: a comparison with penicillin and gentamycin. Antimicrob Agents Chemother 1973;3:526-529.
263. **Moellering RC Jr**. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992;14:1173-1176.
264. **Moellering RC Jr**. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Oouglas and Bennett's. principles and practice of infectious diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2000;2:2147-2156.
265. **Moellering RC Jr**. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. Ann Intern Med 2003;138:135-142.

- 266.**Moellering RC**, Korzeniowski Jr OM, Sande MA, Wennersten CB. Species-specific resistance to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis*. J Infect Dis 1979;140:203-208.
- 267.**Moellering RC**, Korzeniowski Jr OM, Sande MA, Wennersten CB. Species-specific resistance to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis*. J Infect Dis 1979;140: 203-208.
- 268.**Mohamed JA**, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. J Med Microbiol 2007;56:1581-1588.
- 269.**Mohamed JA**, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun 2004;72:3658–3663.
- 270.**Mohamed JA**, Murray BE. Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. J Med Microbiol 2006;55:1747-1750.
- 271.**Mohamed JA**, Murray BE. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. J Clin Microbiol 2005;43:5405-5407.
- 272.**Mohamed, JA**, Teng F, Nallapareddy SR, Murray BE. Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA*-like genes, *salA* and *salB*, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. J Infect Dis 2006;193:231–240.
- 273.**Monroe D**. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol 2007;5:e307.
- 274.**Montgomerie JZ**, Kalmanson GM, Guze LB. Virulence of enterococci in experimental pyelonephritis. Urol Res 1977;5:99–102.
- 275.**Montravers P**, Andremont A, Massias L, Carbon C. Investigation of the potential role of *Enterococcus Faecalis* in the pathophysiology of experimental peritonitis. J Infect Dis 1994;169:821-830.

276. **Montravers P**, Mohler J, Saint Julien L, Carbon C. Evidence of the proinflammatory role of *Enterococcus Faecalis* in polymicrobial peritonitis in rats. *Infect Immun* 1997;65:144-149.
277. **Mundt JO**. Enterococci. In PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, and JG Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore 1986;2:1063-1065.
278. **Mundy LM**, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:513-522.
279. **Murray BE**. MD.: β -lactamase-producing Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992: 2355-2359.
280. **Murray BE**, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990;28:2059-2063.
281. **Murray BE**, Tsao J, Panida J. Enterococci from Bangkok, Thailand, with high-level resistance to currently available aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:799-802.
282. **Murray BE**. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:46-65.
283. **Mylonakis E**, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ausubel FM, et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* Gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model *Infect Immun* 2002;70:4678-4681.
284. **Naimi A**, Beck G, Branlant C. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology* 1997;143:823-834.
285. **Nakayama J**, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2001;41:145-154.

286. **Nakayama J**, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal *agrD*. *J Bacteriol* 2006;188:8321-8326.
287. **Nakayama J**, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3152–3155.
288. **Naser S**, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, et al. Phylogeny and identification of *Enterococci* by *atpA* gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43:2224–2230.
289. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 1999: document M100-S9, Vol. 19. No. 1, Table 2I.
290. **National Nosocomial Infections Surveillance**. National Nosocomial Infections Surveillance, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990–May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999;27:520–532.
291. **Nes IF**, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996;70:113-128.
292. **Nickel JC**, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:619-624.
293. **Novak RM**, Holzer TJ, Libertin CR. Human neutrophil oxidative response and phagocytic killing of clinical and laboratory strains of *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:1–6.

- 294.**Oliveira A**, Cunha MD. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes* 2010;3:260.
- 295.**Onderdonk AB**, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect Immun* 1976;13:22–26.
- 296.**Otto M**. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator agr system. *Peptides* 2001;22:1603–1608.
- 297.**Ozawa Y**, Courvalin P, Gaiimand M. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for d-alanine: d-alanine ligases. *Syst Appl Microbiol* 2000;23:230–237.
- 298.**Papavasileiou K**, Papavasileiou E, Tseleni-Kotsovoli A, Bersimis S, Nicolaou C, Ioannidis A, et al. Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1401-1405.
- 299.**Paulsen IT**, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003;299:2071–2074.
- 300.**Perichon B**, Reynolds P, Courvalin E. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2016-2018.
- 301.**Πετεινάκη Ε.**: Εντερόκοκκοι- Στρεπτόκοκκοι, ΕΚΜΕΔ. 2007, τόμος 11, τεύχος 2, σελ. 132-140.
- 302.**Phillips I**. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:101–107.
- 303.**Pillai SK**, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Murray BE, Inouye RT. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 2004;190:967–970.

304. **Pillai SK**, Sakoulas G, Gold HS, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, et al. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:2651-2652.
305. **Pinkus DH**. MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM. Biomerieux, Incl. Hazelwood, MO, USA: 1–7.
306. **Poeta P**, Costa D, Saenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, et al. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med* 2005;52:396-402.
307. **Pompei R**, Lampis G, Berlutti F, Thaller MC. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:2884–2886.
308. **Pournaras S**, Malamou-Lada H, Maniati M, Mylona-Petropoulou D, Vagiakou-Voudris H, Tsakris A, et al. Persistence of a clone of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* among patients in an intensive care unit of a Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:109-112.
309. **Prakash VP**. *Clinical prevalence, identification and molecular characterization of enterococci*. PhD thesis, Pondicherry University, India. 2005.
310. **Prigent-Combaret C**, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;181:5993-6002.
311. **Pultz NJ**, Shankar N, Baghdayan AS, Donskey CJ. Enterococcal surface protein Esp does not facilitate intestinal colonization or translocation of *Enterococcus faecalis* in clindamycin treated mice. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:217–219.
312. **Qin X**, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* 2001;183:3372–3382.

313. **Qin X**, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000;68:2579–2586.
314. **Quintiliani R Jr**, Courvalin P. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:359-363.
315. **Quintiliani R Jr**, Evers S, Courvalin P. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J Infect Dis* 1993;167:1220-1223.
316. **Raad II**, Hanna HA, Boktour M, Chaiban G, Hachem RY, Dvorak T, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, *esp* gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5046–5050.
317. **Rahim S**, Pillai SK, Gold HS, Venkataraman L, Inglima K, Press RA, et al. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. *Clin Infect Dis* 2003;36:E146–E148.
318. **Rakita RM**, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 1999;67:6067-6075.
319. **Ramadhan AA**, Hegedus E. Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol* 2005;58:685–686.
320. **Rantz LA**, Kirby WMM. Enterococcal infections: an evaluation of the importance of fecal streptococci and related organisms in the causation of human disease. *Arch Intern Med* 1943;71:516-528.

321. **Rasmussen M**, Björck L. Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2002;43:537-544.
322. **Rhinehart E**, Smith NE, Wennersten C, Gorss E, Freeman J, Eliopoulos GM, et al. Rapid dissemination of beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. *N Engl J Med* 1990;323:1814–1818.
323. **Rice LB**, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 2003;187:508–512.
324. **Richards MJ**, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics* 1999;103:e39.
325. **Richet H**, Hubert B, Nitemberg G, Andreumont A, Buu-Hoi A, Ourbak P, et al. Prospective multicenter study of vascular-catheter-related complications and risk factors for positive central-catheter cultures in intensive care unit patients. *J Clin Microbiol* 1990;28:2520–2525.
326. **Rioufol C**, Devys C, Meunier G, Perraud M, Gouillet D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *J Hosp Infect* 1999;43:203-209.
327. **Roberts JC**, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:2317-2320.
328. **Rosan B**, Williams NB. Hyaluronidase production by oral enterococci. *Arch Oral Biol* 1964;11:291–298.
329. **Rosato A**, Pierre J, Billot-Klein D, Buu-Hoi A, Gutmann L. Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:830-833.

