



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ**

---

Διδακτορική Διατριβή

**«ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ**  
**ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ»**

Υπό

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Ε. ΚΑΡΑΒΑΣΙΛΗ**

Ιατρού Βιοπαθολόγου 2017

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2017

© 2017 Βασίλειος Ε. Καραβασίλης

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2).*

*Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6η/22-03-2017 ΓΣΕΣ):*

- 1ος Εξεταστής** Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου  
**(Επιβλέπων)** Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2ος Εξεταστής** Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας  
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3ος Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης Λιάκος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4ος Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος Τσακρής  
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 5ος Εξεταστής** Δρ. Δημήτριος Μόσιαλος  
Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6ος Εξεταστής** Δρ. Μελίνα Καχριμανίδου  
Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- 7ος Εξεταστής** Δρ. Ευθυμία Πρωτονοταρίου  
Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος αυτής της διαδρομής, οφείλω να αναγνωρίσω ότι εκείνος του οποίου η συνεισφορά υπήρξε καθοριστική στην εκπόνηση της διατριβής μου, ήταν ο κος Σπυρίδων Πουρνάρας, Καθηγητής Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χωρίς την στήριξη και την καθοδήγησή του αλλά και την υπομονή του, είναι αμφίβολο αν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί κάτι απ' όλ' αυτά. Του οφείλω λοιπόν τις θερμότερες ευχαριστίες μου, για την σχεδόν πατρική στοργή με την οποία περιέβαλε τις προσπάθειές μου. Ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη συνεισφορά και καθοδήγησή τους ως μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τους κους Χατζηχριστοδούλου Χρήστο Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Λιάκο Παναγιώτη Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς επίσης και τον κ. Αντώνιο Μανιάτη, αφυπηρητήσαντα Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος υπήρξε ο πρώτος που με εμπιστεύτηκε και με εισήγαγε στο πεδίο της έρευνας. Ευχαριστώ ακόμη τους κ.κ., Αθανάσιο Τσακρή Καθηγητή Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δημήτριο Μόσιαλο Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μελίνα Καχριμανίδου Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και Ευθυμία Πρωτονοταρίου Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης που είχαν την ευγενή καλοσύνη να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή. Τέλος ευχαριστώ όλους εκείνους, καθηγητές, συνεργάτες και δικούς μου ανθρώπους, που καθόρισαν και με κάθε τρόπο στήριξαν την όλη μου πορεία μέχρι σήμερα. Η ευγνωμοσύνη και η αγάπη μου είναι το ελάχιστο που τους οφείλω ως αντάλλαγμα. \_

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Όνοματεπώνυμο: **Βασίλειος Ε. Καραβασίλης**

Επάγγελμα: Στρατιωτικός Ιατρός - Βιοπαθολόγος

Ημερομηνία Γέννησης: 11/02/1974

**Ιούνιος 1991:** 4ο Γενικό Λύκειο Τρικάλων, Βαθμός Απολυτηρίου **19,11/13**

**Νοέμβριος 1998:** Βασικός τίτλος Σπουδών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ιατρικής, Βαθμός Πτυχίου **6.5/10**

**Δεκέμβριος 1998:** Ορκωμοσία ως Ανθυπολοχαγός Υγειονομικού Ιατρός Στρατού Ξηράς (Ανθυπίατρος)

**Δεκέμβριος 1999:** Πρώτη Αποφοίτηση από τη Σχολή Εφαρμογής Υγειονομικού Στρατού Ξηράς

**Δεκέμβριος 1999 - Απρίλιος 2002:** Διευθυντής Σταθμού Επανακτισίμων και Διοικητής Λόχου Υγειονομικού 32<sup>ας</sup> Ταξιαρχίας Πεζοναυτών, Βόλος.

**Απρίλιος 2000:** Προαγωγή σε Υπολοχαγό Υγειονομικού Ιατρό (Υπίατρος)

**Ιούνιος 2001:** Συμμετοχή στις Εξετάσεις για την επιλογή Ιατρικής Ειδικότητας Ιατρών Στρατού Ξηράς - επιλογή ειδικότητας Βιοπαθολογίας

**Απρίλιος 2002:** Προαγωγή σε Λοχαγό Υγειονομικού Ιατρό (Ιατρός)

**Απρίλιος 2002-Απρίλιος 2003:** Ειδικευόμενος Βιοπαθολογίας στο 424 ΓΣΝΕ Θεσσαλονίκη

**Απρίλιος 2003 - Απρίλιος 2007:** Ειδικευόμενος Βιοπαθολογίας στο ΠΠΓΝΛάρισας

**Αύγουστος 2007:** Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Βιοπαθολογίας, τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Αύγουστος 2007 - Ιούλιος 2008:** Επιμελητής Μικροβιολογικού τμήματος 404 ΓΣΝΛάρισας

**Ιούλιος 2008 - Αύγουστος 2009:** Διοικητής Λόχου Υγειονομικού 80<sup>ου</sup> Τάγματος Υποστήριξης Εθνοφυλακής, Κως.

**Σεπτέμβριος 2009 - Δεκέμβριος 2009:** Δεύτερη Αποφοίτηση από τη Σχολή Εφαρμογής Υγειονομικού Στρατού Ξηράς

**Απρίλιος 2010:** Προαγωγή σε Ταγματάρχη Υγειονομικού Ιατρό (Επίατρος)

**Αύγουστος 2009 – Οκτώβριος 2010:** Επιμελητής Μικροβιολογικού Τμήματος 424 ΓΣΝΕ, Θεσσαλονίκη

**Οκτώβριος 2010 – Ιούλιος 2012:** Επιμελητής Μικροβιολογικού τμήματος 404 ΓΣΝ Λάρισας

**Ιούλιος 2012 - Αύγουστος 2014:** Διευθυντής Μικροβιολογικού τμήματος 404 ΓΣΝ Λάρισας

**Αύγουστος 2014 - Αύγουστος 2016:** Διευθυντής Υγειονομικού Επιτελικού Γραφείου (CJ Med) Ευρωπαϊκού Τακτικού Στρατηγείου (ΟΗQ) ΕΣΕΕΕ, 1<sup>ης</sup> Στρατιά, Λάρισα.

**Αύγουστος 2014 - Μάρτιος 2015:** Συμμετοχή στην επιχείρηση ΟΗQ-RCA της Ευρωπαϊκής Ένωσης στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία ως CJ Med-acting ACOS (Επιτελικός Διευθυντής Υγειονομικού Ευρωπαϊκού Στρατηγείου - ΟΗQ)

**Απρίλιος 2015:** Προαγωγή σε Αντισυνταγματάρχη Υγειονομικού Ιατρό (Αρχίατρος)

**Αύγουστος 2016 - σήμερα:** Επιμελητής Μικροβιολογικού τμήματος 404 ΓΣΝ Λάρισας

**Οκτώβριος 2009 – σήμερα:** Επιστημονικός Διευθυντής Κεντρικών Εργαστηρίων και τμήματος Αιμοδοσίας Ιασώ Θεσσαλίας

Ξένες Γλώσσες: Αγγλική

#### Δημοσιεύσεις:

- **Karavasilis V**, Zarkotou O, Panopoulou M, Kachrimanidou M, Themeli-Digalaki K, Stylianakis A, Gennimata V, Ntokou E, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S; A Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone. **J Antimicrob Chemother.** 2015;70:1625-9. doi: 10.1093/jac/dkv028. Epub 2015 Feb 23.
- Layer F, Vourli S, **Karavasilis V**, Strommenger B, Dafopoulou K, Tsakris A, Werner G, Pournaras S. Dissemination of Linezolid-Dependent, Linezolid-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates belonging to CC5 in German Hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2018 Jan 19. doi: 10.1093/jac/dkx524
- Gerovassili A, Marcandona O, Asimakopoulos B, **Karavasilis V**, Panopoulou M, Ikonomidis A. Relationship between Chlamydia-Ureaplasma-Mycoplasma Genital Detection with Semen Concentration and Motility among Greek Men. **Int J Fertil Steril.** 2017;11:130-133. doi: 10.22074/ijfs.2017.4690. Epub 2017 Feb 16.

- Ikonomidis A, Michail G, Vasdeki A, Labrou M, **Karavasilis V**, Stathopoulos C, Maniatis AN, Pournaras S. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2008;52:3905-8. doi: 10.1128/ AAC.00653-08. Epub 2008 Aug 11.

#### Ανακοινώσεις συνεδρίων:

- 2<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής με τίτλο «σταφυλόκοκκοι με αντοχή στις στρεπτογραμμίνες σε ελληνικά νοσοκομεία» 24-26 Φεβρουαρίου 2005, Αθήνα, Ελλάδα.
- 2<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής με τίτλο «ανίχνευση των γονιδίων του *ica* οπερονίου σε κλινικά στελέχη σταφυλοκόκκων» 24-26 Φεβρουαρίου 2005, Αθήνα, Ελλάδα.
- 54<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, « Predominance of a linezolid dependent *Staphylococcus epidermidis* ST22 clone among linezolid resistant *S.epidermidis* clinical isolates in Greek Hospitals» 2014 Washington, DC, USA





«ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ  
ΑΠΟ ΤΗΝ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ  
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ»

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ε. ΚΑΡΑΒΑΣΙΛΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Ιατρικής, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δρ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπων)
2. Δρ. Πουρνάρας Σπυρίδων, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τμήματος Ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Δρ. Λιάκος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



*Στους γονείς μου για το «άγαθά κόποις κτώνται»*

*Στη γυναίκα μου και τα παιδιά μου για την υπομονή και το χαμόγελό τους*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς σταφυλοκόκκους αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη θεραπευτική. Η ικανότητά των σταφυλοκόκκων να αποικίζουν το ανθρώπινο δέρμα και τους βλεννογόνους αλλά και επιφάνειες ιατρικού και νοσοκομειακού εξοπλισμού και να αναπτύσσουν αντοχή στα συνηθέστερα αντιβιοτικά, οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών αντιμικροβιακών παραγόντων για την αντιμετώπισή τους.

Σ' αυτό το πλαίσιο, ιδιαίτερα χρήσιμη αποδεικνύεται τα τελευταία χρόνια η λινεζολίδη, ο πρώτος εκπρόσωπος της κατηγορίας των οξαζολιδινών. Ιδίως μετά και την έξαρση των ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων από σταφυλοκόκκους με αντοχή στη μεθικιλίνη, η λινεζολίδη αποτελεί ένα από τα αντιβιοτικά εκλογής σε σοβαρές ενδοноσοκομιακές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις.

Η αύξηση της χρήσης της λινεζολίδης στη θεραπευτική όμως, έχει ήδη οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών σ' αυτή στελεχών μέσα από μία σειρά μοριακών μηχανισμών που κυρίως σχετίζονται με το ριβόσωμα και την πρωτεϊνσύνθεση, που αποτελούν και τον στόχο δράσης της λινεζολίδης.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν διπλός. Εστιάζοντας στους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους (*Staphylococcus epidermidis*), αρχικά καταγράφηκε και μελετήθηκε επιδημιολογικά η ανάπτυξη αντοχής τους στη λινεζολίδη (Linezolid-resistant *S. epidermidis*, LRSE) σε μία μεγάλη συλλογή κλινικά σημαντικών στελεχών που απομονώθηκαν από 6 διαφορετικά ελληνικά νοσοκομεία σε ένα διάστημα 3 ετών, από το 2011 ως το 2013. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν ποσοστά LRSE που συνολικά άγγιξαν το 8,75% επί του συνόλου των λοιμώξεων από *S. epidermidis*, ενώ ως προεξάρχων κλώνος αναδείχτηκε ο ST22. Η παραπάνω συλλογή εμπλουτίστηκε με στελέχη από Γερμανικά και Ιταλικά νοσοκομεία, κάτι που οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα, σχετικά με την εξάπλωση των ανθεκτικών επιδερμικών σταφυλοκόκκων και την κλωνικότητά τους σε παγκόσμιο επίπεδο.

Το δεύτερο σημείο στο οποίο εστίασε η μελέτη μας ήταν η εξάρτηση από τη λινεζολίδη, ένα φαινόμενο που είχε περιγραφεί για πρώτη φορά στην Ελλάδα

και σε επιδερμικούς σταφυλοκόκκους με αντοχή στη λινεζολίδη. Πειραματικά αποδείχτηκε ότι το συγκεκριμένο φαινόμενο καταγράφεται αποκλειστικά σε LRSE με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 mg/dl). Τα στελέχη αυτά ειδικά, όσον αφορά την ελληνική συλλογή, ήταν κλωνικά και ανήκαν στον τύπο ST22. Τα συμπεράσματα για τη σχέση επιπέδου αντοχής και εξάρτησης από τη λινεζολίδη, επιβεβαιώθηκαν και στα στελέχη από τη Γερμανία. Σε αυτά και πάλι καταγράφηκε εξάρτηση, που αφορούσε επίσης LRSE με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη, που ανήκαν κυρίως στον τύπο ST22 ή σπανιότερα σε τρεις ακόμη συγγενικούς του κλώνους (ST2, ST5, ST168) που όλοι ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα CC5. Αυτό είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρον εύρημα, που δείχνει ότι η συχνή παρουσία του εξαρτημένου από τη λινεζολίδη LRSE κλώνου ST22/CC5 και στη Γερμανία, πέρα από την Ελλάδα πιθανώς είναι υπεύθυνη για την επέκταση της αντοχής στη λινεζολίδη.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης των LRSE σε λινεζολίδη, στην εκδήλωση του φαινομένου της εξάρτησης. Πειραματικά αποδείχτηκε ότι ένα στέλεχος LRSE με εξάρτηση μπορεί να χάσει την ικανότητά του αυτή, μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη και αντιστρόφως, ένας επιδερμικός σταφυλόκοκκος με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη αλλά μη εξαρτώμενος από αυτή, μπορεί αν εκτεθεί στη λινεζολίδη να μεταπέσει σε εξαρτημένο στέλεχος. Αποδεικνύεται έτσι ότι η παρουσία της λινεζολίδης πυροδοτεί το φαινόμενο της εξάρτησης, το οποίο αναδεικνύεται σε ένα εξελικτικό πλεονέκτημα των LRSE για επιβίωση. Το συμπέρασμα αυτό ευθυγραμμίζεται απολύτως με τα επιδημιολογικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης, που κατέγραψε ποσοστά εξαρτημένων που άγγιξαν το 77%, επί συνόλου των LRSE στα ελληνικά νοσοκομεία. Φαίνεται λοιπόν ότι η μεγάλη χρήση λινεζολίδης στα Ελληνικά αλλά και Γερμανικά Νοσοκομεία έχει ασκήσει ισχυρή πίεση επιλογής για τα στελέχη αυτά, ιδίως στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας.

## ABSTRACT

Infections caused by multi-resistant staphylococci can be quite difficult to control; staphylococci's ability, either to colonize human skin and mucosals and survive for long term on surfaces and medical equipment, and acquire resistance to the most common antibiotics, led to the need for alternative therapeutic options.

In accordance with this, linezolid, a synthetic antibiotic of the oxazolidinones' group, has proved to be quite useful on the treatment of serious nosocomial staphylococcal infections, especially after the expansion of methicillin resistant strains.

As a result of the increased therapeutic use of linezolid, linezolid resistant staphylococci emerged, due to molecular resistant mechanisms, concerning ribosome and protein synthesis, which are the target of linezolid.

Focusing on *S. epidermidis*, the scope of this study was double. Firstly, an epidemiological research on the emergence of linezolid-resistant *S. epidermidis* (LRSE) in 6 distant Greek hospitals between 2011 and 2013 was laid out. The overall rate of LRSE, reached 8.8% and the predominant strain was identified as ST22 type. This collection was enriched by LRSE strains recovered from hospitals in Germany and Italy. This gave a global perspective of the study's results on the clonality and expansion of LRSE strains.

The second point of focus for this study was the dependence on linezolid, a phenomenon which was first reported in LRSE strains, isolated in a Greek hospital. Experiments showed that dependence concerns only strains with high level resistance in linezolid (MIC>256 mg/dl). All the dependent strains belonging to the Greek collection were identified as ST22 type. Conclusions on the interaction of the level of resistance and dependence itself were verified by the experimental study of the German and Italian collections, as the phenomenon was also reported only in high-level resistant LRSE. Furthermore, ST22 type was the most commonly identified among German linezolid-dependent LRSE, while three other linezolid-dependent LRSE types (ST2, ST5, ST168) from the German collection also proved to belong to the

clonal complex CC5, a finding that allows the conclusion that dependence possibly is a unique characteristic of the genetic clonal complex ST22/CC5.

Finally, this study investigated the influence of the exposure to linezolid on the expression of the dependence phenomenon. Dependence proved out to be a reversible ability, thus after several cycles of re-cultures in media without linezolid some dependent strains were converted to non-dependent ones. Moreover, other experiments showed that a non-dependent LRSE with high level resistance in linezolid can be converted to a linezolid-dependent strain, by being exposed to an environment where linezolid is present, even in concentrations that can easily be accomplished *in vivo*, by the current therapeutic schemes. This proves that linezolid's presence triggers the phenomenon of dependence, which appears to be an evolutionary privilege among LRSE, which contributes to the expansion and prevalence of those strains; this conclusion aligns with this study's epidemiological findings which recorded linezolid dependence rate of 77% among high level LRSE in Greek hospitals.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<i>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i> .....	23
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
I. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ.....	23
I.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	24
I.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	27
I.3 ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ.....	27
II. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	34
III. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗΣ .....	42
III.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	42
III.2 ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	44
IV. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	48
IV.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	48
IV.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	49
IV.2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	49
IV.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΟΥΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ.....	49
IV.2.2.1 Μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23S rRna .....	49
IV.2.2.2 Μηχανισμός σχετιζόμενος με τις 50S ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22.....	51
IV.2.2.3. Μηχανισμός Cfr (Chloramphenicol - Florfenicol Resistance).....	52
IV.2.2.4. Μηχανισμός σχετιζόμενος με την RlmN μεθυλοτρανσφεράση.....	54
V. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	55
V.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	55
VI. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ (LINEZOLID DEPENDENCE).....	59



VI.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΕΝΙΚΑ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟΥΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ.....	59
VI.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ <i>S. epidermidis</i> .....	63
VI.3. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΤΩΝ ΧΡΥΣΙΖΩΝΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ.....	66

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΥΛΛΟΓΗ - ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	71
I.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	71
I.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	72
I.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	72
I.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC.....	74
I.4.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ VITEK 2.....	74
I.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ E-TEST .....	75
I.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ ΜUELLER HINTON .....	77
II ΜΟΡΙΑΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	78
II.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	78
II.2. ΜΕΘΟΔΟΙ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ... ..	79
II.2.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ 23S rRNA .....	79
II.2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ PCR ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>rplc</i> , <i>rpld</i> και <i>rplv</i> .....	82
II.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>cfp</i> ΜΕ PCR.....	83
II.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΒΑΣΕΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	85
II.3.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	85

II.3.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR (DNA SEQUENCING) .....	86
III. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	87
IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΓΕΡΜΑΝΙΑ.....	89
IV.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS –PFGE).....	90
IV.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΘΕΣΕΩΝ (MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING, MLST) .....	94
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
V.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	95
V.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MIC ΣΕ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ, ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ, ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗ, ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ ΚΑΙ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ Ε-TEST ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (ΓΙΑ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ).....	99
V.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ.....	104
V.3.1. ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (“GROWTH CURVES”) .....	104
V.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE) ΚΑΙ ΜΕ MLST ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ .....	122
V.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ.....	127
VI. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ – ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ.....	128

VI.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗΣ 8 mg/dl.....	128
VI.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΣΤΟΥΣ LRSE.....	129
VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	130
<i>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</i>	<i>138</i>
<i>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ.....</i>	<i>158</i>



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη ιατρική πράξη στην εποχή μας, είναι ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Τις τελευταίες δεκαετίες, παρά την εισαγωγή νέων ευρέως φάσματος αντιβιοτικών, οι βακτηριακές λοιμώξεις που οφείλονται σε διάφορους τύπους μικροοργανισμών, καταλαμβάνουν την κορυφή στη λίστα με τις συχνότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στους ασθενείς που νοσηλεύονται, στα διάφορα νοσηλευτικά ιδρύματα, ανά τον κόσμο.

Σε παγκόσμιο επίπεδο ακόμη και στις ανεπτυγμένες χώρες, αποτελεί ανησυχητική πραγματικότητα το γεγονός ότι, από τις νοσοκομειακές λοιμώξεις, εκείνες που οφείλονται στους σταφυλοκόκκους καταλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό, που μάλιστα βαίνει συνεχώς αυξανόμενο.

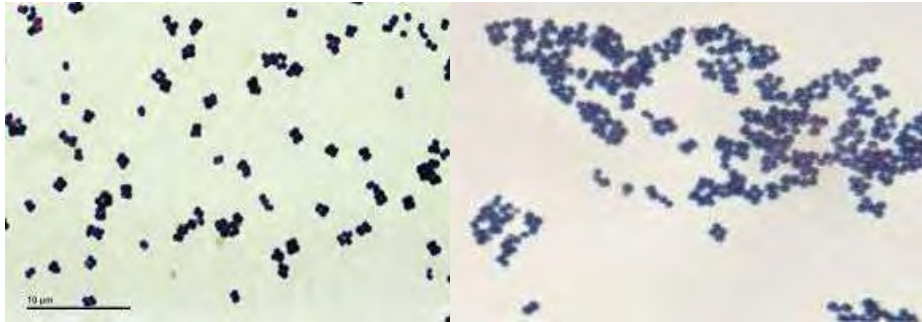
Η δυνατότητά τους να συμπεριφέρονται ως ευκαιριακά παθογόνα μικρόβια, και η ικανότητά τους να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά και να αποικίζουν μόνιμα τους ανθρώπους, καθιστά τους σταφυλοκόκκους πρωταγωνιστές στον πόλεμο της σύγχρονης θεραπευτικής με τους λοιμογόνους παράγοντες.

### Ι. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ



Εικόνα 1: Σταφυλόκοκκοι (φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)

## Ι.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ



Εικόνα 2: Χρώση κατά Gram: σταφυλόκοκκοι

Ο πρώτος που περιέγραψε σταφυλοκόκκους στην ιστορία της Μικροβιολογίας, είναι ο γνωστός Γάλλος Χημικός, Luis Pasteur, με τη βοήθεια ενός «πρωτόγονου» κοινού μικροσκοπίου, το 1878.

Στις μέρες μας, έχοντας σαν εργαλείο τις μοριακές μεθόδους και με τη δυνατότητα χαρτογράφησης του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών, μπορούμε να προχωρούμε αξιόπιστα στην ταξινόμηση και αναγνώριση των διαφόρων μικροβιακών ειδών.

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae*. Πρόκειται για Gram-θετικούς κόκκους διαμέτρου 0,8 – 1 μm (εικόνα 2) που διατάσσονται χαρακτηριστικά, σε σχηματισμούς σαν τσαμπιά από σταφύλια – αν και μικροσκοπικά συχνά αναγνωρίζονται και ως μονήρεις, σε δυάδες, τετράδες ή ακόμη και σε μικρές αλυσίδες. Είναι ακίνητοι, δεν σχηματίζουν σπόρια και όσον αφορά τις συνθήκες ανάπτυξής τους, αερόβιοι και προαιρετικά αναερόβιοι. Σπάνια μερικά υποείδη είναι αναερόβια (subsp. *anaerobius*) και κάποια άλλα απαιτούν CO<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 2-10%, καθώς και κάποιους άλλους μεταβολίτες, για την ανάπτυξή τους.

Το βασικό κοινό χαρακτηριστικό όλων των σταφυλοκόκκων είναι ότι παράγουν καταλάση, ενώ επίσης είναι όλοι, οξειδάση-αρνητικοί. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκό οξύ. Διασπούν τη γλυκόζη οξειδωτικά με παραγωγή αερίου, καθώς και κάποια άλλα σάκχαρα ζυμωτικά χωρίς παραγωγή αερίου. Δεν λύνονται με λυσοζύμη αλλά λύνονται με λυσοσταφίνη ενώ αποδεικνύονται ιδιαίτερα ανθεκτικοί στην παρουσία



χλωριούχου νατρίου, έχοντας τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε υλικά με 7% ή ακόμη και 10% NaCl.

Οι σταφυλόκοκκοι κατατάσσονται αρχικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν συγκόλληση του πλάσματος: στους κοαγκουλάση (ή πηκτάση)-θετικούς – με σημαντικότερο εκπρόσωπο τον *S.aureus* (πίνακας 1) και στους κοαγκουλάση (ή πηκτάση) - αρνητικούς σταφυλοκόκκους (CoNS ή CNS). Η δεύτερη αυτή κατηγορία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό σταφυλοκόκκων που κατηγοριοποιούνται σε 32 είδη και 7 υποείδη, όπως οι *S.epidermidis*, *S. saprophyticus* και άλλοι. Οι σημαντικότεροι από κλινικής άποψης κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1- κοαγκουλάση-θετικοί σταφυλόκοκκοι

Κοαγκουλάση-θετικοί σταφυλόκοκκοι
<i>S. aureus</i>
<i>S. schleiferi</i>
<i>S. intermedius</i>
<i>S. hyicus</i>

Πίνακας 2 – σημαντικότεροι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι

Κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι
<i>S. epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. xylosus</i>
<i>S. simulans</i>
<i>S. warneri</i>
<i>S. capitis</i>
<i>S. lugdunensis</i>

Οι σταφυλόκοκκοι περιβάλλονται από χαλαρή πολυσακχαρική κάψα χάρη στην οποία ταυτοποιούνται σε διάφορους οροτύπους. Οι συχνότεροι ορότυποι είναι οι 5 και 8 στους οποίους ανήκουν πολλά στελέχη *S. aureus* που παρουσιάζουν αντοχή στην μεθικιλίνη (**Methicillin Resistant *S. aureus*, MRSA**), (Fournier JM, 1990). Κατά την απομόνωσή του από παθολογικά

δείγματα ο *S. aureus* εκφράζει υψηλά επίπεδα πολυσακχαριτών αλλά στο εργαστήριο και με τις συνεχείς ανακαλλιέργειες χάνει αυτή του την ικανότητα.

Όσον αφορά τις συνθήκες περιβάλλοντος στις οποίες αναπτύσσονται, η πλειοψηφία των σταφυλοκόκκων είναι προαιρετικά αναερόβιοι, εκτός από τον *S. saccharolyticus* και τον *S. aureus subsp. anaerobius*, που είναι αναερόβιοι και καταλάση-αρνητικοί και δεν σχηματίζουν αέρια από υδατάνθρακες. Μερικά σπάνια είδη σταφυλοκόκκων μπορεί να απαιτούν την παρουσία CO<sub>2</sub> ή και άλλων μεταβολιτών (αιμίνη, μεναδιόνη) (Slifkin M *et al*, 1971) ή υπέρτονο μέσο ανάπτυξης (Proctor RA *et al*, 1998). Η σύνθεση των κυτταρικών λιπαρών οξέων των σταφυλοκόκκων αποτελείται κυρίως από ισο- και αντιισο-C<sub>15:0</sub>, αντιισο-C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:0</sub> και C<sub>20:0</sub> (Welch DF, 1991). Το μέγεθος του γενώματος τους κυμαίνεται από 2000 έως 3000 kb (George CG *et al*, 1994, Kloos WE *et al*, 1998, Prevost G *et al*, 1992).

Πίνακας 3.: Βιοχημικές ιδιότητες των κυριότερων σταφυλοκόκκων

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.scapitis</i>	<i>S.scapitauralicus</i>	<i>S.scaprae</i>	<i>S.saccharolyticus</i>	<i>S.swareri</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.tugdanensis</i>	<i>S.schleiferi</i>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.cohnii</i>	<i>S.cohnii. ureolyticus</i>	<i>S.xyloso</i>	<i>S.sartetae</i>	<i>S.equetum</i>	<i>S.gallinarium</i>	<i>S.kloosii</i>	<i>S.stimulans</i>	<i>S.carnosus</i>	<i>S.sciuri</i>	<i>S.tentus</i>	<i>S.sauricularis</i>	<i>S.inermidius</i>	<i>S.lyticus</i>	<i>S.delphini</i>	
Κοαγκουλάση ελεύθερη	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	+	
Κοαγκουλάση συνδεδεμένη	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	
Νουκλεάση θερμοανθεκτική	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
Αιμολυσίνες	+	(d)	(d)	(d)	(d)	-	(d)	(+)	-	(+)	(+)	-	(d)	(d)	-	-	(d)	(d)	(d)	(d)	-	-	-	-	-	d	-	-
Αργινίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ορνιθίνη	-	(d)	-	-	-	ND	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Πυρρολιδόνη	-	-	-	(d)	d	ND	-	+	-	+	+	-	-	(d)	d	-	-	-	d	+	+	-	-	d	+	-	-	
Ουρεάση	(d)	+	-	+	+	ND	+	-	+	d	-	+	-	+	+	+	+	d	+	+	-	-	-	-	+	d	+	
Φοσφατάση αλκαλική	+	+	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	(+)	(+)	(+)	d	(d)	+	+	+	(+)	-	+	+	+	
β-γαλακτοσιδάση	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	(+)	+	-	+	+	d	d	d	d	+	+	-	-	(d)	+	-	-	
Ακετοΐνη (VP)	+	+	d	d	+	ND	+	+	d	+	+	+	d	D	d	-	-	-	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-
Νιτρικά	+	+	d	+	+	+	d	+	d	+	+	-	-	-	d	-	+	+	-	+	+	+	+	d	+	+	+	
Εσκούλίνη	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	+	d	-	-	+	+	-	-	-	-	
Αντοχή σε 10% NaCl	+	+																										
Αντοχή στη Νοβοβοκίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
Αντοχή στην πολυμυξίνη Β	+	+	+	ND	-	ND	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
Μαννιτόλη	+	-	+	+	d	-	d	d	-	-	-	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(d)	-	-	
Μαννόζη	+	(+)	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	-	(d)	+	+	+	+	+	-	d	+	+	(d)	(+)	-	+	+	
Τρεαλδόζη	+	-	-	-	(+)	-	+	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	(+)	+	+	+	
Λακτόζη	+	D	-	-	+	-	d	d	d	+	-	d	-	+	d	+	+	d	(d)	+	d	(d)	d	-	d	+	+	
Κατάλαση	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Οξειδάση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Σύμβολα και επεξηγήσεις: + =>90% θετικά d=11-89% θετικά ( ) = βραδεία αντίδραση

Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι του γένους των σταφυλοκόκκων καθώς και οι κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες που τους διακρίνουν και τους χαρακτηρίζουν, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 3.

## 1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα στελέχη του γένους *Staphylococcus* ανήκουν στην οικογένεια *Micrococcaceae*, και στην ίδια ομάδα γενών με τα γένη *Micrococcus*, *Stomatococcus* και *Planococcus*. (Schleifer KH, 1986A). Ωστόσο, τα αποτελέσματα μελετών της σύνθεσης βάσεων του DNA (Seifert H *et al*, 1995), του DNA-rRNA υβριδισμού (Kilpper R *et al*, 1980) και της ολιγονουκλεοτιδικής ανάλυσης συσχέτισης αλληλουχιών του 16S rRNA (Ludwig W *et al*, 1981, Stackebrandt E *et al*, 1979, Kloos WE, 1997) υποδεικνύουν ότι το γένος του σταφυλοκόκκου συνδέεται μάλλον πιο στενά με το γένος *Micrococcus* (Kloos WE *et al*, 1998). Έχει επίσης σχετικά στενή σχέση με τα γένη *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* και *Planococcus*. Αυτά τα είδη έχουν τοποθετηθεί, με ορισμένες επιφυλάξεις, μαζί με τους σταφυλοκόκκους και αρκετά άλλα γένη, στην οικογένεια *Bacillaceae* και στην τάξη *Bacillales* (Cato EP *et al*, 1989).

## 1.3. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Αρχικά από το γένος των σταφυλοκόκκων, θεωρήθηκε παθογόνος ο *S.aureus*, ενώ οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι θεωρούνταν μη παθογόνοι, καθώς είναι γνωστό ότι αποτελούν το βασικό μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων του ανθρώπου. Γρήγορα όμως η απομόνωση στελεχών CONS από παθολογικά κλινικά δείγματα απέδειξε ότι και αυτοί ευθύνονται για ένα μεγάλο αριθμό λοιμώξεων (Pfaller MA *et al*, 1988), ιδιαίτερως σε χειρουργικούς ασθενείς και κυρίως σε αυτούς που φέρνουν κάποιο προσθετικό μηχανισμό π.χ. ενδαγγειακούς καθετήρες, ορθοπεδικά υλικά (αρθροπλαστικής, οστεοσύνδεσης κλπ), ενδαγγειακά και άλλα μοσχεύματα (Frazee B, Flaherty J, 1991) κοκ (Αρσένη Α, 1990).

Σημαντικό ρόλο στην παθογονικότητα των σταφυλοκόκκων φαίνεται ότι παίζει η προσκολλητική τους ικανότητα (Tojo M *et al*, 1988) η ικανότητά τους να παράγουν βλέννη (slime) και βιομεμβράνες (biofilm) (Ishak MA *et al*, 1985, Freeman DJ *et al*, 1989) καθώς και η παραγωγή εξωτοξινών (Johnson WM *et al*, 1991).

Ειδικότερα, ο *S.aureus* μπορεί να προσβάλλει όλα τα όργανα και όλους τους ιστούς. Από το 1881, όταν ο Ogston περιέγραψε την σταφυλοκοκκική σηψαιμία και τα αποστήματα, μέχρι και τις μέρες μας, ο *Staphylococcus aureus* θεωρείται ένα από τα πλέον λοιμογόνα βακτήρια (Crossley KB *et al*, 1997). Ο αντιπροσωπευτικός τύπος σταφυλοκοκκικής λοίμωξης από *S.aureus* είναι η πυώδης φλεγμονή και οι συχνότερες τέτοιες είναι: δερματικές λοιμώξεις (δοθιήνωση, πυοδερμία, ακμή κλπ βλέπε εικόνα 3), αποστήματα εσωτερικών οργάνων και εμπυήματα κοιλοτήτων, οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα, σταφυλοκοκκική πνευμονία (σε ασθενείς με κυστική ίνωση ή βρογχεκτασίες ο *S.aureus* αποικίζει τους πνεύμονες), σηψαιμία, ενδοαρτηρίτιδα (π.χ. σε φλεβοκαθετήρες), ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα (κυρίως δευτερο-παθής) (Rytel M , 1989).

Εικόνα 3: Σταφυλοκοκκική δερματική δοθιήνωση



Εκτός από τις παραπάνω, ο *S.aureus* μπορεί να προκαλεί και τοξινικές νόσους χάρη στην ικανότητά του να παράγει μια σειρά εξωτοξινών (Johnson WM *et al*, 1991). Στην κατηγορία αυτή ανήκει η τροφική δηλητηρίαση, η οποία εμφανίζεται 6 - 12 ώρες μετά την κατανάλωση τροφών όπου έχει αναπτυχθεί *S.aureus* κυρίως της βακτηριοφαγικής ομάδας III και IV και λυσιτύπου 6/47 που παράγει εντεροτοξίνες (συνήθως Β εντεροτοξίνη). Άλλη τέτοια νόσος είναι η τοξική επιδερμική νεκρόλυση (TEN) ή σύνδρομο «ζεματισμένου» δέρματος

(scalded skin syndrome) που εμφανίζεται σε νεογνά και οφείλεται στην αποφολιδωτική τοξίνη που παράγει ο *S.aureus* λυσιτύπου 71. Τέλος, στην ίδια κατηγορία ανήκει και το σύνδρομο του τοξικού shock (TSS) που προσβάλλει κυρίως γυναίκες μετά τη χρήση ενδοκοιλιακού tampon (εικόνα 4) και οφείλεται σε τοξίνη (TSST-1) που παράγεται από *S.aureus* (κυρίως της βακτηριοφαγικής ομάδας I λυσιτύπου 29) (Goulding R, 1985, Schlievert P *et al*,1991). Οι σημαντικότερες τοξίνες και ένζυμα που παράγει ο *S.aureus*, η δράση τους και οι αντίστοιχες νόσοι που προκαλούν, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 – Τοξίνες του *S.aureus* και δράση τους

ΤΟΞΙΝΗ	ΔΡΑΣΗ	ΝΟΣΟΣ
α-αιμολυσίνη	αιμολυτική δερμο- και νευρο- νεκρωτική	Ήπια αιμόλυση (στον άνθρωπο)
β-αιμολυσίνη	σφιγγομυελινάσης	Δεν δρα στον άνθρωπο
γ-αιμολυσίνη	αιμολυσίνης και λευκοκτονίνης	αύξηση του φάσματος των κυττάρων στόχων των τοξινών
δ-αιμολυσίνη	αιμολυτική	σημαντική αιμόλυση (στον άνθρωπο)
τοξίνη PVL (Panton- Valentine λευκοκτονίνη)	λευκοκτονίνη	- αύξηση του φάσματος των κυττάρων στόχων των τοξινών - συχνότερα σε λοιμώξεις μαλακών μορίων και νεκρωτική πνευμονία
εντεροτοξίνη B	εντεροτοξική	Τροφική δηλητηρίαση
εντεροτοξίνες C, D	εντεροτοξική	Επιδημικές τροφικές δηλητηριάσεις
αποφολιδωτική τοξίνη	δερμονεκρωτική	τοξική επιδερμική νεκρώλυση (TEN)
Τοξίνη συνδρόμου τοξικού σοκ (TSST-1)	τοξικό σοκ εντεροτοξίνης πυρετογόνος	Σύνδρομο τοξικού σοκ (toxic shock syndrome)
υαλουρονιδάση	διάσπαση υαλουρονικού	
ινωδολυσίνη	λύση ινικής	
πυρετογόνος εξωτοξίνη	πυρετός βλάβη μυοκαρδίου θανατηφόρο σοκ	θανατηφόρο σοκ

Εικόνα 4: Κολπικό tampon: η αιτία του συνδρόμου τοξικού σοκ (TSS)



Ολοκληρώνοντας την αναφορά μας στη σειρά των παθογόνων δράσεων που αποδίδονται στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσίαση της συσχέτισης των συχνότερων λοιμώξεων που οφείλονται σε *S. aureus*, με την ικανότητά του για παραγωγή τοξινών και ενζύμων (πίνακας 5).