- 330.**Routsis C**, Platsouka E, Armaganidis A, Paniara O, Roussos C. First emergence of glycopeptide-resistant enterococci infections in Greece. *Scand J Infect Dis* 2001;33:80.
- 331.**Rozdzinski E**, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 2001;30:211-220.
- 332.**Sader HS**, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the daptomycin surveillance program (2007-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:158-162.
- 333.**Sandoe JA**, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*. *J Med Microbiol* 2003;52:547-550.
- 334.**Sannomiya P**, Craig RA, Clewell DB, Suzuki A, Fujino M, Till GO, et al. Characterization of a class of nonformylated *Enterococcus faecalis*-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:66-70.
- 335.**Sartingen S**, Rozdzinski E, Muscholl-Silberhorn A, Marre R. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 2000;68:6044-6047.
- 336.**Satake S**, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:2325-2330.
- 337.**Sauer K**, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002;184:1140-1154.
- 338.**Schleifer KH**, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. re. as *Enterococcus faecalis*

- comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1984;34:31–34.
- 339.**Schultz-Haudt SD**, Scherp HW. Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by Viridans streptococci isolated from gingival crevices. J Dent Res 1955;34:924–929.
- 340.**Schwan WR**, Langhorne MH, Ritchie HD, Stover CK. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;38:23-28.
- 341.**Scott TM**, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of fecal human pollution. Environ Sci Technol 2005;39:283-287.
- 342.**Seno Y**, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. Acta Med Okayama 2005;59:79–87.
- 343.**Shankar N**, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Nature 2002;417:746–750.
- 344.**Shankar N**, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun 2001;69:4366-4372.
- 345.**Shankar V**, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun 1999;67:193-200.
- 346.**Shepard BD**, Gilmore MS. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. Infect Immun 2002;70:4344-4352.

- 347.**Sherman JM**. The streptococci. *Bacteriol Rev* 1937;1:3–97.
- 348.**Shlaes DM**, Levy J, Wolinsky E. Enterococcal bacteremia without endocarditis. *Arch Intern Med* 1981;141:578–581.
- 349.**Shockman GD**, Cheney MC. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. V. Nature of the autolysin-cell wall complex and its relationship to properties of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1969;98:1199-1207.
- 350.**Simonsen GS**, Bergh K, Bevanger L, Digranes A, Gaustad P, Melby KK, et al. Susceptibility to quinupristin-dalfopristin and linezolid in 839 clinical isolates of Gram-positive cocci from Norway. *Scand J Infect Dis* 2004;36:254-258.
- 351.**Simonsen GS**, Haaheim H, Dahl KH, Kruse H, Lovseth A, Olsvik O, et al. Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and vanA resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. *Microbial Drug Resistance* 1998;4:313–318.
- 352.**Singh KV**, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* 1998;178:1416-1420.
- 353.**Singh KV**, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1845-1850.
- 354.**Sohn AH**, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients. Results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr* 2001;139:821–827.
- 355.**Soltani M**, Beighton D, Philpott-Howard J, Woodford N. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:433-436.

- 356.**Sood RK**, Poth M, Shepherd S, Patel A, Naso R, Fattom A. Capsular serotyping of *Enterococcus faecalis*: isolation, characterization, and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from *E. faecalis* type 1. abstr. In Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1998;19:238.
- 357.**Souli M**, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:939-941.
- 358.**Stålhammar-Carlemalm M**, Areschoug T, Larsson C, Lindahl G. The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *J Bacteriol* 2007;189:8321-8332.
- 359.**Stålhammar-Carlemalm M**, Stenberg L, Lindahl G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med* 1993;177:1593-603.
- 360.**Stevens SX**, Jensen HG, Jett BD, Gilmore MS. A hemolysin-encoding plasmid contributes to bacterial virulence in experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1650-1656.
- 361.**Stickler D**. Biofilms. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:270-275.
- 362.**Su YA**, Sulavik MC, He P, Makinen KK, Makinen PL, Fiedler S, et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* 1991;59:415-420.
- 363.**Suara RO**, Dermody TS. Enterococcal meningitis in an infant complicating congenital cutis aplasia. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:668-669.
- 364.**Suci PA**, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2125-2133.

365. **Süssmuth SD**, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun* 2000;68:4900-4906.
366. **Svec P**, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedlacek I, et al. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005;247:59–63.
367. **Tamaki K**, Tanzawa K, Kurihara S, Oikawa T, Monma S, Shimada K, et al. Synthesis and structure-activity relationships of gelatinase inhibitors derived from matlystatins. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1995;43:1883-1893.
368. **Taylor RJ**. Efficacy of industrial biocides against bacterial biofilms. Ph.D. thesis. University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom 1996.
369. **Tendolkar PM**, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004;72:6032–6039.
370. **Tendolkar PM**, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622–2636
371. **Tendolkar PM**, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2005;187:6213–6222.
372. **Tendolkar PM**, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2006;188:2063–2072.
373. **Thiercelin ME**. Sur un diplocoque saphrophyte de l' intestin susceptible de devenir pathogene. *C R soc Biol* 1899;5:269-271.

374. **Thomas VC**, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* 2008;190:5690-5698
375. **Todd EW**, Hewitt LF. *J Path Bact* 1932;35:973-974.
376. **Todd EW**. A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal haemolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. *J Pathol Bacteriol* 1934;39:299-321.
377. **Toledo-Arana A**, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4538–4545.
378. **Toon P**, Brown PE, Baddiley J. The lipid–teichoic acid complex in the cytoplasmic membrane of *Streptococcus faecalis* N.C.I.B. 8191. *Biochem J* 1972;127:399–409.
379. **Tornieporth NG**, Roberts RB, John J, Hafner A, Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis* 1996;23:767-772.
380. **Treitman AN**, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol* 2005;43:462–463.
381. **Tresse O**, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:521-526.
382. **Trieu-Cuot P**, Courvalin P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*. 1983;23:331-341.
383. **Tsutsui O**, Koikeguchi S, Matsumura T, Kato K. Relationship of the chemical structure and immunobiological activities of lipoteichoic acid from *Streptococcus*

- faecalis* (*Enterococcus hirae*) ATCC 9790. FEMS Microbiol Immunol 1991;3:211–218.
384. **Ulrich A**, Muller T. Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR-amplified 16S rDNA. J Appl Microbiol 1998;84:293–303.
385. **Unsworth PF**. Hyaluronidase production in *Streptococcus milleri* in relation to infection. J Clin Pathol 1989;42:506–510.
386. **Updyke EL**, Nickle MI. A dehydrated medium for the preparation of type specific extracts of group A streptococci. Appl Microbiol 1954;2:117-118.
387. **Uttley AHC**, Collings CH, Naido J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988;1:57-58.
388. **Van der Auwera P**, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. J Infect Dis 1996;173:1129–1136.
389. **Van Merode AE**, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol 2006;188:2421–2426.
390. **Van Wamel WJ**, Hendrickx AP, Bonten MJ, Top J, Posthuma G, Willems RJ. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. Infect Immun 2007;75:924–931.
391. **Van Wamel WJ**, van Rossum G, Verhoef J, Vandenbroucke-Grauls CM, Fluit AC. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (agr)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. FEMS Microbiol Lett 1998;163:1-9.
392. **Vanek NN**, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;26:49-60.