Πίνακας 5: Ι. Σπηλιωπούλου, Κλινικό Φροντιστήριο, Ελλ. Μικρ. Εταιρία, 2005: Λοιμώξεις οφειλόμενες σε στελέχη *S. aureus* και συσχετισμός τους με την παραγωγή τοξινών και ενζύμων

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	ΤΟΞΙΝΕΣ	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ENZYMA
Πυοδερματίτιδα	+/- PVL, Luk	
Θυλακίτιδα	+/- PVL, Luk	Καταλάση
Δοθιήνας	+/- PVL, Luk	
Πνευμονία	+/- PVL, Luk	Πηκτάση
Ψευδάνθρακας	+/- PVL, Luk	
Κρίθη	+/- PVL, Luk	
Παρουχία	+/- PVL, Luk	Προσκολλητίνες
Οστεομυελίτιδα	-/+ PVL, Luk	
Μικροβιακή αρθρίτιδα	-/+ PVL, Luk	Έλυτρο
Σύνδρομο τοξικής κατα-πληξίας	TSST-1SE's	
Τροφική δηλητηρίαση	SE's	Ινωδολυσίνη
Επιδερμολυτική νόσος	ET's	
Μηνιγγίτιδα	-	Πρωτεΐνη Α
Ενδοκαρδίτιδα	-	
Βακτηραιμία	-	Αιμολυσίνες
Εντεροκολίτιδα	-	

Ο *S.epidermidis* είναι το συχνότερα απαντώμενο είδος των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων. Αρχικά, θεωρήθηκε ως μη παθογόνο, καθώς αποικίζει όλο το δέρμα και τις ανοικτές κοιλότητες του ανθρώπου όπου και αποτελεί το βασικότερο μέλος της φυσιολογικής τους χλωρίδας. Μια και οι εξωτοξίνες και τα ένζυμα που παράγει γενικά, δεν έχουν ιστολυτικές ιδιότητες και δεν είναι παθογόνες για τον άνθρωπο, ο *S.epidermidis* δεν ευθύνεται για τοξινικές νόσους. Εξαίρεση αποτελεί η αιμολυτική δ-τοξίνη η οποία έχει βρεθεί ότι ενέχεται στην πρόκληση της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας των νεογνών (Vuong Cuong *et al*, 2002).

Έτσι, οι λοιμώξεις που οφείλονται στον συγκεκριμένο σταφυλόκοκκο, είναι ως επί το πλείστον, υποξείες και χρόνιες (πίνακας 6). Όταν βρεθεί σε στείρο περιβάλλον (π.χ. καρδιαγγειακό σύστημα, περιτόναιο, ουροεπιθήλιο, υποδόριο ιστό κλπ), είναι δυνητικά παθογόνος και μπορεί να προκαλεί ένα μεγάλο αριθμό συστηματικών και τοπικών νόσων που συνήθως σχετίζονται με παρεμβατικές ή και προσθετικές θεραπείες (Peters G *et al*, 1982). Συνηθέστερα η πύλη εισόδου είναι ενδοφλέβιος καθετήρας και εμφυτευμένα βιοϊατρικά υλικά.

Στην παθογονικότητά του, εμπλέκεται καθοριστικά ο μηχανισμός παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm), που σχηματίζει «κατασκευασμένες» από βλέννη (slime) αποικίες βακτηρίων, προσκολλημένες στα διάφορα ιατρικά υλικά ή και σε όργανα του ασθενούς. Σήμερα γνωρίζουμε ότι πολλές λοιμώξεις από *S.epidermidis* που συνδέονται με την παραγωγή βιομεμβράνης, εξαιτίας της προστασίας που το biofilm παρέχει στην μικροβιακή αποικία από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες του οργανισμού και τα περισσότερα αντιβιοτικά, κάνει εξαιρετικά δύσκολη την εκρίζωσή τους (Friedrich Gotz, 2002).

Ως ευκαιριακό παθογόνο, ο *S.epidermidis* προσβάλλει συχνότερα άτομα με ανοσοανεπάρκεια (όπως ασθενείς που παίρνουν ανοσοκατασταλτικά, ασθενείς με AIDS, νεοπλασματικές νόσους ή αυάνοσα νοσήματα, μεταμοσχευμένους, πρόωρα νεογνά). Ειδικότερα, μπορεί να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα και σηψαιμία σε καρδιοχειρουργικούς ασθενείς (π.χ. όπως σε εκείνους με προσθετικές βαλβίδες), μηνιγγίτιδα σε ασθενείς με εγκεφαλονωτιαία παροχέτευση (shunt), περιτονίτιδα (ειδικά σε ενδοπεριταναϊκές παροχετεύσεις), μικροβιαμία σε μεταγγιζόμενους (κατά τη

φλεβοκέντηση) και γενικότερα σε ανοσοκατεσταλμένους, ενώ αποτελεί ίσως το συχνότερο αίτιο επιμόλυνσης τραυμάτων και χειρουργικού πεδίου. Επιπλέον έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να ευθύνεται για χρόνιες και υποξείες λοιμώξεις, όπως υποξεία ενδοκαρδίτιδα, μέση ωτίτιδα, χρόνιες δερματίτιδες και ακμή, μετεγχειρητικές ουρολοιμώξεις και θρομβοφλεβίτιδα.

Πίνακας 6- Λοιμώξεις από *S.epidermidis*

ΛΟΙΜΩΞΗ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ
Μικροβιαμία-Σηψαιμία	Νεογνά
	Ανοσοκασταλμένοι
	Ασθενείς με ενδοφλεβίους καθετήρες
Λοιμώξεις προσθετικών υλικών (πλην ενδοφλεβίων καθετήρων)	Ενδοκαρδίτιδα προσθετικών βαλβίδων
	Ενδοφλέβια ενδοκαρδιακά ηλεκτρόδια
	Παρακαμπτήρια μοσχεύματα
	Φορητή περιτοναϊκή διάλυση
	Αναστομώσεις ΕΝΥ
	Αρθροπλαστικές – υλικά οστεοσύνδεσης
	Ενδοφθαλμίτιδα
Λοιμώξεις που δεν σχετίζονται με προσθετικά υλικά	Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων – οστεομυελίτιδα
	Ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων
	Λοιμώξεις ουροποιητικού
	Δερματικές λοιμώξεις

Η λοιμογόνος δύναμη του *S.epidermidis* οφείλεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, στην ικανότητά του να προσκολλάται σε επιφάνειες, να παράγει εξωκυττάρια βλεννώδη ουσία και να σχηματίζει βιομεμβράνες. Λεπτομερέστερα, η εξωκυττάρια βλεννώδης ουσία (biofilm), που αποτελείται από βακτηριακές ουσίες και ουσίες του ξενιστή, δημιουργεί ένα προστατευτικό περιβάλλον για την αποικία των μικροβίων, απρόσβλητο στα αντιβιοτικά αλλά και στους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, τα κύτταρα, τους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τα αντισώματα του ανοσιακού συστήματός του. Η διαδικασία σχηματισμού του biofilm, ξεκινά με την προσκόλληση του βακτηρίου στην ξένη επιφάνεια, κάτι που σχετίζεται με την υδροφοβικότητα της βακτηριακής επιφανείας. Σ' αυτήν, συμμετέχουν οι πρωτεΐνες αυτολυσίνη AtlE (Heilman C *et al*, 1997) και SSP-1 (Veenstra GJ *et al*, 1996) καθώς και μία



πολυσακχαριδική προσκολλητίνη PS/A (Kojima Y *et al*, 1990). Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας σχηματισμού του biofilm, απαιτείται και η διακυτταρική προσκόλληση, στην οποία συμμετέχουν, η πρωτεΐνη AAP (accumulation-associated protein) και η PIA (polysaccharide intercellular adhesin). Η AAP βοηθά στην «αγκύρωση» της PIA στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ η δεύτερη, που αποτελεί το βασικό πολυμερές της βιομεμβράνης, κωδικοποιείται από το σύστημα των *ica* γονιδίων (*icaABCD*).

Τέλος, η ρύθμιση και ο συντονισμός όλου αυτού του φαινομένου, γίνεται μέσω ενός συστήματος ενδοεπικοινωνίας με φερομόνες (quorum-sensing system) που αποτελεί το *agr* σύστημα και που κωδικοποιείται από τα φερώνυμα γονίδια (*agrABCD*). Μεταξύ άλλων, το *agr* σύστημα του *S.epidermidis*, σταδιακά και όσο ωριμάζει η αποικία, παράγει προφλεγμονώδη πεπτιδία (PSM), τα οποία προσελκύουν στην εστία της φλεγμονής ουδετερόφιλα και μακροφάγα που, προκαλώντας ιστική νέκρωση, παρέχουν στα βακτήρια απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (Otto M *et al*, 1998).

Μ' άλλα λόγια, τα μέλη της αποικίας βιομεμβράνης, απολαμβάνουν ένα είδος «βακτηριακού ασύλου», καθώς παραμένουν απρόσβλητα από τα αντιβιοτικά και από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Τα μακροφάγα που συρρέουν στην περιοχή, όχι μόνο δεν μπορούν να φαγοκυτταρώσουν αποτελεσματικά τα βακτήρια, αλλά με διάφορα ένζυμα που παράγουν διευκολύνουν την διασπορά τους, ενώ τα παραγόμενα αντισώματα, ακόμη και όταν συνδέονται με τα αντιγόνα, δεν είναι δυνατόν να ασκήσουν την οψωνική τους δράση (Wilson M, 2001).

Ανάλογη παθογόνο δράση με τους προαναφερόμενους *S.aureus* και *S.epidermidis*, παρουσιάζουν και οι υπόλοιποι σταφυλόκοκκοι. Ο *S.haemolyticus* ευθύνεται για λοιμώξεις του ουροποιητικού, μικροβιαίμιες, διαπυήσεις τραυμάτων τυχαίων και χειρουργικών και αποφολιδωτική ερυθροδερμία. Ο *S.saprophyticus* (της ομάδας των νοβοβιοκίνη-ανθεκτικών σταφυλοκόκκων) παρουσιάζει ιδιαίτερο τροπισμό για τα κύτταρα του ουροποιητικού και παράγει ουρεάση με αποτέλεσμα να αποτελεί αίτιο ουρολοιμώξεων όπως προστατίτιδα, κυστίτιδα, πνευμονοφρίτιδα, μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα ενώ ευθύνεται και για την οξεία αιμορραγική κυστίτιδα σε αγόρια. Ουρολοιμώξεις συχνά προκαλεί και ο *S.warneri* όπως και

ενδοκαρδίτιδες, σηψαιμίες και λοιμώξεις τραυμάτων. Αντίθετα ο *S.lugdunensis* συχνότερα προκαλεί νόσους του δέρματος και των υποδορίων ιστών ενώ ο *S.xylosus* προσβάλλει συχνότερα ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, προκαλώντας ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδιακό απόστημα, οξεία πυελονεφρίτιδα, μικροβιαμία και περιτονίτιδα.

## II.ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

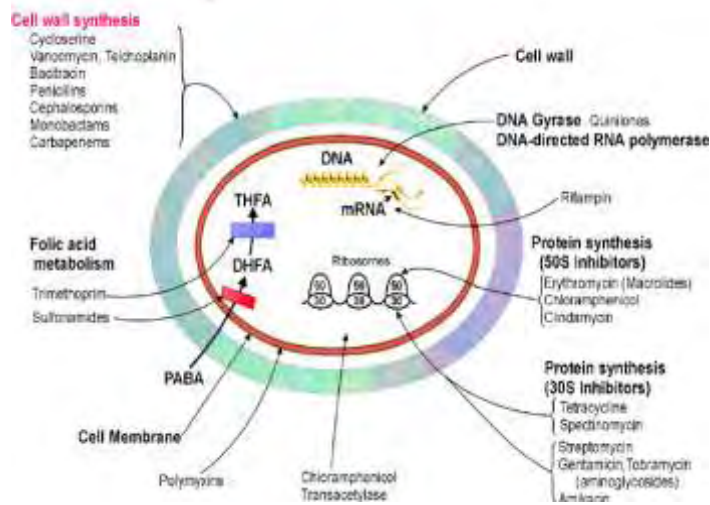
Οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα και συχνότερα ανευρισκόμενα παθογόνα τόσο σε ενδονοσοκομειακές όσο και σε εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις.

Πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών και μέχρι την εισαγωγή της πενικιλίνης στην κλινική πράξη, οι λοιμώξεις από *S.aureus* ήταν οι συχνότερες λοιμώξεις, τόσο στην κοινότητα όσο και στους ενδονοσοκομειακούς ασθενείς, με υψηλή θνητότητα. Αυτό άλλαξε με την εισαγωγή της πενικιλίνης, γρήγορα όμως εμφανίστηκαν τα πρώτα στελέχη με αντοχή στην πενικιλίνη (β-λακταμάση).

Η κατάσταση βελτιώθηκε και πάλι για το διάστημα που ακολούθησε, με την εισαγωγή των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών (methicillin, oxacillin) και πάλι όμως, μόλις μέχρι το 1961, οπότε και δημοσιεύεται η πρώτη αναφορά για methicillin-ανθεκτικό στέλεχος σταφυλοκόκκου *S.aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA). Μέχρι τις μέρες μας, οι σταφυλόκοκκοι συνεχίζουν να εξελίσσουν τη λοιμογόνο τους δύναμη, να εμφανίζουν νέες ιδιότητες και να αναπτύσσουν νέους μηχανισμούς αντοχής απέναντι στα γνωστά αντιβιοτικά, κάνοντάς τους στην εποχή μας τους συχνότερους και σημαντικότερους λοιμογόνους παράγοντες στην κοινότητα και το νοσοκομείο.

Σήμερα, τα συχνότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των σταφυλοκόκκων ανήκουν σε κάποια από τις παρακάτω κατηγορίες: β-λακταμικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονομπακτάμες, πενέμες), αμινογλυκοσίδες, κινολόνες, μακρολίδες, λινκοζαμίδες, γλυκοπεπτιδία, οξαζολιδιόνες, τετρακυκλίνες. Η ανάπτυξη αντοχής και πολυαντοχής των σταφυλοκόκκων απέναντι στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, αποτελεί παγκοσμίως, σοβαρότατο πρόβλημα για την αντιμετώπιση, ιδιαιτέρως, των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων.

Εικόνα 5: αντιβιοτικά και στόχος δράσης τους κατά των σταφυλοκόκκων



Η επιλογή του αντιβιοτικού, είναι μία διαδικασία που στηρίζεται στο αντιβιογράμμα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του εκάστοτε ασθενή και της λοίμωξης. Εντούτοις, το Ινστιτούτο CLSI, έχει καταρτίσει σχετική οδηγία, βάσει της οποίας καθορίζεται η προτεραιότητα με την οποία πρέπει να χρησιμοποιούνται οι διάφορες ομάδες αντιβιοτικών κατά των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (πίνακας 7)

Πίνακας 7: Χρήση των ομάδων αντιβιοτικών κατά προτεραιότητα στη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων

A' επιλογής	β-λακταμικά	Oxacillin, Penicillin
B' επιλογής	Μακρολίδες Λινκοσαμίδες Οξαζολιδινόνες Σουλφοναμίδες Γλυκοπεπτιδία	Erythromycin, Clarithromycin Clindamycin Linezolid Sulfamethoxazole/Trimethoprim Vancomycin, Teicoplanin
Γ' επιλογής	Αμινογλυκοσίδες Κινολόνες Στρεπτογραμμίνες Φενικόλες Ανσαμκίνες Φουσιδάνες	Gentamycin, Amikacin, Netilmicin Ciprofloxacin, Levofloxacin Quinupristin/dalfopristin Chloramphenicol Tetracyclin, Doxycyclin Fucidic acid

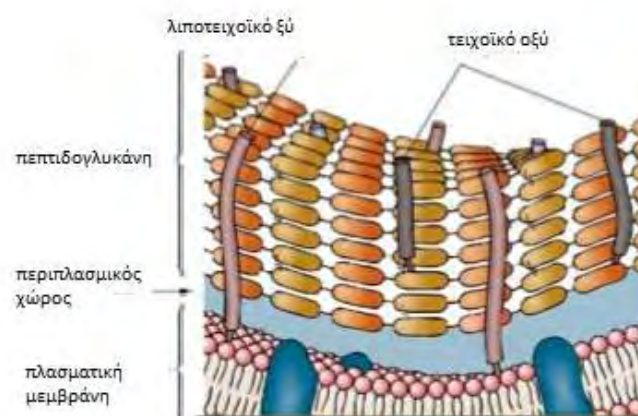
Η πενικιλίνη μπήκε στην κλινική πράξη για την καταπολέμηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων το 1944. Εκείνη την εποχή, σχεδόν το 95% των

σταφυλοκόκκων παρουσίαζε ευαισθησία στο νέο παράγοντα, δημιουργήθηκε μάλιστα η – λανθασμένη όπως απέδειξε η συνέχεια – εντύπωση, ότι με τον τρόπο αυτό είχε λυθεί άπαξ και δια παντός το πρόβλημα των μικροβιακών λοιμώξεων. Δυστυχώς, μόλις μέχρι το 1950, ήδη το 50% των στελεχών είχε αναπτύξει αντοχή στην πενικιλίνη. Κάπου εκεί ξεκίνησε ο αγώνας δρόμου μεταξύ των μικροβίων και των φαρμακοβιομηχανιών, με την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από τη μια και, την ανάπτυξη νέων μηχανισμών αντοχής από την άλλη, κάτι που συνεχίζεται μέχρι την εποχή μας.

Έτσι, αμέσως μετά την πενικιλίνη, ακολούθησε η εισαγωγή της μεθικιλίνης στην κλινική πράξη, που όμως οδήγησε στην ανάπτυξη - ήδη από το 1960 - στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών σ' αυτή. (**Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus - MRSA**) (Livermore DM, 2000). Η αντοχή στη μεθικιλίνη στους σταφυλοκόκκους έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την παρουσία μιας ειδικής πρωτεΐνης, της PBP2' (PBP2a), που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια για τα β-λακταμικά και η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* (Zapum M *et al*, 2008, Yadegar A *et al*, 2009).

Η μεθικιλίνη είναι ένα αντιβιοτικό που όπως και τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρα στο κυτταρικό τοίχωμα των σταφυλοκόκκων. Το κυτταρικό τοίχωμα αυτών όπως και όλων των gram (+) μικροοργανισμών, έχει τη δομή που φαίνεται στην εικόνα 6, αποτελούμενο από μονομερή πεπτιδογλυκάνης.

Εικόνα 6: Χημική σύσταση κυτταρικού τοιχώματος gram(+)

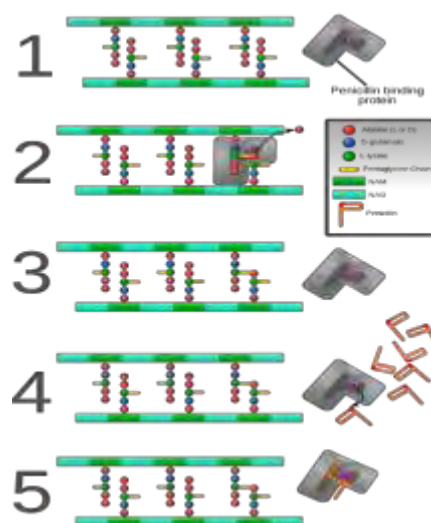


Οι PBPs (penicillin binding proteins) αποτελούν πρωτεΐνες του βακτηρίου, που συμμετέχουν στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, λειτουργώντας σαν ένζυμα με δράση τρανσπεπτιδασών, που προάγουν την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Αποτελούν δηλαδή φυσιολογικές μικροβιακές πρωτεΐνες που πήραν το όνομά τους ακριβώς γιατί αποτελούν το στόχο των πενικιλλινών.

Τα μόρια των β-λακταμικών συνδεόμενα με τις PBPs, τις απενεργοποιούν και επομένως δεν επιτρέπουν τη σύνθεση και τον πολυμερισμό των μορίων της πεπτιδογλυκάνης, καθιστώντας προβληματικό τον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηριακού κυττάρου κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού του.

Χάρη στο *mecA* γονίδιο, το βακτήριο αλλάζει τη σύνθεση των PBPs, δηλαδή αλλάζει γονιδιακά το στόχο του αντιβιοτικού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το βακτήριο να καθίσταται απρόσβλητο από τα β-λακταμικά, καθώς αυτά αδυνατούν να «αναγνωρίσουν» τη θέση σύνδεσής τους στο βακτηριακό τοίχωμα και συνεπώς να δράσουν (Choi S M *et al*, 2003).

Εικόνα 7: Οι PBPs συμμετέχουν ενζυμικά στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος προάγοντας τους δεσμούς αλανίνης – λυσίνης μεταξύ των μονομερών N-ακετυλογλυκολαμίδης – N-ακετυλομουραμικού οξέος. Τα β-λακταμικά «μπλοκάρουν» τις PBPs και τη δράση τους και αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.



Στις μέρες μας, σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά και στην Ελλάδα, η παρουσία των ανθεκτικών στην μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων, είτε *S. aureus* (MRSA) είτε CoNS (MRCoNS) έχει λάβει σοβαρές διαστάσεις. Ειδικά για τον *S. epidermidis* και για τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, ήδη από το 1994 καταγράφεται αντοχή στη μεθικιλίνη που αγγίζει το 80% (Rupp ME *et al*, 1994).

Ειδικότερα για την Ελλάδα και για τις σοβαρές λοιμώξεις από MRSA, έχει αποδειχτεί ότι αυτές συνδέονται με την παρουσία ενός συγκεκριμένου λοιμογόνου παράγοντα, του *Panton-Valentine leukocidin* (PVL). Ως επικρατών PVL-θετικός τύπος για την Ελλάδα και για το διάστημα από το 2001 έως και το 2012, καταγράφηκε ο ST80-IV (Drougka E *et al*, 2014) ο οποίος φαίνεται ότι πέρασε από την κοινότητα, στα Νοσοκομεία και εξελίχθηκε σε κυρίαρχο, εκτοπίζοντας προϋπάρχοντες PVL-θετικούς τύπους.

Τα γλυκοπεπτιδία, vancomycin και teicoplanin αποτέλεσαν το βασικό όπλο για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών στην μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων, από το 1958 που τέθηκαν στη διάθεση των κλινικών ιατρών. Η βανκομυκίνη δρα συνδεδεμένη στο C-τελικό acyl-D-alanyl-D-alanine του πενταπεπτιδίου της πεπτιδογλυκάνης, διαταράσσοντας το μηχανισμό σχηματισμού του κυτταρικού τοιχώματος. Εντούτοις ήδη από το 1979 άρχισαν να παρατηρούνται τα πρώτα στελέχη CoNS με μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτιδία κάτι στο οποίο δεν δόθηκε μεγάλη προσοχή, μέχρι να απομονωθεί στην Ιαπωνία το 1997 στέλεχος *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη. Η ανεύρεση σταφυλοκόκκων με ενδιάμεση ευαισθησία (vancomycin-intermediate, VI Staphylococci) ή αντοχή (vancomycin-resistant, VR Staphylococci) στα γλυκοπεπτιδία, είναι σαφώς σπανιότερη αλλά οπωσδήποτε αυξανόμενη συν τω χρόνω (Fridkin SK 2001).

Η αντοχή σχετίζεται με την παρουσία των γονιδίων *van* τα οποία ενεργοποιούνται από το ρυθμιστικό σύστημα VanR-VanS (two-component regulatory system) σαν απάντηση στην παρουσία του αντιβιοτικού στον εξωκυττάριο χώρο. Το γονίδιο *vanA* είναι υπεύθυνο για την υψηλού επιπέδου επαγόμενη αντοχή, τόσο στην βανκομυκίνη όσο και στην τεϊκοπλανίνη, ενώ τα στελέχη που έχουν το γονίδιο *vanB* είναι ανθεκτικά στη βανκομυκίνη αλλά ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη (Hong HJ *et al*, 2008). Στην Van-A τύπου αντοχή, στο τελικό άκρο της πεπτιδογλυκάνης, η αλανίνη αντικαθίσταται από γαλακτικό

οξύ (D-Ala-D-Lac) με αποτέλεσμα η βανκομυκίνη να μην μπορεί να συνδεθεί στη θέση στόχο και κατά συνέπεια να καθίσταται ανενεργός. Τα γονίδια που συμμετέχουν σ' αυτή τη διαδικασία, συχνά ανευρίσκονται σε πλασμίδια τύπου Tn1576 και κωδικοποιούν την παραγωγή 9 πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αντοχής (Moubareck C *et al*, 2009). Στους σταφυλοκόκκους, φαίνεται ότι η εμφανιζόμενη αντοχή στα γλυκοπεπτιδία, σε λιγότερες περιπτώσεις έχει συσχετιστεί με το γονίδιο *vanA* (González-Zorn B *et al*, 2003), ενώ συχνότερα οφείλεται στην ποσοτική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος (VISA/GISA) (Murray PR *et al*, 2003).

Όσον αφορά στην αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, τους βασικούς παράγοντες αντοχής αποτελούν τα ένζυμα μετατροπής των αμινογλυκοσιδών (Aminoglycoside modifying enzymes, AMEs). Μέχρι σήμερα, τέσσερις τάξεις των AMEs έχουν αναγνωρισθεί: οι ακετυλοτρανσφεράσες (AACs), οι φωσφοτρανσφεράσες (APHs), οι νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες (ANTs) και οι αδενυλοτρανσφεράσες (AADs). Οι AMEs μπορούν να είναι είτε ενδογενείς είτε να φέρονται σε πλασμίδια. Στα σταφυλοκοκκικά στελέχη οι συχνότερες μεταλλάξεις που αφορούν AME είναι οι *aph (3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* και *aac (6')-Ie-aph(2'')* (Liakopoulos A *et al*, 2011). Επίσης, τα γονίδια *ant(4')-Ia* που κωδικοποιεί το ένζυμο ANT(4')-I και *aph(3')-IIIa* που κωδικοποιεί το ένζυμο APH(3')-III, είναι τα συχνότερα ανευρισκόμενα σε σταφυλοκόκκους που αφορούν ANTs και APHs αντίστοιχα. (Yadegar A *et al*, 2009, Sekiguchi J *et al*, 2004).

Οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζουν επίσης ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες. Οι μακρολίδες που κυκλοφορούν στο εμπόριο έχουν ένα 14-μελή (dirithromycin, erythromycin, roxithromycin), 15-μελή (azithromycin) ή 16-μελή δακτύλιο λακτόνης (josamycin, midecamycin, miocamycin, rokytmicin, spiramycin). Οι μακρολίδες ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, λειτουργούν αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση του μικροβίου. Τα πρώτα κλινικά στελέχη σταφυλοκόκκων με αντοχή στις μακρολίδες, περιγράφηκαν σε διάφορες αναφορές στην Ευρώπη, την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ λίγο διάστημα μετά την εισαγωγή του αντιβιοτικού στην κλινική πράξη, (1953).

Με βάση τη βιοχημική δράση της ερυθρομυκίνης, η αντοχή στα περισσότερα στελέχη που έχει περιγραφεί μπορεί να αποδοθεί σε μετα-

μεταφραστικές τροποποιήσεις του 23S rRNA από μία αδενο-ειδική N-μεθυλοτρανσφεράση που καθορίζεται από μία ομάδα γονιδίων που ονομάζονται *erm* γονίδια (erythromycin ribosome methylation, *erm*). Τα γονίδια αυτά λειτουργούν προκαλώντας μεθυλίωση και αλλαγή του ριβοσωμικού στόχου και προκαλούν διασταυρούμενη αντοχή στις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τη στρεπτογραμίνη Β (Macrolides Lincosamides Streptogramin B – **MLS<sub>B</sub>** φαινότυπος). Την τελευταία δεκαετία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περίπου 30 γονίδια *erm* από διάφορες πηγές, που κυμαίνονται από κλινικά παθογόνα έως ακτινομύκητες που παράγουν αντιβιοτικά (B. Weisblum, 1995).

Άλλος μηχανισμός είναι ο μηχανισμός αντλίας MsrA (M-φαινότυπος) που σε σχέση με τον MLS<sub>B</sub>, διαφέρει ως προς το ότι επηρεάζει μόνο τις μακρολίδες (Murray PR *et al*, 2003). Επηρεάζει μόνο τα 14-μελή και 15-μελή της οικογένειας των μακρολιδών, ενώ σχετίζεται με την παρουσία των *mef* γονιδίων, τα οποία μεταφέρονται και από είδος σε είδος με σύζευξη. Έως και το 70% των απομονωθέντων σταφυλοκοκκικών στελεχών σε μελέτες στην Ελλάδα, παρουσιάζουν κάποιου τύπου αντοχής στις μακρολίδες (Vallianou N *et al*, 2015).

Από το 1999 και μετά, στη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων μπήκε και ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό, η **κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη** (synergid) ως αντίμετρο στην ανάπτυξη στελεχών με ελαττωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτιδία. Αυτό αποτελείται από 2 συστατικά, το συστατικό Α και το συστατικό Β τα οποία συνδεόμενα σε διαφορετικές θέσεις, στην 23S ριβοσωμική υποομάδα, αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση και προκαλούν βακτηριοκτόνο δράση. Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στους σταφυλοκόκκους, συνδέεται πάντα με ανάπτυξη αντοχής στο Α συστατικό και όχι απαραίτητα και στο Β συστατικό. Ο μηχανισμός αντοχής για το μεν Α συστατικό, σχετίζεται με την παρουσία των γονιδίων *vatABCDE* (που κωδικοποιούν ακετυλοτρανσφεράσες που αδρανοποιούν το αντιβιοτικό) και τα γονίδια *vgaAB* και *Isa* που σχετίζονται με την παραγωγή πρωτεϊνών που συνδέονται με το ATP. Όσον αφορά δε το συστατικό Β, η αντοχή σχετίζεται με την μεθυλίωση του 23S rRNA ως αποτέλεσμα της έκφρασης των γονιδίων *erm*



που αφορούν τον MLSB φαινότυπο (επαγόμενης αντοχής σε μακρολίδες, λινκοζαμίδες και στρεπτογραμμίνη Β)

Οι νεώτερες **κινολόνες**, όπως οι levofloxacin και η moxifloxacin, έχουν περιορισμένη χρήση στη θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Γενικά τα περισσότερα methicillin-ευαίσθητα στελέχη, είναι ευαίσθητα και στις παραπάνω κινολόνες. Αντίθετα, στελέχη MRSA και MRCoNS, παρουσιάζουν υψηλού βαθμού επίκτητη αντοχή στην ciprofloxacin και διασταυρούμενη αντοχή και στις νεότερες κινολόνες. Γενικά, ένδειξη για τη χορήγηση νεωτέρων κινολονών αποτελούν η οξεία βακτηριακή παρόξυνση χρόνιας βρογχίτιδας, η ενδο- ή έξω-νοσοκομειακή πνευμονία, παραρρινοκολπίτιδα, λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (απλές και επιπεπλεγμένες) και η βακτηριακή επιπεφυκίτιδα (**Benbouzid F *et al*, 2015, Yovel OS *et al*, 2016**).

Η **δαπτομυκίνη**, αποτελεί νεότερο κυκλικό λιποπεπτιδικό αντιβιοτικό με μικροβιοκτόνο δράση, που δρα στην κυτταρική μεμβράνη, διαφοροποιούμενο έτσι από τα γλυκοπεπτιδικά. Χορηγείται σε εφ' άπαξ ημερήσια δόση δεδομένου του μεγάλου χρόνου ημισείας ζωής της. Σήμερα χρησιμοποιείται στη χειρουργική σαν παράγων χημειοπροφύλαξης στη χρήση βιοπροσθετικών υλικών όπως βηματοδότες (**Taegtmeyer AB *et al*, 2016**) και υλικά οστεοσύνθεσης (**Kuo FC *et al*, 2016**). Η φυσική ενδογενής αντοχή έναντι της δαπτομυκίνης είναι σπάνια στους σταφυλοκόκκους.

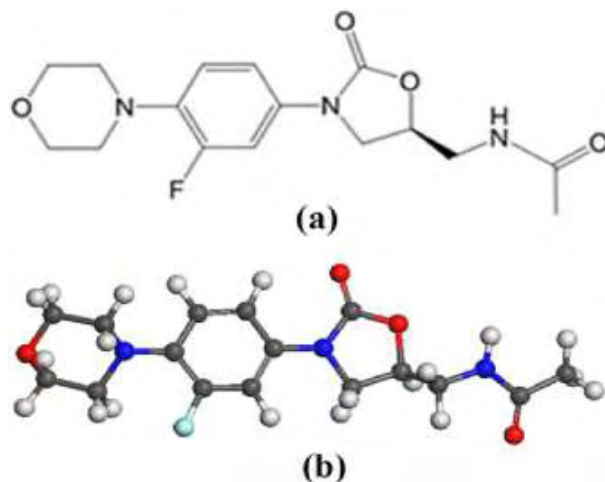
Μία άλλη διάσταση στο πρόβλημα της ανάπτυξης πολυανθεκτικών στελεχών προκύπτει από το γεγονός της ευρείας χρήσης των αντιβιοτικών στη βιομηχανία της εκτροφής ζώων. Μελέτες απέδειξαν ότι στελέχη σταφυλοκόκκων τόσο *S.aureus* όσο και μια σειρά CoNS (όπως *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. intermedius*) με φαινοτύπους αντοχής, μπορούν να περάσουν μέσω της διατροφικής αλυσίδας, από το νωπό κρέας, στη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου και από εκεί στην κοινότητα. Γονίδια αντιβιοαντοχής όπως το *mecA*, το *cfrr* και άλλα, που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής σε αντιβιοτικά όπως τα β-λακταμικά, οι κινολόνες, οι μακρολίδες, οι λινκοσαμίδες και οι στρεπτογραμμίνες Β φαίνεται ότι μπορούν έτσι να περάσουν στον άνθρωπο και να θέσουν υπό αίρεση την ασφάλεια της διατροφής μας (**Osman K *et al*, 2016, Klimiene I *et al*, 2016**).

### III ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗΣ

#### III.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η λινεζολίδη (linezolid) ανήκει στις οξαζολιδίνες ή οξαζολιδινόνες, μία καινούρια σχετικά τάξη αντιβιοτικών με δράση κατ' εξοχήν έναντι των Gram (+) βακτηρίων. Γενικά, πρόκειται για έναν αντιμικροβιακό παράγοντα που δρα στο ριβόσωμα, διαταράσσοντας τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης των βακτηρίων και κατά κανόνα έχει μικροβιοστατική δράση (Slee AM *et al*, 1987, Mercier RC *et al*, 1997). Εξαιρέση αποτελούν μερικά στελέχη στρεπτοκόκκων (όπως ο *Streptococcus pneumoniae*), το *Bacteroides fragilis* και το *Clostridium perfringens* (Zurenko GE *et al*, 1996). Η μικροβιοστατική δράση της δεν ενισχύεται παρουσία αμινογλυκοσιδών (Jones RN *et al*, 1996).

Εικόνα 8: Χημική δομή μορίου λινεζολίδης



Ειδικότερα έναντι των σταφυλοκόκκων, η λινεζολίδη έχει βακτηριοστατική δράση ανεξάρτητα από την αντοχή τους στα β-λακταμικά, τις μακρολίδες και τα γλυκοπεπτιδικά. Έτσι μπορεί να δώσει θεραπευτικές λύσεις σε σοβαρές λοιμώξεις από στελέχη MRCoNS ή MRSA, στελέχη με ενδιάμεση αντοχή ή αντοχή στη βανκομυκίνη (Rybak M J *et al*, 2000) και φυσικά σε όλα τα στελέχη με αντοχή σε μακρολίδες και λινκοζαμίδες (MLSB φαινότυπος κλπ). Το όριο της MIC για τους σταφυλοκόκκους και τη λινεζολίδη, βάσει του NCCLS, είναι τα 2 µg/ml (Noskin GA *et al*, 1999). Έτσι όσα στελέχη παρουσιάζουν MIC 4

μg/ml και πάνω, χαρακτηρίζονται ανθεκτικά στη λινεζολίδη. Η θεραπευτική δόση, είτε ενδοφλεβίως είτε per os, είναι 600 mg/12 ωρο και οι ενδείξεις χρήσης της στους σταφυλοκόκκους αφορούν πνευμονία της κοινότητας, επιπεπλεγμένες λοιμώξεις δέρματος, χρόνια οστεομυελίτιδα και μικροβιαμία.