393. **VanGuilder HD**, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 2008.
394. **Vasil ML**. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 1986;108:800–805.
395. **Vergis EN**, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, et al. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia: A prospective multicenter study. *Ann Intern Med* 2001;135:484–492.
396. **Vierstraete A**. Principle of PCR. University of Ghent. online: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. 1999.
397. **Vollaard EJ**, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:409–414.
398. **Vuong C**, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003;188:706-718.
399. **Waar K**, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, Slooff MJ, Harmsen HJ, Degener JE. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* 2002;185:1121-1127.
400. **Waar K**, van der Mei HC, Harmsen HJM, Degener JE, Busscher HJ. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. *Microbiol* 2002;148:1863-1870.
401. **Waters CM**, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* 2003;185:3613-3623.
402. **Wegener HC**, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999;5:329–335.

403. **Weinstein MP**, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:54–70.
404. **Weisblum B**. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:577-585.
405. **Weisblum B**. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:797-805.
406. **Wells CL**, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun* 2000;68:7190-7194.
407. **Wendt C**, Wiesenthal B, Dietz E, Rüdén H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1998;36:3734-3736.
408. **Werner G**, Strommenger B, Witte W. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiol* 2008;3:547-562.
409. **Wheeler AL**, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segars WI. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J Environ Qual* 2002;311:286-1293.
410. **Whitman RL**, Przybyla-Kelly K, Shively DA, Byappanahalli MN. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environ Sci Technol* 2007;41:6090-6095.
411. **Wicken AJ**, Elliott SD, Baddiley J. The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid. *J Gen Microbiol* 1963;31:231–239.
412. **Willems RJ**, Homan W, Top J, van Santen-Verheuvél M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 2001;357:853–855.

413. **Willems RJ**, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005;11:821–828.
414. **Wilson WR**, Wilkowske CJ, Wright AJ, Sande MA, Geraci JE. Treatment of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant enterococcal endocarditis. *Ann Intern Med* 100: 816-823.
415. **Wirth R**. The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur J Biochem* 1994;222:235-246.
416. **Woodford N**, Soltani M, Hardy KJ. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet* 2001;358:584.
417. **www.ecdc.europa.eu**. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2010.
418. **Xu Y**, Murray BE, Weinstock GM. A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun* 1998;66:4313–23.
419. **Xu Y**, Singh KV, Murray BE, Weinstock GM. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun* 2000;68:815–823.
420. **Zervos MJ**, Dembinski S, Mikesell T, Schaberg DR. High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis*: risk factors and evidence for exogenous acquisition of infection. *J Infect Dis* 1986;153:1075–1083.
421. **Zervos MJ**, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS, Schaberg DR. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*. An epidemiologic study. *Ann Intern Med* 1987;106:687–691.
422. **Zervos MJ**, Mikesell TS, Schaberg DR. Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:78-81.
423. **Zirakzadeh A**, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: Colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;8:529–536.

424. **Zobell CE**. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 1943;46:39-56.
425. **Zuo R**, Ornek D, Syrett BC, Green RM, Hsu CH, Mansfeld FB, et al. Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:275-283.



Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin

Giorgos Tsikrikonis^a, Antonios N. Maniatis^a, Maria Labrou^a, Eleni Ntokou^a, Giorgos Michail^a, Alexandros Daponte^b, Constantinos Stathopoulos^c, Athanassios Tsakris^d, Spyros Pournaras^{a,*}

^a Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece

^b Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece

^c Department of Biochemistry, Medical School, University of Patras, Patras, Greece

^d Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2011

Received in revised form

29 February 2012

Accepted 2 March 2012

Available online 15 March 2012

Keywords:

Enterococci

Pathogenicity

esp gene

fsrB gene

ABSTRACT

The present study investigated the possible correlation between carriage of the virulence genes *esp* and *fsrB*, production of hemolysin and gelatinase and biofilm formation in human vs. animal enterococcal isolates. A collection of 219 enterococcal isolates recovered from clinical and fecal surveillance samples of hospitalized patients and 132 isolates from animal feces were studied. Isolates were tested for hemolysin and gelatinase phenotypically and for quantitative biofilm production by a microtitre method. Genes *esp* and *fsrB* were detected by PCR. Human *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from both surveillance and clinical samples produced biofilm significantly more often than animal isolates ($P < 0.0001$ for both species). The quantity of biofilm did not differ significantly between human and animal isolates, while was significantly higher in *esp*-positive compared with *esp*-negative human *E. faecium* isolates ($P < 0.0001$). The frequency of *esp* gene carriage was significantly higher in human compared with animal *E. faecium* and *E. faecalis* isolates ($P < 0.0001$). The gene *fsrB* was detected significantly more often in animal than human *E. faecium* isolates ($P 0.004$). Hemolysin production was significantly more common in human clinical compared with animal *E. faecalis* isolates ($P < 0.0001$). Similar proportions of animal and human *E. faecalis* produced gelatinase, which was significantly correlated with the presence of *fsrB* gene ($P < 0.0001$) in both human clinical and animal *E. faecalis* isolates. The hemolysin trait did not exhibit any correlation with the presence of *esp* and *fsrB* genes, but appeared to be linked with enhanced quantity of biofilm production in both human clinical and animal *E. faecalis* isolates. Production of gelatinase was associated with the proportion and the degree of biofilm production mainly in animal *E. faecalis* isolates.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* are significant hospital pathogens, due to their resistance to antibiotics and their ability to survive in the hospital environment and to express several virulence factors [1]. Amongst them, the enterococcal surface protein (Esp), encoded by the gene *esp* [2,3], has been associated with increased virulence [4–7] and detected commonly in outbreak strains of vancomycin-resistant *E. faecium* [8,9]. It has also been observed that among *E. faecium*, the *esp* gene is commonly present in human but only occasionally in animal isolates [10].

The ability of enterococci to form biofilm is an important virulence property [11]. Biofilm production in medical devices can promote and sustain enterococcal infections [12] and increase resistance to antibiotics and host immune response [11,13]. The capacity to form biofilm is common among clinical *E. faecalis* isolates and it has been suggested to be restricted to strains harboring the *esp* gene [6]. However, other studies have indicated that *esp* may not be necessary for biofilm formation [14,15] and, overall, the exact factors involved in biofilm production by enterococci are still unknown. The gene *fsrB* is a part of the *fsr* gene cluster that encodes the gelatinase pheromone, regulates biofilm production in *E. faecalis* and contributes to the enterococcal virulence [16–22].

Hemolysin is a cytolytic protein capable of lysing human, horse and rabbit erythrocytes. Hemolysin-producing *E. faecalis* have been

* Corresponding author. Tel.: +30 2413 502929; fax: +30 2413 501570.
E-mail address: pournaras@med.uth.gr (S. Pournaras).

shown to be virulent in animal models and human infections [23–25] and associated with increased severity of infection [26]. To our knowledge, a possible correlation of hemolysin production with biofilm formation by enterococci has not been reported. Gelatinase is a protease that hydrolyzes gelatin, collagen and other peptides [27] and might play an important role in the severity of systemic disease [5,28]. Gelatinase has also been suggested to be involved in biofilm formation, by mediating signals arriving through the quorum-sensing *fsr* system [16].

The occurrence of *esp* and *fsrb* genes in clinical isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* is well-documented [29–31]. Previous studies have also analyzed the occurrence of these genes in human fecal enterococcal isolates [10,14,32], but data on their presence in animal enterococci is rather limited [33,34]. In addition, limited data is available regarding the capacity for biofilm formation among enterococci from animals [34], while, to our knowledge, no data is reported regarding possible differences in biofilm formation between enterococci of human and animal origin. The present study aimed to investigate the possible correlation between virulence factors, such as hemolysin and gelatinase and carriage of genes *esp* and *fsrb* and qualitative and quantitative biofilm formation in clinical and fecal human compared with animal enterococcal isolates.

2. Results

2.1. Occurrence of *esp*

As far as *E. faecalis*, 52.5% of the clinical isolates compared with 71.4% of the fecal human isolates were *esp*-positive (P 0.442). In contrast, significantly fewer *E. faecalis* animal isolates (10.3%) carried *esp* compared with *E. faecalis* isolates from human clinical ($P < 0.0001$) and fecal samples (P 0.001) (Table 1).

Amongst *E. faecium*, gene *esp* was carried in 69.2% of clinical isolates, compared with 38.3% of human fecal *E. faecium* (P 0.005), while only 3.1% of *E. faecium* animal isolates carried *esp*, being significantly fewer from *esp*-positive *E. faecium* fecal and clinical human isolates ($P < 0.0001$ in both cases) (Table 1).

The proportions of isolates carrying *esp* did not differ significantly between *E. faecalis* and *E. faecium*, regardless of whether they were recovered from clinical samples, human feces and animal feces (P 0.159, P 0.124 and P 0.28, respectively). It is of interest that one of the four human *Enterococcus gallinarum* isolates tested was found, for the first time in this species, to carry *esp* gene, while none of the 18 animal *E. gallinarum* isolates tested carried this gene.

2.2. Occurrence of *fsrb*

The gene *fsrb* was detected in none of *E. faecium* and 21.3% of *E. faecalis* human clinical isolates and in 1.1% of *E. faecium* and 14.3% of human fecal *E. faecalis* isolates. This gene was significantly more

common in animal *E. faecium* (12.5%) compared with clinical and fecal human *E. faecium* isolates (P 0.019 and P 0.015, respectively), while the frequency of *fsrb* in animal *E. faecalis* isolates (19.2%) was similar to that of fecal human *E. faecalis* and clinical *E. faecalis* isolates (P 1.000 and P 0.928, respectively) (Table 1). None of the four human *E. gallinarum* isolates tested and two of 18 (11.1%) animal *E. gallinarum* isolates carried *fsrb* gene.

2.3. Capacity for biofilm formation

E. faecalis isolates from clinical samples and human feces had a high capacity for biofilm formation, with 75.4% and 71.4% of isolates, respectively, to show a weak or strong formation. Amongst human *E. faecium* also, 71.1% of clinical and 64.9% of fecal isolates produced biofilm. Animal isolates had significantly lower capacity for biofilm formation (29.5% of animal *E. faecalis* and 34.4% of animal *E. faecium*) compared with human isolates ($P < 0.0001$ in both *E. faecalis* and *E. faecium*, Table 1). On the other hand, there was no difference in the capacity for biofilm formation between the clinical and fecal human isolates in both *E. faecalis* and *E. faecium* (P 1.000 and P 0.345, respectively).

2.4. Correlation of biofilm production with *esp* presence

As many as 83.8% of clinical *E. faecium* isolates that produced biofilm carried the gene *esp*, compared with 26.7% of the non-biofilm-producing isolates ($P < 0.0001$). Moreover, by using *T*-test it was found that *esp*-positive clinical *E. faecium* isolates produced higher mean value of biofilm (0.191 ± 0.082) than *esp*-negative isolates (0.118 ± 0.092 , P 0.007). Likewise, 60.9% of biofilm-producing and 26.7% of non-biofilm-producing clinical *E. faecalis* isolates carried *esp* (P 0.045). No significant difference in the mean value of biofilm was found between *esp*-positive and *esp*-negative clinical *E. faecalis* isolates (P 0.316).

Amongst the human fecal *E. faecium* isolates, 61.9% of biofilm-producing isolates and none of the non-biofilm-producing isolates carried the *esp* gene ($P < 0.0001$). The *esp*-positive *E. faecium* isolates from human feces were found to produce a higher mean value of biofilm (0.312 ± 0.181) than *esp*-negative isolates (0.153 ± 0.152) ($P < 0.0001$). As far as biofilm-producing *E. faecalis* isolates from human feces, 83.3% carried *esp* compared with 50% of non-biofilm-producing isolates (P 0.464) (Fig. 1). Also, there was no significant difference in the mean value of biofilm between fecal human *E. faecalis* isolates that were *esp*-positive and those that were *esp*-negative (P 0.737).

Amongst the animal isolates, 8.3% of the biofilm-producing *E. faecium* were *esp*-positive, whereas none of the non-biofilm-producing *E. faecium* isolates carried the gene (P 0.375). In addition, 30.4% of the biofilm-producing animal *E. faecalis* isolates were *esp*-positive, whereas only 1.8% of the non-biofilm-producing *E. faecalis* isolates carried *esp* (P 0.001). Moreover, the *esp*-positive animal *E. faecalis* isolates produced a significantly higher mean value of biofilm (0.240 ± 0.107) than *esp*-negative isolates (0.102 ± 0.080) ($P < 0.0001$) (Fig. 1). There was no significant difference in the mean value of biofilm between *esp*-positive and *esp*-negative animal *E. faecium* isolates (P 0.213).

2.5. Correlation of biofilm production with *fsrb* presence

Amongst human clinical enterococci, all *E. faecium* isolates were negative for *fsrb*, while among *E. faecalis*, 26.1% of the biofilm-producing compared with 6.7% of non-biofilm-producing isolates carried *fsrb* (P 0.156).

In human fecal isolates, equal proportions of biofilm-producing and non-biofilm-producing *E. faecium* and *E. faecalis* isolates carried

Table 1
Esp and *fsrb* genes carriage and biofilm formation in human and animal enterococcal isolates according to the origin of isolates.

Origin of isolates (n)	<i>esp</i> gene n (%)	<i>fsrb</i> gene n (%)	Biofilm formation n (%)
<i>E. faecium</i>			
Clinical samples (52)	36 (69.2%)	0	37 (71.1%)
Human feces (94)	36 (38.3%)	1 (1.1%)	61 (64.9%)
Animal feces (32)	1 (3.1%)	4 (12.5%)	11 (34.4%)
<i>E. faecalis</i>			
Clinical samples (61)	32 (52.5%)	13 (21.3%)	46 (75.4%)
Human feces (7)	5 (71.4%)	1 (14.3%)	5 (71.4%)
Animal feces (78)	8 (10.3%)	15 (19.2%)	23 (29.4%)

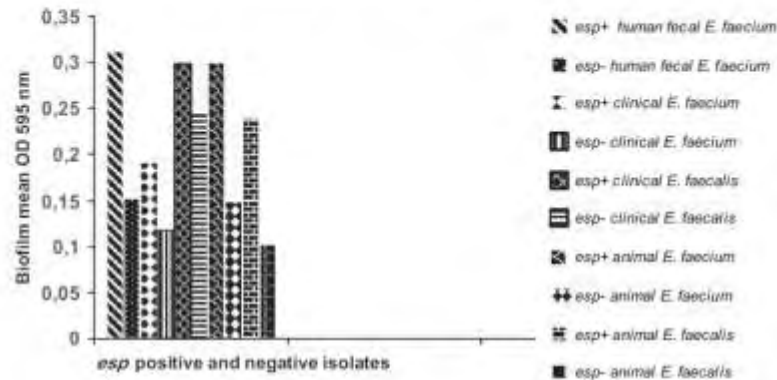


Fig. 1. Quantitative biofilm formation in *esp*-positive and *esp*-negative enterococcal isolates.

the *fsrB* gene ($P < 0.0001$). The *fsrB*-positive *E. faecium* and *E. faecalis* isolates from human feces were found to produce higher mean values of biofilm that did not differ significantly from those of the *fsrB*-negative isolates ($P < 0.124$ and $P < 0.277$ respectively).