Αντίστοιχη είναι η δράση της λινεζολίδης στους εντεροκόκκους, όπου και πάλι η ευαισθησία της δείχνει να είναι ανεξάρτητη από τυχόν αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά, όπως τη βανκομυκίνη ή οι μακρολίδες. Η ευαισθησία καθορίζεται σε τιμές MIC  $\leq 2$  μg/ml, MIC 4 μg/ml υποδεικνύει ενδιάμεση αντοχή και MICs 8 μg/ml και πάνω χαρακτηρίζουν τα ανθεκτικά στελέχη. Η θεραπευτική της δόση δεν διαφέρει από αυτή των σταφυλοκόκκων. (**Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2011**).

Η λινεζολίδη είναι δραστική και σε Gram (+) βακτηρίδια όπως είναι οι λιστέρειες, τα κορυνοβακτηρίδια και οι Βάκιλλοι. Επίσης, ευαίσθητα στη λινεζολίδη είναι και άλλα σπανιότερα βακτήρια όπως *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leuconostoc spp*, *Pediococcus spp* και *Rodococcus equi* (**Zurenko GE et al, 1996, Jones RN et al, 1996, Bowersock TL et al, 2000**) καθώς επίσης και οι Νοκάρδιες (**Brown-Elliott BA et al, 2001**).

Όσον αφορά τη δραστηριότητα της λινεζολίδης έναντι στελεχών *Mycoplasma*, *Ureoplasma* και *Chlamydia spp* που σχετίζονται με διάφορες λοιμώξεις (π.χ. κατωτέρου αναπνευστικού), αυτή έχει ήδη μελετηθεί *in vitro* (**Moellering RC Jr, 1999**). Ειδικότερα έχει αποδειχτεί εργαστηριακά ότι ενώ το *M. hominis* παρουσιάζει ευαισθησία στην λινεζολίδη, τα *M. pneumoniae* και *U. urealyticum* είναι ανθεκτικά σ' αυτή (**Kenny GE et al, 2001**).

Όλο και περισσότερες πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν τη δράση της λινεζολίδης και στα αναερόβια βακτήρια. Μελέτες έχουν αποδείξει σταθερή ευαισθησία Gram (+) αναερόβιων όπως τα *Bacteroides fragilis* και *Clostridium perfringens* (**Akhi MT et al, 2015**) και *Fingoldia magna* και *Peptoniphilus harei* (**Shilnikova II et al, 2015**) στη λινεζολίδη.

Η δράση της λινεζολίδης έχει αποδειχτεί και στα οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια και συγκεκριμένα έναντι του *M. tuberculosis* (**Zurenko GE et al, 1996, Ashtekar DR et al, 1991**), του *M. avium* (**Peters J et al, 1995, Wu M et al, 1998**) και των ταχέως αναπτυσσομένων μυκοβακτηριδίων (**Wallace RJ Jr et al, 2001**).

Τέλος στα Gram (-) βακτηρίδια φαίνεται ότι η δράση της λινεζολίδης είναι περιορισμένη.

### III.2. ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Σύντομα μετά την εισαγωγή των πρώτων αντιμικροβιακών παραγόντων στην κλινική πράξη, αποδείχτηκε η ικανότητα των μικροβίων να αναπτύσσουν μηχανισμούς εξουδετέρωσής τους, οι οποίοι καθιστούν τους πρώτους ανενεργούς έναντι των δευτέρων. Έτσι ήδη από το 1945 περιγράφηκαν τα πρώτα στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στην πενικιλίνη (Spink WW *et al*, 1945).

Από τότε μέχρι τις μέρες μας οι Gram (+) μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών. Πέραν της πολύ διαδεδομένης αντοχής στις μακρολίδες και τις λινκοσαμίδες σοβαρό πρόβλημα στη θεραπευτική αποτελεί η εμφάνιση σταφυλοκόκκων με αντοχή στην οξασιλλίνη και τα γλυκοπεπτιδία (Panlilio AL *et al*, 1992, Schwalbe RS *et al*, 1987). Ανάλογο και ίσως σοβαρότερο προβληματισμό, προκαλούν εντερόκοκκοι με αντοχή στα γλυκοπεπτιδία (VREs) (Jones RN *et al*, 1995) ιδιαίτερα δε ο *E. faecium* που μπορεί να αναπτύξει αντοχή σε όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά (Moellering RC, 1998). Τέλος και στους στρεπτοκόκκους παρατηρείται αυξανόμενη αντοχή στην πενικιλίνη. Σχετικές μελέτες αφορούν τόσο πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους (*Str. viridans*) (Pfaller MA *et al*, 1998) όσο και πνευμονιοκόκκους (*Str. pneumoniae*) (Doern GV *et al*, 1998).

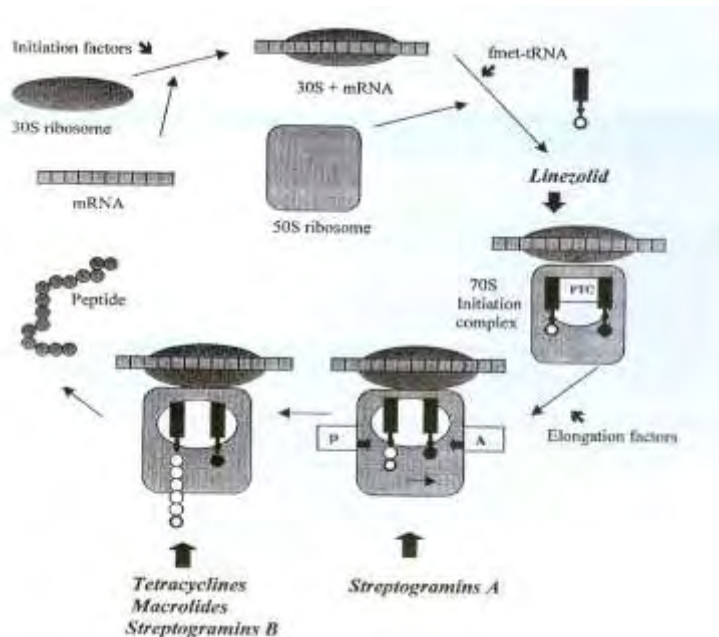
Τέτοια πολυανθεκτικά Gram (+) στελέχη είναι υπεύθυνα για μεγάλο αριθμό σοβαρών ενδονοσοκομιακών λοιμώξεων κάνοντας την ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων επιτακτική. Μία νέα τάξη αντιβιοτικών λοιπόν αποτελούν οι οξαζολιδίνες, με βασικότερο εκπρόσωπο τη λινεζολίδη.

Στόχος των παραπάνω αντιβιοτικών αποτελεί το ριβόσωμα του μικροβίου. Το ριβόσωμα αποτελεί το «εργοστάσιο» παραγωγής πρωτεϊνών του βακτηριακού κυττάρου δηλαδή είναι το σημείο όπου λαμβάνει χώρα η πρωτεϊνοσύνθεση και αποτελεί το στόχο διαφόρων αντιβιοτικών. Οι οξαζολιδινόνες προσδένονται στο κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (peptidyltransferase center, PTC), δηλαδή στο ενεργό κέντρο δημιουργίας των

πεπτιδικών δεσμών - όπως αποδείχτηκε από τους Martin et al, με τεχνική *in vivo* πρόσδεσης (crosslinking) (Martin *et al*, 2009).

Εκτός από τα βακτηριακά ριβοσώματα, οι οξαζολιδινόνες έχουν την ικανότητα να προσδένονται και στα ευκαρυωτικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα 70S και εκεί ακριβώς αποδίδονται οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται μετά από παρατεταμένη θεραπεία (Leach KL *et al*, 2007).

Εικόνα 9: (Maniatis AN *et al*, 2006). Σχηματική αναπαράσταση πρόσδεσης και δράσης αντιβιοτικών στο ριβόσωμα.

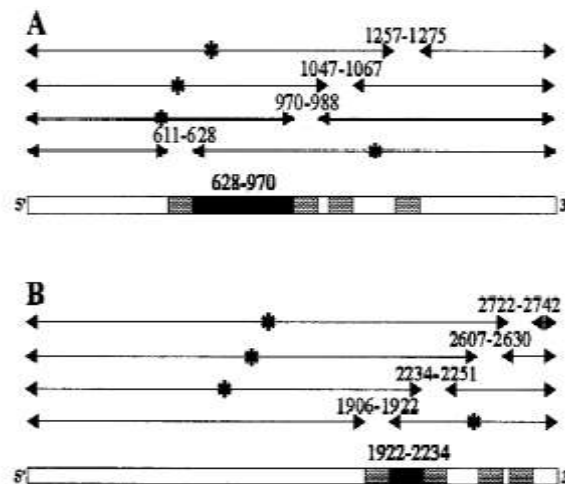


Το πού και πώς ακριβώς δρουν οι οξαζολιδινόνες στο ριβόσωμα σε μοριακό επίπεδο, αποτέλεσε σημείο αντιπαράθεσης, μιας και δύο διαφορετικές περιοχές του ριβοσώματος, η L1 stalk / E περιοχή και το ενεργό κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (PTC) υποδείχτηκαν ως θέσεις - στόχοι των συγκεκριμένων αντιμικροβιακών (Matassova NB *et al*, 1999 και Lin AH *et al*, 1997, αντίστοιχα). Αντιστοίχως, έχει προταθεί ότι οι οξαζολιδινόνες, δρουν σε διάφορα λειτουργικά στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης, από τον πρώτο πεπτιδικό δεσμό μέχρι την EF-G μετακίνηση και την λήξη (Colca JR *et al*, 2003, Wilson DN, 2004).

Εντούτοις σαφέστερη εικόνα δίνει η μελέτη των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την αντοχή στις οξαζολιδινόνες, οι οποίες και σχετίζονται σαφώς

με το γονίδιο της περιοχής της PTC και όχι της περιοχής E και L1 (Sander P *et al*, 2002).

*Εικόνα 10:* (Matassova NB *et al*, 1999). Εντοπισμός σημείου πρόσδεσης οξαζολιδινών με πειράματα cross linking με πέψη με RNAάση H, A. στο 16S, B. στο 23S. Τα ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδικά σημεία πρόσδεσης παρουσιάζονται με γκρι χρώμα, οι αναγνωρισμένες περιοχές πρόσδεση της οξαζολιδινόνης με μαύρο χρώμα. Από τα δύο θραύσματα που λήφθηκαν από πέψη με RNAάση H (γραμμές με βέλη), το ραδιενεργά σημασμένο τμήμα υποδεικνύεται με αστερίσκο.



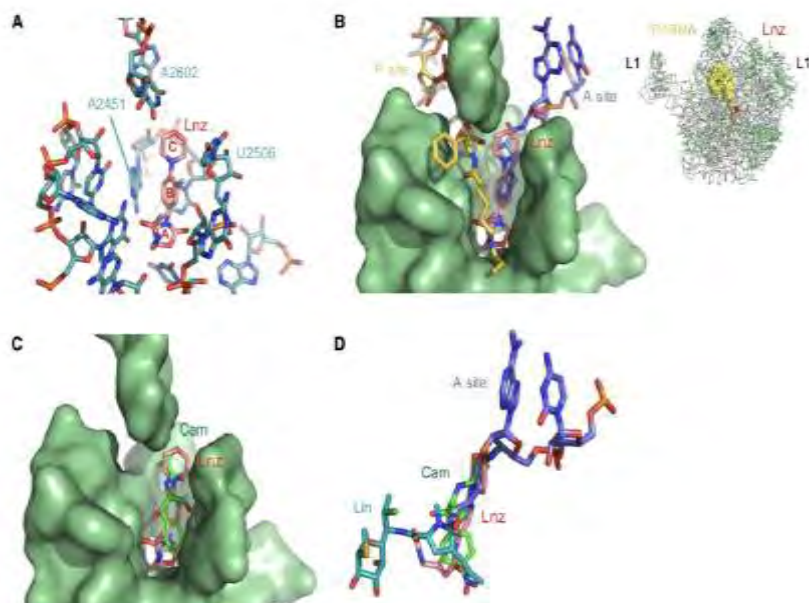
Μια απεικόνιση του πώς συνδέονται οι οξαζολιδινόνες στο κέντρο της PT γίνεται με *in vivo* πρόσδεση (crosslinking) της 125 I-σημασμένης οξαζολιδινόνης σε ριβοσώματα *S.aureus* (Colca JR *et al*, 2003). Με τον τρόπο αυτό υποδεικνύονται ως θέσεις πρόσδεσης του αντιμικροβιακού στο PTC, το νουκλεοτίδιο A2606 του 23S rRNA, το tRNA, η N-τελική περιοχή της L27 ριβοσωμικής πρωτεΐνης και η πρωτεΐνη LepA. Ειδικά η τελευταία, είναι ένας παράγοντας επιμήκυνσης που μεταφέρει τα βακτηριακά ριβοσώματα από μία post-translocation (POST) κατάσταση, όπου tRNAs βρίσκονται στις θέσεις P και E, σε μία pre-translocation (PRE) κατάσταση, όπου τα tRNAs βρίσκονται στις θέσεις A και P αποτρέποντας έτσι τα μεταφραστικά λάθη. Επομένως οι οξαζολιδινόνες μην επιτρέποντας την μετάβαση από την POST στην PRE κατάσταση ουσιαστικά αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση (Qin Y *et al*, 2006, Wilson DN *et al*, 2007).

Με τη χρήση φωτοδραστικών ομάδων μηδενικού μήκους στα δύο άκρα του οξαζολιδινικού παραγώγου και με την κλασσική τεχνική του crosslinking προσδιορίστηκε η ακριβής θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης στο ενεργό

κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης στα ριβοσώματα του *S.aureus*. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 11, η λινεζολιδη συνδέεται στη θέση A ώστε ο τελικός δακτύλιος C να προσανατολίζεται προς τη βάση A2606, ο δακτύλιος A να πατάει στο ριβοσωμικό τούνελ και ο δακτύλιος B ανάμεσα στη βάση του A1205 και τη ριβόζη του U2506 κατάλοιπου (εικόνα 11, A). Με τον προσανατολισμό αυτό η λινεζολιδη παρεμβαίνει στην ορθή τοποθέτηση του αμινοακυλιωμένου - CCA άκρου του A-tRNA και δεν επεμβαίνει στη θέση P. Εντούτοις φαίνεται ότι ο προσδέτης της θέσης P (P-tRNA) διαμορφώνει ανάλογα το A2606 κατάλοιπο και κάνει δυνατή τη σύνδεση της λινεζολιδης στο PTC. Τέλος, επειδή τόσο η λινκομυκίνη όσο και η χλωραμφενικόλη είναι αντιβιοτικά που συνδέονται ανάλογα στο PTC, ανταγωνίζονται τη λινεζολιδη και επομένως η ταυτόχρονη χορήγησή τους ως θεραπευτική πρακτική, αντενδείκνυται (εικόνα 11, C-D) (Bashan A *et al*, 2003, Wilson DN, 2007, Marks J *et al*, 2016).

Εικόνα 11 (Wilson DN, 2007). Προσανατολισμός της λινεζολιδης στο ενεργό κέντρο πεπτιδυλοτρανσφεράσης (PTC) του ριβοσώματος.

A. Μοντέλο για τη θέση πρόσδεσης της λινεζολιδης (Lnz, κόκκινο) σε σχέση με τα νουκλεοτίδια (μπλε) στο PTC. Οι δακτύλιοι A, B και C της λινεζολιδης και οι βάσεις A2606, U2506 και A2451 είναι επισημασμένα. B. Σχετική θέση της λινεζολιδης (κόκκινο) στο CCA τέλος της A (μπλε) και P περιοχής (κίτρινο) tRNA. Τα νουκλεοτίδια του PTC παρουσιάζονται σαν πράσινη επιφάνεια. C. Σχετική θέση της λινεζολιδης (Lzd, κόκκινο) σχετικά με την χλωραμφενικόλη (Cam, πράσινο). D. Υπέρθωση των θέσεων πρόσδεσης της λινεζολιδης (Lzd, κόκκινο), χλωραμφενικόλης (Cam, πράσινο), λινκομυκίνης (Lin) στο PTC.



## IV. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

### IV.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ένα συγκριτικό πλεονέκτημα της λινεζολίδης σε σχέση με τα υπόλοιπα γνωστά αντιβιοτικά είναι το γεγονός ότι αποτελεί ένα εξ ολοκλήρου συνθετικό παράγωγο και επομένως δεν ανευρίσκεται στη φύση. Αυτό σημαίνει ότι η φυσική επιλογή δεν είχε τη δυνατότητα να αναπτύξει κάποιου είδους μηχανισμό αντοχής στο παρελθόν, που θα μπορούσε να μεταβιβαστεί στα παθογόνα στελέχη.

Εν τούτοις ήδη από το 1999 περιγράφηκε η ανάπτυξη αντοχής στη λινεζολίδη σε ασθενείς υπό θεραπεία για βακτηριαιμία από εντερόκοκκο. (Zurenko GE *et al*, 1999). Από τότε και μετά παρατηρείται αντοχή που σχετίζεται συνήθως με την παρατεταμένη χορήγηση λινεζολίδης (Gonzales RD *et al*, 2001, Auckland C *et al*, 2002, Johnson AP *et al*, 2002, Bassetti M *et al*, 2003, Swoboda S *et al*, 2005), αν και περιγράφονται περιπτώσεις εμφάνισης αντοχής μετά από βραχεία (Seedat J *et al*, 2006) ή και χωρίς προηγηθείσα θεραπεία με λινεζολίδη (Jones RN *et al*, 2002, Rahim S *et al*, 2003).

Ειδικά σε ό,τι αφορά τους σταφυλοκόκκους, η εμφάνιση αντοχής στη λινεζολίδη γενικά είναι σπάνια. Σχετικές μελέτες στις Η.Π.Α. έδειξαν ότι το ποσοστό ανθεκτικών στην λινεζολίδη *S. aureus* και CoNS ήταν κάτω από 1% και 0,1% αντίστοιχα. (Jones RN *et al*, 2007, Farrell DJ *et al*, 2009).

Εντούτοις, στελέχη *S. epidermidis*, με αντοχή στη λινεζολίδη (Linezolid Resistant *S. epidermidis*, LRSE) εμφανίζονται παγκοσμίως διάσπαρτα (Seral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010, Mulanovich VE *et al*, 2010, Kelly S *et al*, 2008), όπως θα περιγραφεί εκτενέστερα παρακάτω.

Στην Ελλάδα LRSE εμφανίζονται μεν σπάνια, εντούτοις τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν ανησυχητική διασπορά σε διάφορα Ελληνικά Νοσοκομεία (Liakopoulos A *et al*, 2010).