As far as the animal isolates, 41.7% of biofilm-producing and none of non-biofilm-producing *E. faecium* isolates carried *fsrB* ($P < 0.004$). Likewise, 56.5% of the biofilm-producing and 5.5% of non-biofilm-producing animal *E. faecalis* isolates carried *fsrB* ($P < 0.0001$). Animal *E. faecium*, *E. faecalis* and *E. gallinarum* isolates that were *fsrB*-positive produced significantly higher mean values of biofilm (0.293 ± 0.043 , 0.210 ± 0.103 and 0.221 ± 0.045 , respectively) than the *fsrB*-negative isolates (0.129 ± 0.096 , 0.095 ± 0.076 and 0.090 ± 0.067 , respectively) ($P < 0.001$, $P < 0.0001$ and $P < 0.017$, respectively) (Fig. 2).

2.6. Production of hemolysin and gelatinase and correlation with biofilm production

The production of hemolysin and gelatinase by human and animal isolates according to the origin isolation is shown in Table 2. The proportion of hemolysin-producing *E. faecium* was generally low and did not differ significantly between *E. faecium* recovered from human and animal samples. In *E. faecalis*, similar proportions of human clinical and fecal isolates produced hemolysin ($P < 0.691$), while hemolysin-producing animal *E. faecalis* were significantly fewer when compared with the hemolytic human clinical *E. faecalis* ($P < 0.0001$).

Similar proportions of biofilm-producing and non-producing human clinical *E. faecium* and *E. faecalis* produced hemolysin, but hemolytic clinical *E. faecalis* produced higher mean biofilm values than non-hemolytic isolates (0.351 ± 0.272 vs. 0.214 ± 0.142 , $P < 0.044$). Also, similar proportions of biofilm-producing and non-producing *E. faecium* and *E. faecalis* from human feces produced hemolysin and similar mean biofilm values were produced by hemolytic and non-hemolytic isolates. Among animal isolates, hemolytic *E. faecalis* produced higher mean biofilm values than non-hemolytic isolates (0.213 ± 0.106 vs. 0.111 ± 0.090 , $P < 0.018$, Fig. 3).

Gelatinase was produced significantly more commonly by animal than clinical and fecal human *E. faecium* isolates ($P < 0.007$ and $P < 0.028$, respectively), while similar proportions of animal and human clinical *E. faecalis* produced gelatinase. Among human clinical *E. faecalis*, 41.3% of the biofilm-producing compared with 13.3% of biofilm-non-producing isolates produced gelatinase ($P < 0.096$) and the quantity of biofilm did not differ significantly between gelatinase-positive and -negative isolates ($P < 0.170$). Among human fecal enterococci, equal proportions of biofilm-producing and non-producing *E. faecium* and *E. faecalis* were gelatinase-positive, but gelatinase-positive produced higher mean biofilm values than gelatinase-negative isolates ($P < 0.244$ and $P < 0.021$ respectively). Finally, among animal isolates, gelatinase production was observed in 80.0% of biofilm-producing vs. 20.0% non-producing *E. faecium* ($P < 0.053$) and 52.2% of biofilm-producing vs. 16.4% non-producing *E. faecalis* ($P < 0.003$), while gelatinase-positive *E. faecium* and

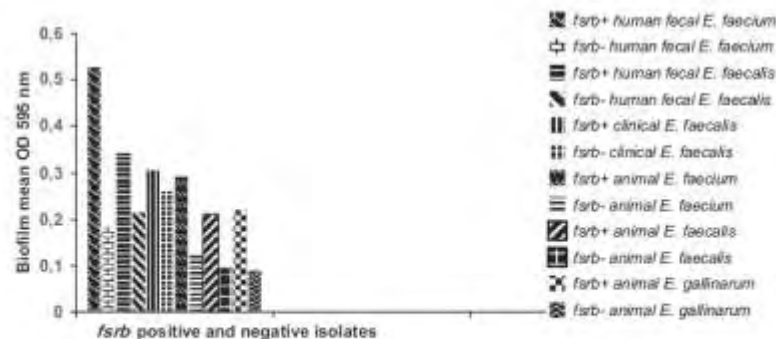


Fig. 2. Quantitative biofilm formation in *fsrB*-positive and *fsrB*-negative isolates.

Table 2
Production of hemolysin and gelatinase according to the origin of human or animal isolates.

Origin of isolates (n)	Hemolysin production n (%)	Gelatinase production n (%)
<i>E. faecium</i>		
Clinical samples (52)	1 (1.9%)	0
Human feces (94)	3 (3.2%)	1 (1.1%)
Animal feces (32)	1 (3.1%)	5 (15.6%)
<i>E. faecalis</i>		
Clinical samples (61)	26 (42.6%)	21 (34.4%)
Human feces (7)	2 (28.6%)	2 (28.6%)
Animal feces (78)	5 (6.4%)	21 (26.9%)

E. faecalis produced higher mean biofilm values than gelatinase-negative isolates (P 0.100 and P 0.003, respectively).

In the subgroup of *esp*-negative isolates, we found that 58.8% of gelatinase-positive animal *E. faecalis* produced biofilm compared with 11.3% of gelatinase-negative isolates ($P < 0.0001$). Among *esp*-negative animal *E. faecium* isolates, gelatinase production was observed in 75.0% of biofilm-producing vs. 25.9% non-producing isolates (P 0.087). Moreover, by using *T*-test it was found that *esp*-lacking animal *E. faecalis* and *E. faecium* that were gelatinase-positive produced higher mean biofilm values than gelatinase-negative isolates ($P < 0.0001$ and P 0.258 respectively, Fig. 4). Among *esp*-negative human clinical and fecal isolates production of gelatinase was not significantly associated with biofilm production.

2.7. Correlation of hemolysin and gelatinase production with presence of *esp* and *fsrB*

No significant correlation was found between hemolysin production and presence of *esp* and *fsrB* genes in both human and animal isolates. In addition, we found no significant correlation between production of gelatinase and presence of *esp* in human and animal enterococci.

Among human clinical enterococci, all *E. faecium* isolates were negative for *fsrB* gene and gelatinase production, while among *E. faecalis*, 61.9% of the gelatinase-positive isolates compared with 0% of gelatinase-negative isolates carried *fsrB* ($P < 0.0001$).

In human fecal isolates 100% of the gelatinase-positive and 0% of gelatinase-negative *E. faecium* isolates were positive for *fsrB* (P 0.019), whereas in *E. faecalis* equal proportions of gelatinase-positive and gelatinase-negative isolates were *fsrB*-positive (P 0.286).

As far as the animal isolates, 52.4% of animal *E. faecalis* isolates that were gelatinase-positive were positive for *fsrB*, compared with 8.8% of those that were gelatinase-negative ($P < 0.0001$). Likewise as many as 40% of the gelatinase-positive and 7.4% of the gelatinase-negative *E. faecium* isolates were positive for *fsrB* (P 0.105).

2.8. Correlation of vancomycin resistance with biofilm formation, *esp* presence, and *fsrB* presence

We used Fisher's exact test, Crosstabs analysis and Chi-square test to evaluate vancomycin resistance in relation to biofilm formation. The difference in biofilm formation between human vancomycin-resistant (VRE) and vancomycin-susceptible (VSE) isolates was not significant (P 0.704 and P 0.189 in clinical *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively; P 0.681 and P 0.429 in fecal *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively).

No significant correlation was also found between vancomycin resistance and presence of *esp* in human isolates (P 0.475 and P 0.147 for clinical *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively; P 0.233 and P 0.429 for fecal *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively).

Furthermore we found no significant correlation between vancomycin resistance and the presence of *fsrB* in the human isolates (P 0.180 for clinical *E. faecalis*; P 1.000 and P 1.000 for fecal human *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively). All clinical *E. faecium* isolates were *fsrB* negative.

We did not correlate biofilm formation and presence of *esp* and *fsrB* with vancomycin resistance in animal isolates, due to the very low numbers of VRE in animal samples.

2.9. Biofilm formation and *esp* gene carriage according to site of isolation

The animal enterococci were weak biofilm producers (mean value 0.124 ± 0.095) (Fig. 3). Statistical analysis (Spearman test) showed that although isolates from human feces and from clinical samples were stronger biofilm producers (mean value of biofilm 0.227 ± 0.187 and 0.224 ± 0.177 , respectively) compared with animal isolates, the difference was not significant (P 0.347 and P 0.666 respectively, Fig. 5). As far as the site of isolation, it was found that clinical isolates from urine, blood or other sites were carrying *esp* gene in similar rates (63.6, 55.9 and 55.6%, respectively) and also formed biofilm in similar rates (75, 67.6 and 50%, respectively) (Table 3). When we compared quantitative biofilm production according to the site of isolation, isolates recovered from urinary tract infections (UTIs) had stronger biofilm production than isolates

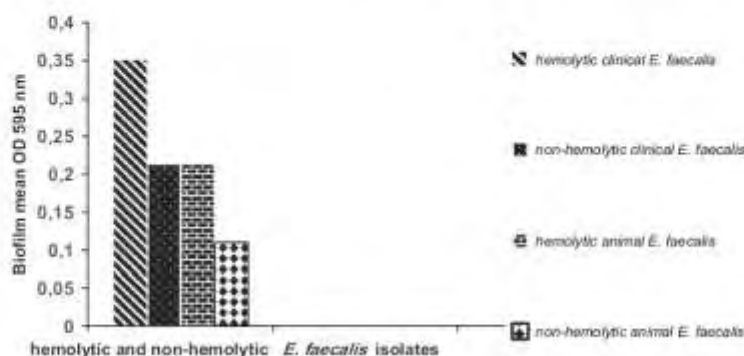


Fig. 3. Quantitative biofilm formation in hemolytic and non-hemolytic *E. faecalis* isolates.

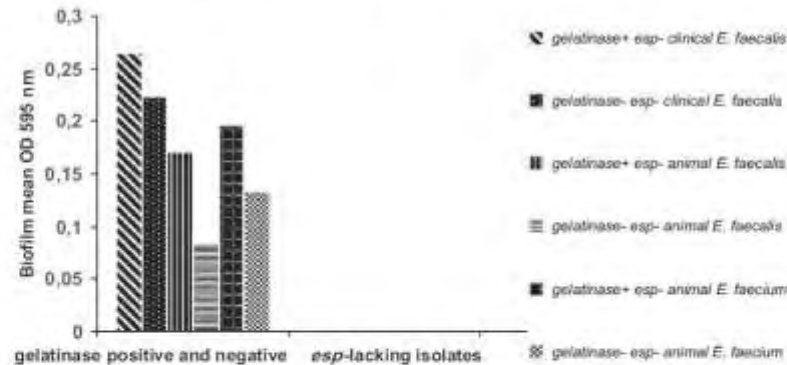


Fig. 4. Quantitative biofilm formation in gelatinase-positive and gelatinase-negative *esp*-lacking isolates.

from other sites, with the difference to be significant with blood isolates (P 0.046, Fig. 6).

3. Discussion

The gene *esp* was detected significantly more often among *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human than animal sources. This is in agreement with other studies [8,33] that also reported a higher prevalence of *esp* among clinical and fecal human compared with animal enterococci and also with another study that reported absence of *esp* in animal *E. faecium* isolates [9]. Further, we detected for the first time *esp* gene in *E. gallinarum*.

The significantly higher incidence of *esp* gene in clinical isolates may reflect a role that Esp protein has in infection. Additionally to its role in adhesion, Esp is also thought to play a role in evasion of the host immune response, which is an important factor in the disease development [2]. The low presence of *esp* among animal fecal isolates could indicate a lower pathogenicity compared with the clinical isolates.

The gene *fsrB*, known to be carried mostly by *E. faecalis* [16,18,19], was detected also in 12.5% of animal *E. faecium* isolates

but only in minute, significantly lower proportions of human *E. faecium* isolates.

Similar rates of human *E. faecalis* and *E. faecium* isolates had capacity for biofilm formation. The prevalence of biofilm production reported previously for clinical isolates has been variable [35]. For instance, in a study from Italy 80% of *E. faecalis* and 48% of *E. faecium* isolates from infected patients were able to form biofilm [36], while another study from Italy reported biofilm production among 87% of *E. faecalis* and only 16% of *E. faecium* clinical isolates [29].

In this study, we compared directly the biofilm formation between animal and human enterococcal isolates and found that the animal isolates exhibited a significantly lower capacity for biofilm formation than isolates from human samples ($P < 0.0001$). To our knowledge, there is no study that made direct comparison of biofilm formation of animal vs. human enterococci, while only one study has tested biofilm formation in animal enterococci [34]. This study Ref. [34], reported that 30.5% of 396 enterococci from food animals had the potential to form biofilm, while in our study 29.5% of *E. faecalis* and 34.4% of *E. faecium* from animals formed biofilm.

We also observed that human and animal isolates positive for the *esp* gene produced higher mean values of biofilm than *esp*-negative isolates. However, in our clinical and fecal human enterococci, this difference was significant only in *E. faecium* isolates, whereas amongst animal isolates the result was significant only in the *E. faecalis* isolates.

The incidence of *esp* gene was significantly higher in the clinical *E. faecium* and *E. faecalis* isolates that produced biofilm than in the non-biofilm-producing clinical isolates. Heikens et al. [37] also reported that the carriage of *esp* is important for biofilm formation of *E. faecium* and found that *esp* insertion-deletion mutants of *E. faecium* had significantly lower biofilm formation compared to the wild-type strains. It was also reported that 93.5% of *esp*-positive but none of the *esp*-negative *E. faecalis* isolates formed biofilm on abiotic surfaces and the insertional inactivation of *esp* in two *E. faecalis* mutants resulted in impaired biofilm production [6]. It was thus suggested that the Esp protein promotes biofilm

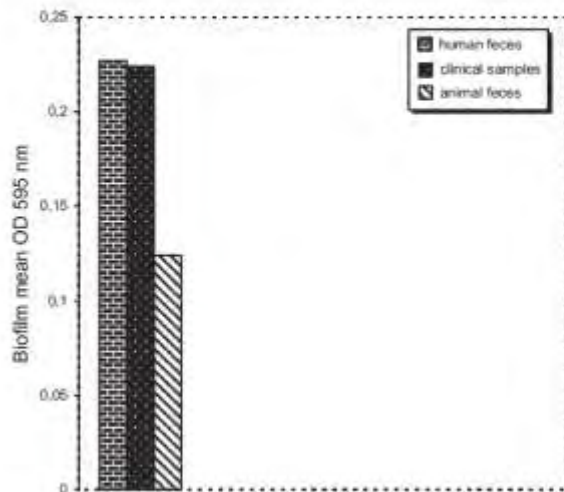


Fig. 5. Quantitative biofilm formation according to the origin of enterococci.