## IV.2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

### IV.2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η εμφάνιση αντοχής στη λινεζολιδη, σχετίζεται με μεταλλάξεις που αφορούν στο ριβόσωμα.

Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται είτε στην περιοχή V των γονιδίων 23S rRNA είτε στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22 (Franceschi F *et al*, 2004).

Τέτοιες μεταλλάξεις έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αντοχής και σε άλλα αντιβιοτικά που έχουν ως στόχο το ριβόσωμα. Οι μακρολίδες, οι λινκοσαμίδες, οι κετολίδες, οι στρεπτογραμίνες και οι οξαζολιδινόνες ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία. Έτσι τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερα στελέχη με τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία ή και αντοχή στα παραπάνω αντιβιοτικά (Macrolides – Lincozamides – Ketolides – Streptogramines – Oxazolidinones: MLKSO).

### IV.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΟΥΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ

#### IV.2.2.1. Μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23S rRNA

Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στον κεντρικό βρόχο της περιοχής V.

Η πρώτη απ' αυτές που περιγράφηκε, είναι η G2576T (Tsiodras S *et al*, 2001). Έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη αντοχής έναντι της λινεζολιδης σε μια σειρά Gram (+) κόκκων όπως *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus viridans* και *Enterococcus faecium* και *faecalis* (Vardakas KZ *et al*, 2009, Hill RL *et al*, 2010). Σε μία μελέτη σε μονάδα εντατικής θεραπείας σε Νοσοκομείο της Ισπανίας, όπου παρατηρήθηκε ενδημία στελεχών *S. epidermidis* με αντοχή στη λινεζολιδη (LRSE), αποδείχτηκε με μοριακές τεχνικές, η παρουσία της παραπάνω μετάλλαξης σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη, το 90% των

οποίων ανήκαν στον ίδιο κλώνο και επομένως είχαν γενετική συγγένεια. (Treviño M, *et al* 2009). Ανάλογα, σε μία πιο πρόσφατη μελέτη στην Ιταλία, περιγράφηκε η ίδια μετάλλαξη, σε ενδημικό ενδονοσοκομειακό στέλεχος *S. epidermidis* του τύπου ST2 (Morrioni G *et al*, 2016).

Τα βακτήρια διαθέτουν πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου του 23S rRNA. Όσα περισσότερα είναι τα γονίδια που φέρουν τη μετάλλαξη, τόσο ισχυρότερη είναι η αντοχή που αναπτύσσεται έναντι της λινεζολίδης. Η εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων σε στελέχη από κλινικούς ασθενείς, έχει συσχετιστεί με την θεραπεία με λινεζολίδη. Ο αριθμός των μεταλλαγμένων γονιδίων, είναι ανάλογα εξαρτώμενος, τόσο από το χρονικό διάστημα της θεραπείας, όσο και από τη θεραπευτική δόση. (Arias CA *et al*, 2008). Αυτό παρατηρήθηκε και εργαστηριακά, σε στελέχη *S. aureus* τα οποία μπόρεσαν να αναπτύξουν αντοχή στη λινεζολίδη με *in vitro* μεθόδους (Pillai SK *et al*, 2002). Σ' αυτή τη μελέτη αποδεικνύεται ακριβώς ότι, για τα στελέχη που μελετήθηκαν, όσο περισσότερα αντίγραφα του γονιδίου 23S rRNA φέρουν τη μετάλλαξη, τόσο υψηλότερη είναι και η προκύπτουσα MIC για τη λινεζολίδη.

Κάποιες μελέτες έχουν καταδείξει ότι είναι δυνατή η αντιστροφή της μετάλλαξης μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη, με αποτέλεσμα από στελέχη με αντοχή στην λινεζολίδη να προκύπτουν στελέχη με ευαισθησία (Meka VG *et al*, 2004, Swoboda S *et al*, 2005). Εν τούτοις, έχει καταγραφεί και η διατήρηση της μετάλλαξης, ακόμη και μετά από 30 διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε μέσο απουσία λινεζολίδης (Mazzariol A *et al*, 2012).

Μία δεύτερη μετάλλαξη που έχει καταγραφεί στην περιοχή V του γονιδίου 23S rRNA και σχετίστηκε με αντοχή στη λινεζολίδη, είναι η T2500A. Η παραπάνω μετάλλαξη έχει συνδυαστεί, σε περιπτώσεις περισσότερο ανθεκτικών στελεχών, με την απώλεια ενός αντιγράφου του γονιδίου (Meka VG *et al*, 2004).

Οι δύο μεταλλάξεις που περιγράφηκαν παραπάνω αποτελούν τις πιο συχνές από αυτές που ανευρίσκονται σε στελέχη ανθεκτικά σε λινεζολίδη. Άλλες που έχουν περιγραφεί είναι οι : C2192T (Howe RA *et al*, 2003), G2447T (Swaney SM *et al*, 1998), T2504A (Liakopoulos A *et al*, 2009 , Ikonmidis A, *et al* 2016),\_A2503G, T2504C και G2766T (Livermore DM *et al*, 2007),

G2505A (North SE *et al*, 2005), G2512T, G2513T και C2610G (Kloss P *et al*, 1999), C2190T και G2603T (Cidral TA *et al* 2015). Σε στελέχη *S. epidermidis*, καταγράφηκαν για πρώτη φορά στη Γερμανία οι μεταλλάξεις T2502A και C2532T (Bender J *et al* 2015), ενώ έχουν παρατηρηθεί επίσης, οι μεταλλάξεις G2603T (Lincopan N *et al*, 2009) και C2534T (Wong A *et al*, 2010), σε κλινικά στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη λινεζολίδη.

Οπωσδήποτε άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντοχή στη λινεζολίδη, δεν αφορούν μόνο βάσεις που εντοπίζονται κοντά στο σημείο σύνδεσης της πεπτιδυλοτρανσφεράσης όπως οι G2061, C2452, A2503, U2504 και G2505 αλλά και βάσεις περισσότερο απομακρυσμένες όπως οι A2062, G2447, A2453, C2499, U2500 και G2576 (Long KS *et al*, 2012).

#### IV.2.2.2. Μηχανισμός σχετιζόμενος με τις 50S ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22.

Ένας άλλος μηχανισμός αντοχής στη λινεζολίδη που παρατηρήθηκε αρχικά σε στρεπτοκόκκους και εν συνεχεία σε εργαστηριακά στελέχη MRSA και MSSA είναι αυτός που αφορά τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22 των ριβοσωμάτων (Locke JB *et al*, 2009A). Αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *rpIC*, *rpID* και *rpIV* αντίστοιχα και σχετίζονται με το πεπτιδικό κέντρο (PTC) του ριβοσώματος.

Και εδώ φαίνεται ότι μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια προκαλούν αλλαγή της σύνθεσης των αμινοξέων, τροποποίηση της στερεοδομής του σημείου πρόσδεσης του μορίου της λινεζολίδης στο 23S rRNA με αποτέλεσμα – όπως εικάζεται – αδυναμία της λινεζολίδης να συνδεθεί στο ριβόσωμα και έτσι ανάπτυξη αντοχής. Ειδικότερα για την L4, φαίνεται ότι τμήμα του μορίου της συμμετέχει και στη στερεοδομή του ενεργού κέντρου της πεπτιδυλοτρανσφεράσης.

Τέτοιες μεταλλάξεις που έχουν καταγραφεί και έχουν συσχετιστεί σαφώς με την ανάπτυξη αντοχής είναι οι F147L, A157R (Locke JB *et al*, 2009A) και G152D (Locke JB *et al*, 2009B) καθώς και μία απάλειψη αμινοξέος στη θέση

Ser145 (Locke JB *et al*, 2009A). Πιο συγκεκριμένα και ειδικά σε ότι αφορά στελέχη *S. epidermidis* έχουν καταγραφεί οι K68N, L108S και N158S αντικαταστάσεις και 71GR72 και 71GGR72 εισαγωγές για την πρωτεΐνη L3, ενώ για την L4 πρωτεΐνη οι F147L/A157R, A157R και S158F/D159Y (Stefani S *et al*, 2010, Long KS *et al*, 2012).

Επίσης, σε κλινικά στελέχη LRSE, που απομονώθηκαν σε κέντρο αναφοράς στη Γερμανία, καταγράφηκαν οι μεταλλάξεις G301C (προεξάρχων τύπος), G455A, G456T, A474T για το *rpIC*, T150C, A383C, A521G, G545A για το *rpID* και A138G, C141T, G166A για το *rpIV* γονίδιο (Bender *et al*, 2015). Σε λινεζολίδη-ανθεκτικά στελέχη *S.epidermidis* και στο *rpID* γονίδιο έχει παρατηρηθεί και η μετάλλαξη N158S η οποία όμως παρατηρείται και σε λινεζολίδη-ευαίσθητα στελέχη και προφανώς δεν σχετίζεται – τουλάχιστον από μόνη της – με ανάπτυξη αντοχής (Wong A *et al*, 2010).

#### IV.2.2.3. Μηχανισμός Cfr (Chloramphenicol - Florfenicol Resistance)

Αυτός ο μηχανισμός αντοχής σχετίζεται με μία πρωτεΐνη, την Cfr, η οποία κωδικοποιείται από το αντίστοιχο *cfr* γονίδιο. Με *in vitro* μεθόδους (footprinting και flight tandem mass spectrometry) αποδείχτηκε ότι η Cfr-πρωτεΐνη, λειτουργεί ως RNA μεθυλοτρανσφεράση και προσθέτει στο νουκλεοτίδιο αδενίνη και στην θέση C8 του A2503 του 23S rRNA μία επιπλέον μεθυλική ομάδα. Η θέση A2503 σχετίζεται με την τοποθέτηση και δράση μιας σειράς συγκεκριμένων αντιβιοτικών που δρουν στο ριβόσωμα. Έτσι, αλλάζοντας χωροδιάταξη, προκαλεί αδυναμία σύνδεσης του αντιβιοτικού με τη θέση-στόχο του και επομένως το καθιστά ανενεργό.

Κατ' επέκταση λοιπόν, το *cfr* γονίδιο σχετίζεται με ανάπτυξη αντοχής στην χλωραμφενικόλη, τις λινκοσαμίδες, τις πλευρομουουλίνες, τη στρεπτογραμίνη A και - φυσικά – τις οξαζολιδιόνες, αντιβιοτικά που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη ριβοσωμική θέση, δεν επηρεάζει όμως την αντοχή στις μακρολίδες (Roberts MC, 2008). Ο φαινότυπος που προκύπτει είναι

γενικότερα γνωστός και ως PhLOPS<sub>A</sub> (Phenicol, Lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilines, streptogramin A).

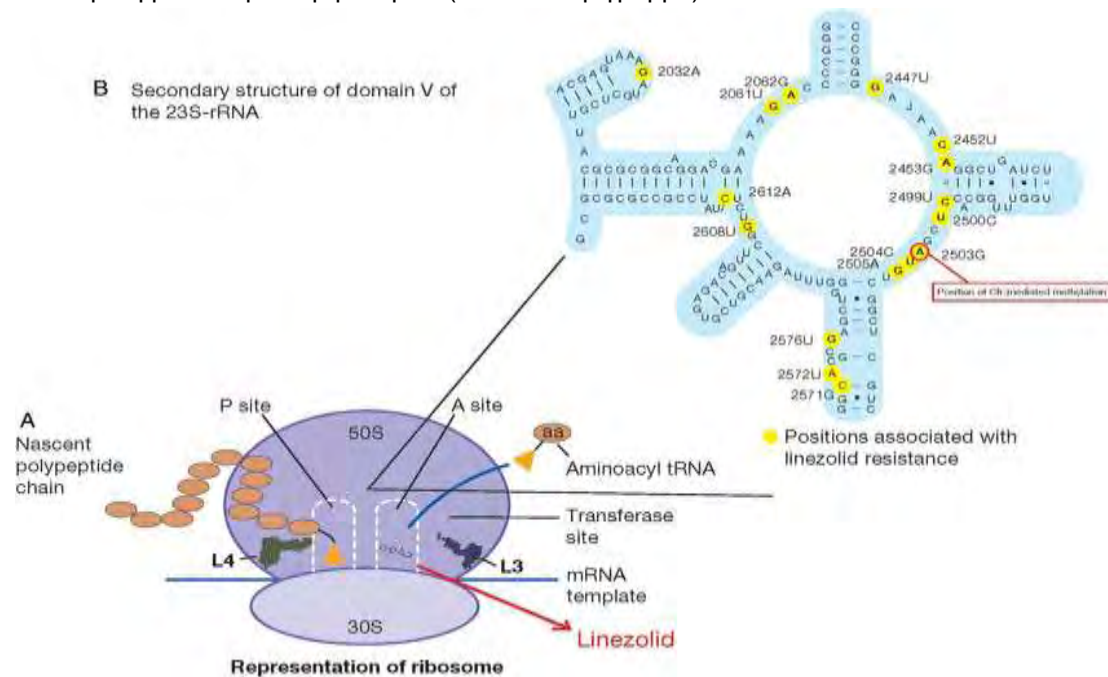
Το *cf*r γονίδιο έχει ανιχνευτεί τόσο σε χρωμοσωμική όσο και σε πλασμιδιακή θέση (Wang Y, *et al*, 2013) (Schwartz S, *et al*, 2000).

Η Cfr–πρωτεΐνη, έχει βρεθεί αρκετές φορές τα τελευταία χρόνια, σε στελέχη σταφυλοκόκκων με αντοχή στις οξαζολιδινόνες. Ήδη από το 2008 και κατά τη διάρκεια του προγράμματος Leader 2007, μελετήθηκαν δύο στελέχη σταφυλοκόκκων (ένας *S. epidermidis* και ένας *S. aureus*) που, αν και παρουσίαζαν αντοχή στη λινεζολίδη, δεν έφεραν καμία μετάλλαξη στο 23S rRNA. Αντίθετα και τα δύο έφεραν το γονίδιο *cf*r – το οποίο ανιχνεύτηκε με μοριακές μεθόδους (Mendes RE *et al* 2008, Toh S *et al* 2007). Αργότερα, ο Bongiorno και η ομάδα του, εντόπισαν το συγκεκριμένο γονίδιο σε ένα πλασμίδιο μεγέθους ~ 50kb σε κλινικά στελέχη *S. epidermidis* με αντοχή στη λινεζολίδη (Bongiorno D *et al*, 2010).

Μια πιο πρόσφατη μελέτη σε 36 στελέχη *S. epidermidis* που απομονώθηκαν από 8 διαφορετικά νοσοκομεία της Γερμανίας απέδειξε την παρουσία του *cf*r γονιδίου σε 6 από αυτά καθώς και την έδρασή τους σε πλασμίδια δύο διαφορετικών τύπων (p12-00322 και p12-02300). Αυτό καταδεικνύει τη δυνατότητα μετάδοσής του, τόσο ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου, όσο και σε στελέχη διαφορετικών ειδών. Στην ίδια μελέτη, καταγράφηκαν οι γνωστές μεταλλάξεις στα γονίδια του 23S rRNA, δεν αποδείχτηκε όμως πώς συνδέονται με το μέγεθος της αναπτυσσόμενης αντοχής (Bender J *et al*, 2015).

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πιο πρόσφατη μελέτη, η οποία αποδεικνύει *in vitro* τη δυνατότητα μεταφοράς του πλασμιδιακού γονιδίου *cf*r (pSCFS3-like plasmids), από ισπανικό στέλεχος *S. epidermidis* (SE50 και SE45 – ST22), σε στελέχη MRSA και *Enterococcus spp.* που απομονώθηκαν στην Ιαπωνία, μια χώρα, όπου δεν έχει μέχρι στιγμής ανευρεθεί το συγκεκριμένο γονίδιο. Αυτό οδηγεί στο ανησυχητικό συμπέρασμα ότι ο *S. epidermidis*, ως αποικιστής, είναι δυνητικά ικανός να αποτελέσει τον μεσάζοντα για την μεταφορά του *cf*r γονιδίου και της αντοχής που αυτό συνεπάγεται, σε παρθένα στελέχη ακόμη και διαφορετικού είδους (Cafini F *et al*, 2016).

Εικόνα 12: Α. Σχηματική αναπαράσταση του ριβοσώματος όπου φαίνεται η θέση δράσης της λινεζολίδης Β. αναπαράσταση της δομής της περιοχής V του 23S-rRNA όπου φαίνονται οι θέσεις που σχετίζονται με την αντοχή στη λινεζολίδη (κίτρινες περιοχές), καθώς και η θέση όπου δρα η μεθυλοτρανσφεράση Cfr (κόκκινο περίγραμμα).



#### IV.2.2.4 Μηχανισμός σχετιζόμενος με την μεθυλοτρανσφεράση RlmN

Η RlmN, είναι μία ενδογενής μεθυλοτρανσφεράση ομόλογη της Cfr, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rlmN* και που χρησιμοποιεί τον ίδιο μ' αυτή μηχανισμό της S-αδενοσυλομεθιωνίνης (S-adenosylmethonine- SAM) προκειμένου να μεθυλιώσει την A2503 του 23S-rRNA στη θέση C2 (η Cfr τη μεθυλιώνει στη θέση C8) (Yan F *et al*, 2010).

Σε μία κλινική μελέτη, που αφορούσε έναν ασθενή με λοίμωξη από MRSA υπό παρατεταμένη θεραπεία με λινεζολίδη, παρατηρήθηκε ότι μία μετάλλαξη στο *rlmN* γονίδιο που σχετιζόταν με την εισαγωγή ενός επιπλέον Glu κωδικονίου μετά το κωδικόνιο 353, οδηγούσε στην αύξηση της MIC για την λινεζολίδη, από 0,75 μg/ml, σε 2 μg/ml (Gao W *et al*, 2010).

Πάνω σ' αυτή την παρατήρηση, ακολούθησε νέα μελέτη (LaMarre JM, *et al* 2011) που ξεκίνησε από την υπόθεση πως η μετάλλαξη στο *rlmN* γονίδιο, πιθανώς να οδηγούσε στην παραγωγή μίας μεταλλαγμένης RlmN με εκτεταμένη ικανότητα μεθυλίωσης πέραν της θέσης C2 και της θέσης C8, αποκτώντας κατ' αυτόν τον τρόπο και μίας μορφής δράση Cfr. Εντούτοις πειραματικά αποδείχτηκε πως αυτό που προκαλούσε η μετάλλαξη, δεν ήταν η επέκταση της δράσης της RlmN, αλλά αντιθέτως, η αδρανοποίηση της μεθυλοτρανσφεράσης (LaMarre JM *et al*, 2011). Με δεδομένο ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη στο συγκεκριμένο γονίδιο ή σε σχετικά μ' αυτό ρυθμιστικά γονίδια, καταλήγει σε απενεργοποίησή του, θα μπορεί επαγωγικά να οδηγήσει σε ελαττωμένη ευαισθησία στη λινεζολίδη, είναι προφανές ότι ένας νέος μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής στη λινεζολίδη, μοιάζει να αναδύεται.