Table 3
Carriage of *esp* gene and biofilm formation in human clinical enterococci according to the site of isolation.

Site of isolation (n)	<i>esp</i> gene n (%)	Biofilm formation n (%)
Urine (n = 44)	28 (63.6%)	33 (75%)
Blood (n = 34)	19 (55.9%)	23 (67.6%)
Other sites (n = 36)	20 (55.6%)	18 (50%)

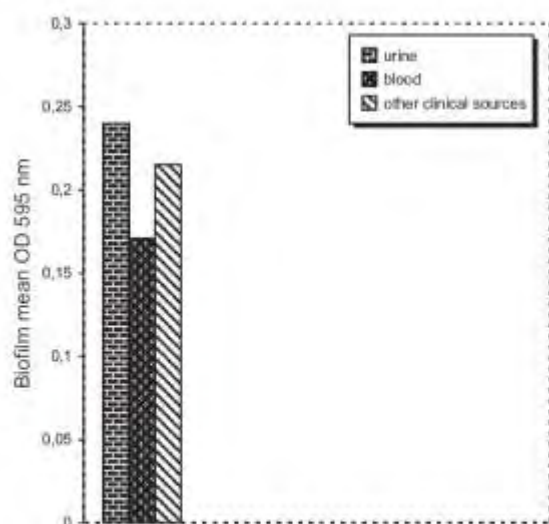


Fig. 6. Quantitative biofilm formation in clinical enterococci, according to site of isolation.

formation of *E. faecalis*, with additional determinants to possibly also contribute to biofilm formation [6]. Nevertheless, other studies [16,38,39] found no correlation between biofilm formation and the presence or absence of the *esp* gene in *E. faecalis* isolates.

We noted that some *esp*-positive *E. faecalis* and *E. faecium* isolates did not produce biofilm, as was also reported by other studies [40,41]. Previous studies [36,42–44] have shown that other genes, such as *bopD*, *epa*, *icaA* may affect biofilm formation in *E. faecalis*. Also, the lack of biofilm formation in *esp*-positive *E. faecium* strains may be explained by absence or low-level expression of functional Esp on the cell surface despite the presence of its gene, as was suggested previously [38].

The *fsrB*-positive animal isolates were significantly stronger biofilm producers than the *fsrB*-negative isolates. This could indicate a different role for *fsrB* in the formation of biofilm in animal enterococci. Hancock and Perego [16] also showed that in *E. faecalis* V583 the Fsr quorum-sensing system controls biofilm development. Our study reports for the first time that *fsr* correlates with biofilm development not only in *E. faecalis* as reported previously [16,45,46], but also in *E. faecium* and *E. gallinarum*.

Hemolysin plays an important role in enterococcal virulence, as it may increase the severity of the infection [47,48]. Among both *E. faecium* and *E. faecalis*, a proportion of isolates produced hemolysin, with the incidence of this trait being higher for clinical *E. faecalis* strains (42.6%). Ike et al. [25] showed that 60% of clinical *E. faecalis* isolates were hemolytic compared to 17% of strains from uninfected sources. The incidence of hemolysin in our study was slightly lower than that reported by Ike et al. and similar to the incidence for *E. faecalis* strains (44%) reported by Eaton and Gasson [49]. Interestingly, the hemolysin trait appeared to be linked quantitatively with biofilm formation in clinical and animal *E. faecalis* isolates, which to our knowledge is reported for the first time. However, hemolysin production did not exhibit any significant correlation with the presence of *esp* and *fsrB* genes in human or animal isolates.

None of the clinical *E. faecium* strains and 34.4% of clinical *E. faecalis* strains were found to produce gelatinase. Kühnen et al. [50] reported a high (63.7%) incidence of gelatinase production

among clinical enterococci, while Di Rosa et al. [41] reported gelatinase production by 37% of clinical *E. faecalis* isolates, similarly to our study. Production of gelatinase appeared to be linked with the proportion and the quantity of biofilm production in animal *E. faecalis* isolates and the quantity of biofilm production in human fecal *E. faecalis* isolates. Further analysis of the subgroup of *esp*-negative human and animal isolates showed that the ability to produce gelatinase was positively associated with biofilm formation only in animal *E. faecalis* isolates and not in the human isolates. This could indicate that production of this protease may be a selection mechanism for animal *E. faecalis*, as it may enable the *esp*-lacking animal isolates to produce biofilm. Although genetic manipulation studies have confirmed that gelatinase is essential for biofilm formation [16,45], epidemiological studies have not supported the link between gelatinase and biofilm production among clinical *E. faecalis* isolates [41,51]. Similarly to these studies, we did not find any significant correlation between gelatinase and biofilm production among the clinical *E. faecalis* isolates.

None of the 52 clinical *E. faecium* isolates in this study showed gelatinase activity, similarly to the results of Eaton and Gasson [49], suggesting that gelatinase production by this species is not common. Gelatinase activity showed significant correlation with the presence of *fsrB* gene in clinical and animal *E. faecalis* isolates and in human fecal *E. faecium* isolates. This can be explained by the fact that synthesis of gelatinase in *E. faecalis* is regulated by the *fsr* locus [18]. No correlation was found between production of gelatinase and presence of *esp* gene in human and animal isolates, similarly to another study where the *esp* gene and the ability to produce gelatinase were only rarely associated in clinical *E. faecalis* or *E. faecium* isolates [41].

No correlation was found in fecal human, clinical and animal isolates between the presence of *esp* and *fsrB* genes and vancomycin resistance. In addition, no significant correlation was found between vancomycin resistance and biofilm formation in the clinical and fecal human or animal isolates.

Isolates from urine, blood or other sites were carrying *esp* gene and producing biofilm in similar rates, indicating that these factors were not correlated with the infection caused by these isolates. However, isolates recovered from urinary tract infections (UTIs) were found to be stronger biofilm producers than isolates from other sites. This observation is in accordance with another study [52], which also found that among clinical isolates from different sites, biofilm production is highest among urinary isolates [52].

In conclusion, we compared directly the biofilm formation between *E. faecium* and *E. faecalis* isolates from human and animal origin and observed that the proportion of isolates producing biofilm is significantly higher among human than animal isolates. This observation could have significant implications for the ability of enterococci derived from animal vs. human sources to cause persistent infections. Although the *esp* gene was not required for biofilm formation, its presence was shown to be significantly associated with the proportion and the degree of biofilm production in both human and animal isolates, while *fsrB* had significant association with biofilm formation in animal enterococci. In addition, production of hemolysin was quantitatively correlated with biofilm formation in both clinical and animal *E. faecalis* isolates, whereas gelatinase production had significant association with biofilm formation mainly in animal *E. faecalis* isolates.

4. Materials and methods

4.1. Isolates

Two hundred and nineteen human enterococcal isolates (73 *E. faecalis*, 141 *E. faecium*, 4 *E. gallinarum* and 1 *Enterococcus durans*)

from our collection were included in this study. These isolates were recovered from various clinical and fecal surveillance samples of separate patients hospitalized in different wards of the University Hospital of Larissa and the Hippokraton Hospital of Thessaloniki, Greece (Table 4). The human isolates included 75 VSE and 144 VRE isolates. Testing for vancomycin susceptibility was done by Etest (BioMérieux, Solna, Sweden) and interpreted according to CLSI interpretative criteria [53].

As far as the animal isolates, 132 enterococcal isolates (79 *E. faecalis*, 32 *E. faecium*, 18 *E. gallinarum* and 3 *Enterococcus casseliflavus*) were obtained from swine feces, collected from four different farms in the area of Thessaly. Our animal collection included 128 VSE and four VRE isolates. Both human and animal isolates were identified by the automatic Vitek 2 system.

4.2. PCR

Enterococcal DNA was prepared by boiling a loopful of overnight colonies suspended in distilled water and centrifuging at 14 000 g for 5 min. An aliquot of the supernatant (5 µl) was used as the template for PCR reactions. Amplification of the *esp* gene was done by using primers Esp 11 and Esp 12 [54]. The *fsrB* gene was determined by PCR using primers fsrBF1 and fsrBF2 [31].

4.3. Hemolysin production

Production of hemolysin was indicated by the formation of clear zones of β-hemolysis surrounding the colonies on blood agar plates, which were prepared using Columbia blood agar base with 5% defibrinated human blood. Plates were incubated at 37 °C and observed after 24 and 48 h [55].

4.4. Gelatinase production

Screening for gelatinase production was carried out on Todd-Hewitt agar plates containing 3% gelatin (30 g/L). After overnight incubation at 37 °C, the plates were cooled for 5 h at 4 °C. Hydrolysis of gelatin was determined by screening the plates for the appearance of a turbid halo around the colonies [16].

4.5. Biofilm production

To test for biofilm formation, we used a previously described quantitative adherence assay [41]. Briefly, a 1:10 dilution of overnight cultures in Tryptone Soy Broth was used to inoculate wells in a microtitre polystyrene plate. After 24 h growth at 37 °C, the plates were gently washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). The plates were inverted and allowed to dry for 1 h at room temperature. For biofilm quantification, 200 µl of 0.2% aqueous crystal violet solution was added to each well, and the plates were allowed to stand for 15 min. The wells were subsequently washed

thrice with sterile PBS to wash off the excess crystal violet. Crystal violet bound to the biofilm was extracted with 200 µl of a dilution of acetic acid, and the absorbance of the extracted crystal violet was measured at 595 nm in an automatic spectrophotometer. Their ability to form biofilm was scored as follows: OD < 0.120, non producers, 0.120 < OD < 0.240, weak producers, OD > 0.240, strong producers [41]. As a control, crystal violet binding to wells was measured for wells exposed only to the medium with no bacteria. All biofilm assays were performed in triplicate.

4.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS v.15 statistical software. Results are expressed as mean ± SD. Data were analyzed by T-test, non Parametric Mann–Whitney U test, Crosstabs Chi-square, Fischer's exact test and Spearman test. A P value of <0.05 was considered as statistically significant.

Acknowledgements

This study was funded by the project 'Biofilm and infections' of the Research Committee of the University of Thessaly.

References

- [1] Harrington SM, Ross TL, Gebo KA, Merz WG. Vancomycin resistance, *esp*, and strain relatedness: a 1-Year study of enterococcal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2004;42:5895–8.
- [2] Shankar V, Baghdayan AS, Hoyde MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999;67:193–200.
- [3] Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2002;216:269–75.
- [4] Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G, Creti R. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet* 2001;357:1802.
- [5] Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001;69:4366–72.
- [6] Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4538–45.
- [7] Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, Slooff MJ, Harmsen HJ, Degener JE. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* 2002;185:1121–7.
- [8] Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 2003;187:508–12.
- [9] Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheulvel M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 2001;357:853–5.
- [10] Scott TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of fecal human pollution. *Environ Sci Technol* 2005;39:283–7.
- [11] Donelli G, Guaglianone E. Emerging role of *Enterococcus* spp in catheter-related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *J Vasc Access* 2004;5:3–9.
- [12] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881–90.
- [13] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93.
- [14] Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004;72:3658–63.
- [15] Dworniczek E, Kuzko K, Mróz E, Wojciech L, R Adamski, Sobieszczanska B, et al. Virulence factors and in vitro adherence of *Enterococcus* strains to urinary catheters. *Folia Microbiol (Praha)* 2003;48:671–8.
- [16] Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* 2004;23:7951–8.
- [17] Garvin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10892–7.
- [18] Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RE. *J Bacteriol* 2001;183:3372–82.

Table 4
Site of isolation of human clinical enterococcal isolates.

Clinical samples	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Urine	7	37
Blood	25	8
Pus	4	1
Bronchial	2	0
Wound swabs	1	1
Skin swabs	0	3
Ascites	0	2
Vaginal	6	8
Other sources	7	1
Total	52	61

- [19] Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ausubel FM, et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* Gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun* 2002;70:4678–81.
- [20] Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2001;41:145–54.
- [21] Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000;68:2579–86.
- [22] Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides* 2001;22:1603–8.
- [23] Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun* 1984;45:528–30.
- [24] Chow JW, Thal LA, Perri MR, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2474–7.
- [25] Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:1524–8.
- [26] Johnson AP. The pathogenicity of enterococci. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1083–9.
- [27] Kreft B, Manne R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992;60:25–30.
- [28] Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004;53:13–20.
- [29] Dupre I, Zanetti S, Schito AM, Fadde G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003;52:491–8.
- [30] Kilibi N, Ben Slama K, Sáenz Y, Masmoudi A, Zanetti S, Sechi LA, et al. Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol* 2007;53:372–9.
- [31] Roberts JC, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:2317–20.
- [32] Whitman RL, Przybyla-Kelly K, Shively DA, Byappanahalli MN. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environ Sci Technol* 2007;41:6090–5.
- [33] Dupont H, Montravers P, Mohler J, Carbon C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect Immun* 1998;66:2570–5.
- [34] Macovel L, Ghosh A, Thomas VC, Hancock LE, Mahmood S, Zurek L. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environ Microbiol* 2009;11:1540–7.
- [35] Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* 2007;56:1581–8.
- [36] Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendola MG, Iosi F, Arciola CR, et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* 2001;190:113–20.
- [37] Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007;189:8233–40.
- [38] Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, Top J, Posthuma G, Willems RJ. Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 2007;75:924–31.
- [39] Kristich CJ, Li YH, Cvitkovich DG, Dunne GM. *Esp* independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004;186:154–63.
- [40] van Merode AE, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2006;188:2421–6.
- [41] Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (*Esp*) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256:145–50.
- [42] Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J Infect Dis* 2004;189:420–30.
- [43] Xu Y, Murray BE, Weinstock GM. A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun* 1998;66:4313–23.
- [44] Xu Y, Singh KV, Murray BE, Weinstock GM. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun* 2000;68:815–23.
- [45] Mohamed JA, Murray BE. Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. *J Med Microbiol* 2006;55:1747–50.
- [46] Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis*. Extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* 2008;190:5690–8.
- [47] Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1626–34.
- [48] Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1997;7:462–478.
- [49] Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1628–35.
- [50] Kühnen E, Richter F, Richter K, Andries L. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentralbl Bakt* 1988;267:322–30.
- [51] Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G, et al. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs* 2006;29:402–6.
- [52] Giridhara Upadhyaya PM, Umashathy BL, Ravikumar KL. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Lab Physicians* 2010;2:100–4.
- [53] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement M100-S20. June 2010 Update. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- [54] Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002;35:570–5.
- [55] Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4385–9.