Μάλιστα το γεγονός ότι τέτοιοι μηχανισμοί σχετιζόμενοι με την αδρανοποίηση της RlmN, δεν έχουν κάποια επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη σε περιβάλλον απουσία λινεζολίδης, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εύκολα μπορούν να εξαπλωθούν και εν συνεχεία να εκφραστούν φαινοτυπικά σε κλινικά σημαντικά παθογόνα που θα αντιμετωπιστούν θεραπευτικά με λινεζολίδη, οδηγώντας τη θεραπεία σε αποτυχία. Επομένως είναι πλέον επιβεβλημένο, τέτοιες μεταλλάξεις που αφορούν το *rlmN* και τα συν αυτώ γονίδια, να μπουν υπό στενή παρακολούθηση από την επιστημονική κοινότητα.

## V. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

### V.1. ΓΕΝΙΚΑ

Από την εποχή που τέθηκε στη διάθεση της θεραπευτικής το 2000, έως σήμερα, η λινεζολίδη χρησιμοποιείται σε πάνω από 70 χώρες παγκοσμίως. Το γεγονός ότι η χρήση της λινεζολίδης περιορίζεται κυρίως σε νοσοκομειακούς ασθενείς και για λοιμώξεις από στελέχη που παρουσιάζουν αντοχή στα πρώτης γραμμής αντιβιοτικά, σε συνδυασμό με το ότι παραμένει μέχρι στιγμής προστατευμένη με πατέντα, έχουν κρατήσει τα ποσοστά των λινεζολίδη-ανθεκτικών κλινικών στελεχών, σε γενικά χαμηλά επίπεδα.

Εντούτοις, η διασπορά των ανθεκτικών στη λινεζολίδη σταφυλοκόκκων έχει πάρει παγκόσμιες διαστάσεις και σχετίζεται άμεσα με την χρήση της στις κατά τόπους θεραπευτικές πρακτικές. Μετά το 2000, τα ανθεκτικά στην λινεζολίδη στελέχη, σπάνια εμφανίζονταν και κυρίως αφορούσαν σημειακές μεταλλάξεις στη θέση V του 23S rRNA

Έτσι, μελέτες στο πρόσφατο παρελθόν, υπεδείκνυαν ότι η αντοχή στη λινεζολίδη είναι ιδιαίτερα σπάνια, σε ποσοστά κάτω του 0,1% για στελέχη *S. epidermidis* και 1% για *S. aureus*, στις ΗΠΑ (Farrell DJ *et al*, 2009). Πολύ μικρό ποσοστό *S. epidermidis* παρουσιάζουν αντοχή στη λινεζολίδη, σε μία μελέτη στελεχών από 22 χώρες (Biedenbach DJ *et al*, 2010), ενώ σε μία άλλη μελέτη της αντοχής CoNS στη λινεζολίδη, από 16 διαφορετικές χώρες, μόνο λίγοι παρουσίαζαν αντοχή και έφεραν τη βασική μετάλλαξη G2576T (Jones RN *et al*, 2007B). Μέχρι και την εποχή μας, στα ανθεκτικά στελέχη που απομονώνονται ανιχνεύονται συνηθέστερα οι μεταλλάξεις G2576T και T2500A. Εντούτοις, μία ποικιλία και άλλων μεταλλάξεων του 23S rRNA, που αφορούν αντικαταστάσεις βάσεων έχουν συσχετιστεί με πιθανή ανάπτυξη αντοχής στη λινεζολίδη (Stefani S *et al*, 2010).

Περιστατικά LRSE λοιμώξεων, μεμονωμένα ή με τη μορφή ενδο-νοσοκομειακών επιδημιών, έχουν καταγραφεί τα τελευταία χρόνια: στην Ιρλανδία (O' Connor *et al*, 2015), στην Ιταλία (Russo *et al*, 2015), στη Γερμανία (Bender *et al*, 2015), στις ΗΠΑ, το Μεξικό, τη Βραζιλία, την Κίνα, την Ινδία (Gu *et al*, 2013) και όπως είναι αναμενόμενο, η παγκόσμια αυτή λίστα μεγαλώνει σταθερά όσο διευρύνεται η χρήση της λινεζολίδης στα νοσοκομεία της παγκόσμιας κοινότητας.

Στην Ελλάδα οι LRSE τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν ανησυχητική διασπορά σε διάφορα Ελληνικά Νοσοκομεία (Liakopoulos A *et al*, 2010). Ειδικά σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας όπου και η λινεζολίδη χρησιμοποιείται σχετικά συχνά για την αντιμετώπιση των σοβαρών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από MRSA και MRSE, τα ποσοστά των LRSE επί συνόλου λοιμώξεων από *S. epidermidis* αυξάνονται απειλητικά. Χαρακτηριστικά, έχει καταγραφεί σε ΜΕΘ Ελληνικού Νοσοκομείου και για το έτος 2011 ποσοστό λινεζολίδη-ανθεκτικών επιδερμικών σταφυλοκόκκων που άγγιξε το 35,3% (Karavassilis *et al*, 2015).

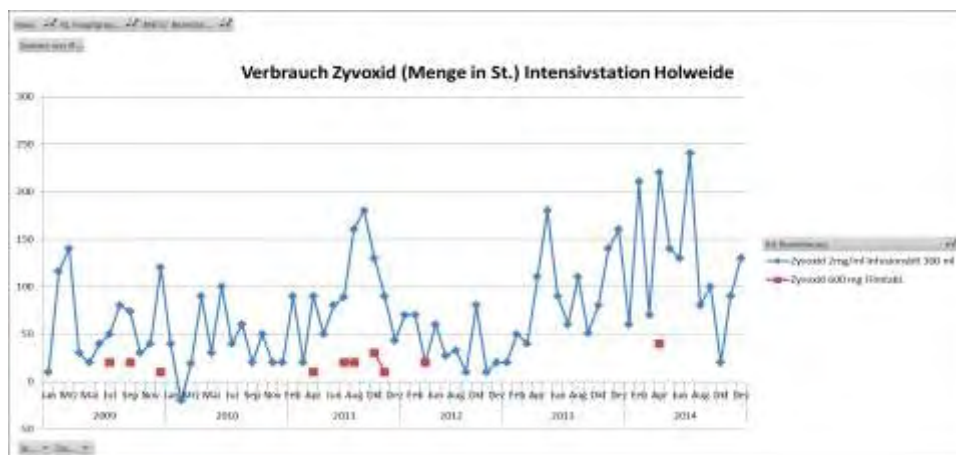


Το πλασμιδιακό γονίδιο *cfr* έχει ήδη αποδειχτεί ότι μπορεί να μεταδίδεται οριζόντια μεταξύ σταφυλοκόκκων και εντεροκόκκων που απομονώνονται από ζώα ή/και ανθρώπους (Cafini F *et al*, 2016). Αν και το πρώτο κλινικό στέλεχος σταφυλοκόκκου που έφερε το γονίδιο *cfr*, ήταν ένας MRSA ανθεκτικός στη λινεζολίδη που απομονώθηκε στην Κολομβία το 2007 (Toh SM *et al*, 2007)., το συγκεκριμένο γονίδιο είχε ήδη ανιχνευτεί από το 1997 σε *Staphylococcus spp.* σε ζώα. Στελέχη που φέρουν το γονίδιο έχουν απομονωθεί στην Βραζιλία (Cidral TA *et al*, 2015), στις ΗΠΑ (Mendes RE *et al*, 2014) και στην Ευρώπη (Γερμανία (Kehrenberg C *et al*, 2006), Ιταλία, (Musumeci R *et al*, 2016) Ισπανία (Treviño M *et al*, 2008), Ιρλανδία (Gabriel EM *et al*, 2015), Ελλάδα (Liakopoulos A *et al*, 2010)) .

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη μελέτη που αφορά 36 στελέχη *S. epidermidis*, συλλεχθέντα από οκτώ διαφορετικά Νοσοκομεία της Γερμανίας, μεταξύ Ιανουαρίου 2012 και Απριλίου του 2013. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στους MLST τύπους ST2, ST5, ST22 και ST23. Όσον αφορά το 23S rRNA, ανιχνεύτηκαν οι μεταλλάξεις C2161, G2576T, T2502A και C2532T. Σε όλα τα παραπάνω στελέχη ανιχνεύτηκαν αμινοξικές αλλαγές που αφορούν την L3 πρωτεΐνη (με προεξάρχουσα την Leu101Val), σε 22 από τα 36 στελέχη αντίστοιχες που αφορούν την L4 πρωτεΐνη, ενώ σε 24 στελέχη, ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις που αφορούν την πρωτεΐνη L22. Τέλος, 6 από τα 36 στελέχη έφεραν το *cfr* γονίδιο, σε δύο διαφορετικούς τύπους πλασμιδίων p12-00322 και p12-02300, πλασμίδια που φέρουν και άλλα γονίδια αντοχής, εξηγώντας την καταγεγραμμένη πολυαντοχή των στελεχών και σε άλλα αντιβιοτικά, ενώ ιδιαίτερη σημασία όσον αφορά την παθογονικότητα των στελεχών αποκτά και η ανίχνευση του *icaA* γονιδίου – υπευθύνου για την παραγωγή του biofilm - σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν (Bender J *et al*, 2015).

Μία δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία και αφορούσε 2 ΜΕΘ μίας νοσηλευτικής μονάδας δυναμικότητας 1500 κλινών, κατέγραψε την εμφάνιση LRSE στελεχών σε σχέση με την κατανάλωση της λινεζολίδης σε βάθος 6-ετίας, από το 2009 έως το 2015. Ειδικά από τον Νοέμβριο του 2013 έως τον Ιανουάριο του 2015 παρατηρήθηκε μία έξαρση στην εμφάνιση LRSE, με απομόνωση και στις δύο ΜΕΘ, 29 τέτοιων στελεχών. Το φαινόμενο αυτό, όπως φαίνεται και στο σχετικό διάγραμμα (εικόνα 13), συνδυάστηκε με την

αύξηση της χρήσης της λινεζολίδης στη θεραπευτική πρακτική από το καλοκαίρι του 2013 και για το επόμενο 12 μήνο, ως αντίμετρο στην έξαρση λοιμώξεων από MRSA στο αμέσως προηγούμενο διάστημα. (Layer F *et al*, 2015). Με τον τρόπο αυτό καταδεικνύεται η επίδραση της έκθεσης στη λινεζολίδη, στην ανάπτυξη αντοχής σε αυτή. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στους τύπους ST2, ST5, ST168 και ST23. Η μοριακή ανάλυση σε σχέση με τους μηχανισμούς αντοχής έδειξε ως προεξάρχουσα μετάλλαξη (που μάλιστα παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη) για το 23S rRNA, την C2190T, ενώ καταγράφηκαν επίσης οι C2561T και G2603T. Επιπλέον, σε 19 στελέχη καταγράφηκαν μεταλλάξεις των γονιδίων που αφορούν τη σύνθεση των πρωτεϊνών L3 και L4 της ριβοσωμικής υποομάδας 50S, με αναγωγή στην κλωνικότητά τους (δηλαδή στελέχη κλωνικά έφεραν αντίστοιχες μεταλλάξεις) ενώ σε άλλα 19 ανεξάρτητα στελέχη, ανιχνεύτηκε το *cfz* γονίδιο.



Εικόνα 13: Αύξηση της κατανάλωσης της λινεζολίδης λόγω έξαρσης MRSA λοιμώξεων και στη συνέχεια περιορισμός της, σαν αποτέλεσμα εμφάνισης αυξημένου αριθμού επεισοδίων με LRSE σε Νοσοκομείο της Γερμανίας.

Τέλος, σε σχέση με την κλωνικότητα και επιδημιολογία των LRSE, αξίζει να αναφερθεί η καταγραφή τριών επιδερμιδικών σταφυλοκόκκων του ST22 τύπου, με αντοχή στη λινεζολίδη, που εμπλέκονταν σε σοβαρές λοιμώξεις σε ασθενείς σε Νοσοκομείο της Ισπανίας. Τα συγκεκριμένα στελέχη παρουσίαζαν φαινότυπο πολυαντοχής, σε σχέση με τη λινεζολίδη, δεν έφεραν το *cfz* γονίδιο,

ενώ παρουσίαζαν τη μετάλλαξη C2534T στο 23S rRNA και αμινοξικές αλλαγές στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3 και L4 (Lozano C *et al*, 2012).

## VI. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ (LINEZOLID DEPENDENCE)

### VI.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΕΝΙΚΑ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟΥΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ

Ένα φαινόμενο που έχει περιγραφεί στο παρελθόν για την στρεπτομυκίνη και τη βανκομυκίνη (Tambyah PA *et al*, 2004, Moubareck C *et al*, 2009, Honore N *et al*, 1995) σε σταφυλοκόκκους, είναι το φαινόμενο της εξάρτησης από τα αντιβιοτικά (dependence). Αυτό αφορά ανθεκτικά έναντι συγκεκριμένου αντιβιοτικού στελέχη, τα οποία παρουσιάζουν ανάπτυξη εξαρτώμενη από την παρουσία αυτού του αντιβιοτικού. Με πιο απλά λόγια, όταν το συγκεκριμένο στέλεχος που παρουσιάζει εξάρτηση, αναπτύχθει σε περιβάλλον παρουσία του αντιβιοτικού για το οποίο παρουσιάζει αντοχή και εξάρτηση, εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με ανάπτυξή του σε ίδιες συνθήκες, απουσία του αντιβιοτικού. Μάλιστα, ο ρυθμός ανάπτυξης τείνει να είναι σχετιζόμενος με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού κατά τρόπο ώστε, να παρουσιάζεται ταχύτερος σε περιβάλλον με προοδευτικά υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Ειδικά για τους σταφυλοκόκκους, η πρώτη φορά που περιγράφηκε το φαινόμενο της εξάρτησης ήταν το 2009 και αφορούσε την βανκομυκίνη και στελέχη *S. aureus* με αντοχή στα γλυκοπεπτιδία (Moubareck C *et al*, 2009). Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν δύο τύπων στελέχη σταφυλοκόκκων ανθεκτικών στα γλυκοπεπτιδία, το VRSA-6 και το VRSA-7, με υψηλού επιπέδου αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC>256 µg/ml) και στην τεϊκοπλανίνη (MIC>16 µg/ml). Με μοριακές μεθόδους (multiplex PCR), ανιχνεύτηκε το *van* γονιδίωμα και επιδείχθηκε ότι και οι δύο τύποι έφεραν αντοχή τύπου VanA. Με μοριακή χαρτογράφηση του *van* γονιδιώματος (PCR mapping) αποδείχτηκε ότι η οργάνωση των επί μέρους στοιχείων του, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*

και *vanZ*, ήταν ίδια και στον VRSA-6 και στον VRSA-7 τύπο και συμφωνούσαν με τη σειρά που αυτά εμφανίζονται στο Tn1546 πλασμίδιο. Και οι δύο τύποι, παρουσίαζαν τον  $MLS_B$  φαινότυπο φέροντας τα γονίδια *erm* (*ermB* για τον VRSA-6 και *ermA* και *ermC* για τον VRSA-7) και επιπλέον παρουσίαζαν αντοχή σε σπεκτινομυκίνη και σε καναμυκίνη και τομπραμυκίνη, χάρη στα γονίδια *ant(9)-Ia* και *ant(4)-Ia* αντιστοίχως.

Κατά την ανάπτυξη του VRSA-7, σε υλικό απουσία αντιβιοτικού, παρατηρήθηκε αργή ανάπτυξη και αποικίες με διαφορετικές μορφολογίες, ενώ σαφώς ταχύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε όταν το καλλιεργητικό υλικό είχε εμπλουτιστεί με βανκομυκίνη (8  $\mu\text{g/ml}$ ). Προσπαθώντας να καθοριστεί η MIC του στελέχους στην βανκομυκίνη με E-test, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μίας ζώνης υψηλής πυκνότητας αποικιών ακριβώς δίπλα από το E-test, αναδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο, το φαινόμενο της εξάρτησης. (εικόνα 14)

Εικόνα 14: E-test σταφυλοκόκκου (VRSA) με εξάρτηση στη βανκομυκίνη

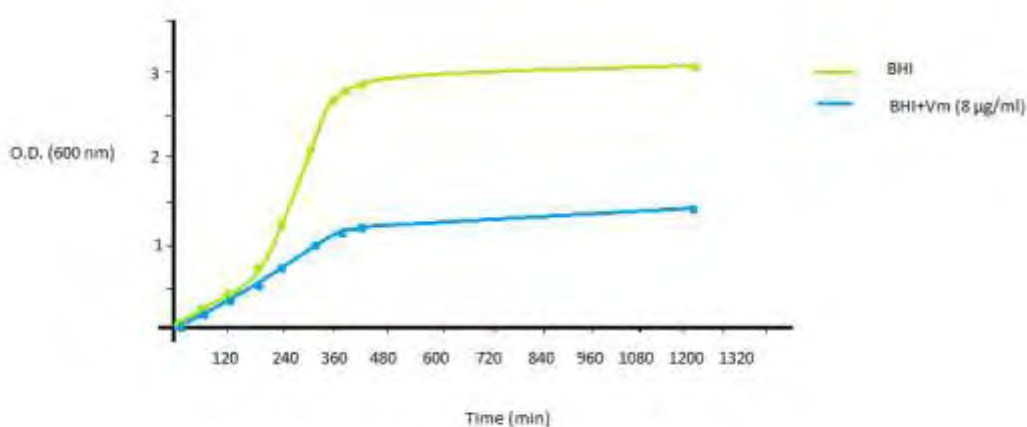


Ακολούθησε μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης με ανάπτυξη του στελέχους σε υγρό καλλιεργητικό υλικό (BHI broth) αρχικά στους 37° C overnight. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες αραιώθηκαν 1:20 σε 20 ml BHI απουσία και παρουσία βανκομυκίνης 8 $\mu\text{g/ml}$  και αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 37° C με ήπια ανακίνηση. Η οπτική πυκνότητα των αναπτυσσομένων καλλιεργειών, μετρήθηκε και καταγράφηκε στα 600 nm. Αποδείχτηκε πως παρουσία βανκομυκίνης, η ανάπτυξη του VRSA-7 στελέχους, ήταν σαφώς ταχύτερη όπως φαίνεται και από το σχετικό διάγραμμα (εικόνα 14).

Μελετώντας τον VRSA-7 κλώνο σε σχέση με τον VRSA-6, σε μοριακό επίπεδο, αποδείχτηκε η παρουσία μίας μετάλλαξης στη θέση 308 (N<sub>308</sub>K) στο

γονίδιο *ddl*, που σχετίζεται με την παραγωγή της D-Ala-D-Ala λιγκάσης. Η μετάλλαξη αυτή αποδείχτηκε με μελέτη των κινητικών παραμέτρων των λιγκασών των κλώνων VRSA-7 και VRSA-6, ότι οδηγεί στην κατά 1000 φορές ελάττωση της δραστηριότητας των πρώτων σε σχέση με τις δεύτερες, καθώς και στην παραγωγή D-Ala-D-Lac λιγκάσης για τον κλώνο VRSA-7.

Εικόνα 15: επίδραση της έκθεσης σε Βανκομυκίνη (8  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) στην ανάπτυξη του VRSA-7 στελέχους (όπου O.D., οπτική πυκνότητα-optical density)



Μελετώντας επίσης την έκφραση του *vanA* γονιδιακού συμπλέγματος, μέσα από την ανάλυση της φύσης και της ποσότητας των παραγόμενων πρόδρομων ενώσεων της πεπτιδογλυκάνης, αποδείχτηκε ότι στον κλώνο VRSA-6, απουσία βανκομυκίνης συνθέτονταν κατά κύριο λόγο πενταπεπτίδια (86%), ενώ παρουσία του αντιβιοτικού συνθέτονταν πενταπεπτίδια (26%), πενταδεψιπεπτίδια (64%) και τετραπεπτίδια (14%). Αντιθέτως, στον VRSA-7 κλώνο, είτε παρουσία είτε απουσία του αντιβιοτικού, παράγονταν κυρίως πενταδεψιπεπτίδια (80%). Η σύνθεση χαμηλών ποσοτήτων (15%) πενταπεπτιδίων, από τον κλώνο VRSA-7, θα μπορούσε να οφείλεται σε ελαττωμένη δραστηριότητα των λιγκασών.

Φαίνεται ότι η χαλαρή ρυθμιστική δράση του Van-R/Van-S συστήματος, στο *vanA* οπερόνιο, όπως και ο ποσοτικός γονιδιακός παράγοντας που σχετίζεται με το γεγονός ότι το *vanA* σύμπλεγμα εδράζεται σε πλασμίδιο πολλαπλών αντιγράφων, έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντικά διαφορετική έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την παρουσία ή απουσία επαγωγέα. Η ενίσχυση της

ανάπτυξης παρουσία γλυκοπεπτιδίων και η απουσία μεταλλάξεων στα VanS και VanR, δείχνει την επαγόμενη έκφραση των γονιδίων αντοχής (Moubareck C *et al*, 2009).

Λίγο αργότερα, μελετήθηκε ένα δεύτερο στέλεχος *S. aureus*, με υψηλού βαθμού αντοχή στα γλυκοπεπτίδια (MIC>256 µg/ml για τη βανκομυκίνη και MIC>16 µg/ml για την τεϊκοπλανίνη), το VRSA-9, το οποίο παρουσίαζε επίσης το φαινόμενο της εξάρτησης από τα γλυκοπεπτίδια. Ο συγκεκριμένος κλώνος, έφερε όπως και ο κλώνος VRSA-7 της προηγούμενης μελέτης, ένα *vanA* οπερόνιο, οργανωμένο επίσης όπως το *Tn1546* και με πλασμιδιακή εντόπιση. Στο *ddl* γονίδιο, ανιχνεύτηκαν δύο σημειακές μεταλλάξεις, στις θέσεις 260 (Q260K) και 283 (A283E), από τις οποίες, ενώ η μεν πρώτη δεν προκαλεί κάποια σημαντική μεταβολή στην στερεοδομή του μορίου της λιγκάσης, η δεύτερη επάγει νέους ιοντικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα τον ασύμμετρο επαναπροσδιορισμό της διεπαφής μεταξύ των πλαϊνών αλυσίδων των διμερών. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι ο σχηματισμός μίας μεταλλαγμένης λιγκάσης με διακοσιαπλάσια (200-πλάσια) ελαττωμένη δραστικότητα σε σχέση με τον «άγριο» τύπο (κλώνος VRSA-6), αλλά όμως 5 φορές περισσότερο αποτελεσματική από εκείνη του κλώνου VRSA-7.

Μελετώντας τη λειτουργικότητα των λιγκασών του VRSA-9, απουσία βανκομυκίνης, μετρήθηκαν 72% πενταδεψιπεπτίδια, 21% πενταπεπτίδια και 7% τετραπεπτίδια ενώ παρουσία επαγωγικού παράγοντα, παρήχθησαν 90% πενταδεψιπεπτίδια και καθόλου πενταπεπτίδια. Δεδομένου του γεγονότος ότι τα πενταδεψιπεπτίδια σε αντιδιαστολή με τα πενταπεπτίδια, δεν αποτελούν υπόστρωμα των PBP2' πρωτεϊνών (που είναι υπεύθυνες για την αντοχή στις β-λακτάμες), η ελαττωματική σύνθεση των λιγκασών, εξηγεί και την εμφανιζόμενη ευαισθησία στις πενικιλίνες αυτών των στελεχών. Μάλιστα, η σημαντική διαφορά της MIC για την oxacillin μεταξύ των δύο στελεχών (2µg/ml για τον VRSA-9 και 0.025 µg/ml για τον VRSA-7) υποδεικνύει ότι η ευαισθησία στα β-λακταμικά σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος της βλάβης της Ddl (Djalal M-S *et al*, 2010).

## VI.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ *S. epidermidis*

Το φαινόμενο της εξάρτησης από τη λινεζολίδη αναδείχθηκε για πρώτη φορά σε μία κλινική μελέτη που αφορούσε στελέχη *S. epidermidis* ανθεκτικά στη λινεζολίδη (LRSE) που απομονώθηκαν από ασθενείς με μικροβιαμία σε ελληνικά νοσοκομεία κατά την περίοδο 2008-2010.

Αυτή εφορούσε ένα σύνολο 27 ασθενών, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε παρατεταμένη ενδοноσοκομειακή νοσηλεία και έφεραν ενδοφλέβιο καθετήρα. Οι 25 από αυτούς, είχαν προηγουμένως λάβει αγωγή με λινεζολίδη για διάστημα τουλάχιστον 3 ημερών και οι 21 είχαν τεθεί σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής. Όλα τα στελέχη παρουσίαζαν παράλληλα με την λινεζολίδη, αντοχή στην κλινδαμυκίνη και την χλωραμφενικόλη. Τα 23 παρουσίαζαν υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml) και τα 4 μέτρια (MIC=16-32 µg/ml).

Στα παραπάνω δείγματα έγινε PFGE και εν συνεχεία επιλέχτηκαν 8 στελέχη κατά τρόπο ώστε να αντιπροσωπεύονται και οι τρεις ευρεθέντες PFGE τύποι του δείγματος της μελέτης (I,II,III). Τα 5 από αυτά τα 8 στελέχη, παρουσίαζαν υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml) και τα 3 αντοχή χαμηλού επιπέδου (MIC=16-32 µg/ml). Όλα τα τύπου I στελέχη, έφεραν τις μεταλλάξεις T2504A και C2534T στο 23S rRNA, τα τύπου II την G2576T και την C2534T ενώ ο τύπος III, που παρατηρήθηκε σε ένα μόνο στέλεχος, έφερε την G2576T και, επιπλέον την C2356T ή την T2334C, σε διαφορετικά αντίγραφα του 23S rRNA. Οι μεταλλάξεις σε όλα τα στελέχη LRSE, ανιχνεύτηκαν σε 5 ή 6 αντίγραφα του 23S rRNA.

Επιπλέον, όλα τα στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη έφεραν τις αμινοξικές μεταλλάξεις G152D και D159Y, στην L3 πρωτεΐνη, και καμία στις L4 και L22 πρωτεΐνες ενώ δεν βρέθηκε καμία ανάλογη μετάλλαξη στις L3, L4 και L22 πρωτεΐνες, στα τρία στελέχη με την μικρότερη αντοχή.

Σε κανένα από τα στελέχη δεν ανιχνεύτηκε το *cf* γονίδιο.

Τα παραπάνω στελέχη μελετήθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους απουσία και παρουσία λινεζολίδης σε συγκεντρώσεις 8, 16, 32, 64 και 128 mg/dl. Πρότυπο στέλεχος *S. epidermidis* ευαίσθητο στη λινεζολίδη, χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control. Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό καλλιεργητικό

υλικό MH Broth και στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες και με θολοσιμετρική μέθοδο καταγράφηκε η ανάπτυξή τους ανά 6ωρο και για 36 ώρες. Σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη, καταγράφηκε σαφώς πιο αργή ανάπτυξη των ανθεκτικών στελεχών, έναντι των ευαισθήτων στελεχών controls – πιθανώς λόγω ενεργειακού κόστους των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την συντήρηση της αντοχής στη λινεζολίδη.

Επιπλέον, στα 5 στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη και για περιβάλλοντα με συγκεντρώσεις λινεζολίδης 32 mg/dl και άνω, παρατηρήθηκε σημαντική επιτάχυνση της ανάπτυξής τους μετά τις πρώτες 12 με 18 ώρες, σε σχέση με την ανάπτυξή τους απουσία λινεζολίδης. Σαφώς λοιπόν με τον παραπάνω τρόπο, καταγράφηκε το φαινόμενο της εξάρτησης (dependence) σε στελέχη LRSE και σε σχέση με την λινεζολίδη.

Το γεγονός ότι όλα τα καταγεγραμμένα με εξάρτηση στελέχη, προέκυψαν μετά από παρατεταμένη θεραπεία με λινεζολίδη, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, όπως και με την εξάρτηση για την βανκομυκίνη, φαίνεται πως η έκθεση στο αντιβιοτικό είναι αυτή που οδηγεί στην ανάπτυξη του φαινομένου της εξάρτησης. Μια πολύ πιθανή υπόθεση είναι ότι τα λινεζολίδη-εξαρτημένα στελέχη, φέρουν τροποποιημένα δομικά ριβοσώματα τα οποία, με κάποιο τρόπο παρουσία λινεζολίδης, – ίσως μέσω σύνδεσης του αντιβιοτικού με πρόδρομα ριβοσωμικά δομικά συστατικά - ευνοούν την επιτάχυνση της συνολικής διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης στο βακτηριακό κύτταρο, δημιουργώντας έτσι στελέχη με εξάρτηση (**Pournaras S *et al*, 2013**).

Με βάση όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, φαίνεται πως το φαινόμενο της εξάρτησης συνδέεται σαφώς με την αντοχή στη λινεζολίδη που προκύπτει από συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο 23S rRNA (T2504A και C2534U) και αμινοξικές αντικαταστάσεις στην πρωτεΐνη L3 (G152D ή D159Y, μαζί με την L101V), μία πρωτεΐνη που μαζί με τις L4 και L22 προσδένεται στο πρόδρομο 23S και με τον τρόπο αυτό πυροδοτεί την πρωτεϊνοσύνθεση. Η σύζευξη της σύνθεσης rRNA για το σχηματισμό ριβοσωμάτων από πρόδρομα μόρια, ονομάζεται «βαθμιαία συναρμολόγηση» και φαίνεται πως επηρεάζει το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης στο βακτηριακό κύτταρο (**Nierhaus KH, 2004**).

Φαίνεται ότι όπως και η ερυθρομυκίνη έτσι και η λινεζολίδη, δρώντας σαν 50S-αναστολέας της μετάφρασης, δεν αλληλεπιδρά μόνο με την ώριμη



υπομονάδα του 23S rRNA, αλλά και με πρόδρομες μορφές της (Wilson DN, 2009).

Εκεί λοιπόν εστίασε μία μεταγενέστερη μελέτη, η οποία προσπάθησε να αποδείξει πως το φαινόμενο της εξάρτησης σχετίζεται με αλλαγές στη λειτουργικότητα και τη δομή των πρόδρομων αυτών μορίων των ριβοσωμάτων. Προσπαθώντας να διαπιστωθούν τα παραπάνω η μελέτη αυτή απομόνωσε ριβοσώματα από 2 διαφορετικά στελέχη *S. epidermidis*: ένα LRSE στέλεχος με εξάρτηση από την λινεζολίδη και ένα πρότυπο στέλεχος ευαίσθητο στη λινεζολίδη. Ειδικότερα, από το στέλεχος με την εξάρτηση, απομονώθηκαν ριβοσώματα τόσο στην περίπτωση που αναπτύσσονταν απουσία (LRSE<sup>D</sup>), όσο και παρουσία (LRSE<sup>D+L</sup>), λινεζολίδης. Με βιοχημικές μεθόδους (συγκεκριμένα μετρώντας τη σύνθεση της πολυ-φαινυλαλανίνης ανά ριβόσωμα), αποδείχτηκε ότι τα ριβοσώματα που απομονώθηκαν από το στέλεχος με εξάρτηση, παρουσία λινεζολίδης, παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης. Προκειμένου να καταδειχτεί το ακριβές στάδιο στο οποίο πυροδοτείται η πρωτεϊνοσύνθεση, μελετήθηκε η αντίδραση πυρουμισίνης των ριβοσωμάτων του LRSE<sup>D+L</sup> στελέχους, παρουσία και απουσία λινεζολίδης.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύεται ότι η επίδραση της λινεζολίδης αφορά μόνο την καταλυτική δραστηριότητα της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, η οποία φαίνεται πως παρουσία λινεζολίδης πολλαπλασιάζεται.

Επιπλέον, μελετώντας την ανάπτυξη των υπομονάδων των ριβοσωμάτων σε σουκρόζη, διαπιστώθηκαν δομικές διαφοροποιήσεις των υπομονάδων 50S και 30S για το στέλεχος με εξάρτηση, οι οποίες περιέργως αποκαθίστανται όταν προστίθεται εξωγενώς στο μέσο, λινεζολίδη. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι είναι πολύ πιθανόν η λινεζολίδη να τροποποιεί τη διαδικασία συναρμολόγησης των ριβοσωμάτων κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται ένας νέος λειτουργικά ριβοσωμικός πληθυσμός, ενεργός μόνο παρουσία λινεζολίδης, ο οποίος έχει την ικανότητα να πρωτεϊνοσυνθέτει ταχύτερα. Επομένως, ο υψηλός ρυθμός ανάπτυξης των λινεζολίδη εξαρτημένων στελεχών παρουσία λινεζολίδης, μπορεί να αποδωθεί στη λειτουργική και δομική προσαρμογή-σύνδεση των ριβοσωμάτων με την λινεζολίδη (Kokkori S *et al*, 2014).

Αν η υψηλή ενδονοσοκομειακή κατανάλωση λινεζολίδης ευνοεί τελικά την ανάπτυξη των LRSE στελεχών έναντι των αντίστοιχων λινεζολίδη ευαίσθητων, οδηγεί και σε αυξανόμενη κλινική εμφάνισή τους και εξηγεί και την εμφάνιση LRSE επιδημιών ανά τον κόσμο (Seral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010, Mulanovich VE *et al*, 2010, Kelly S *et al*, 2008, Liakopoulos A *et al*, 2010). Ίσως λοιπόν και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η εξάρτηση είναι ένα φαινόμενο που αφορά στελέχη που παρουσιάζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη, η εξάρτηση να αποτελεί αποτέλεσμα του μεταξύ τους ανταγωνισμού για επικράτηση.

Συμπερασματικά λοιπόν καταδεικνύεται η ανάγκη για αναζήτηση και μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ανθεκτικών σταφυλοκόκκων. Κάτι εξαιρετικά σημαντικό, δεδομένης της αποδεδειγμένης κλωνικότητας των στελεχών των προηγούμενων μελετών και σε σχέση πάντα με την ανάγκη αυστηροποίησης των προληπτικών μέτρων οριζόντιας ενδονοσοκομειακής μετάδοσης των λοιμογόνων σταφυλοκόκκων.

### VI.3. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΤΩΝ ΧΡΥΣΙΖΟΝΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

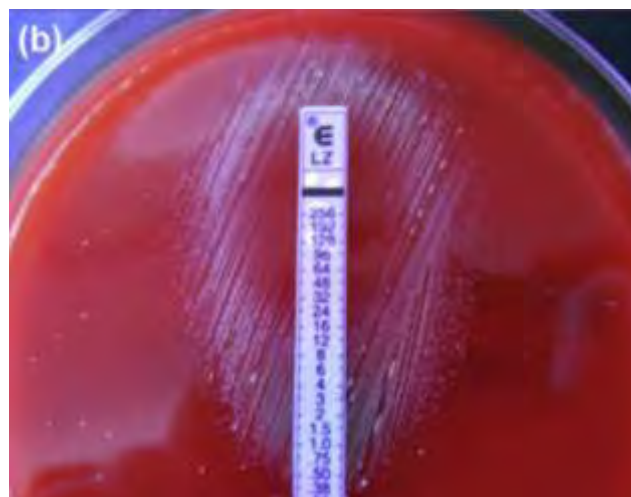
Πρόσφατα, το φαινόμενο της εξάρτησης από τη λινεζολίδη, σε σχέση και αντοχή, παρατηρήθηκε και σε στελέχη *S. aureus*. Στέλεχος *S. aureus* (SA606) με αντοχή στη λινεζολίδη (MIC:  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ ) και ταυτόχρονα αντοχή στην οξακιλλίνη (MRSA) (MIC:  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ ), που απομονώθηκε από το αναπνευστικό σύστημα ασθενή πάσχοντα από κυστική ίνωση, παρουσίαζε εξάρτηση από τη λινεζολίδη, το φαινόμενο δηλαδή της επιτάχυνσης της ανάπτυξής του, σε περιβάλλον παρουσία του αντιβιοτικού.

Αυτό αποδείχτηκε με μεθόδους ανάλογες με αυτές που περιγράφηκαν νωρίτερα για την εξάρτηση από τη βανκομυκίνη (μέθοδος των δίσκων, E-test και υγρές καλλιέργειες). Το συγκεκριμένο στέλεχος, ανήκε στην κατηγορία των SCV-SA (small colony variants of staphylococcus aureus) που έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικρούς, αργά αναπτυσσόμενους υποπληθυσμούς βακτηρίων με ασυνήθιστη μορφολογία και βιοχημικές ιδιότητες.

Στο στέλεχος αυτό, ανιχνεύτηκαν με μοριακές μεθόδους, μεταλλάξεις στη θέση V του 23S rRNA (T2500A), καθώς και στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22, ενώ δεν ανιχνεύτηκε το πλασμιδιακό γονίδιο *cf*. Καμία συσχέτιση του φαινομένου της εξάρτησης και των μοριακών μηχανισμών αντοχής στη λινεζολίδη δεν αποδείχτηκε.

Εντούτοις, φαίνεται ότι, όπως και στην περίπτωση του φαινομένου της εξάρτησης από τα γλυκοπεπτιδία, όπου διαφαιίνεται η εμπλοκή της επαγωγής ενός εναλλακτικού δρόμου σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, έτσι και η εξάρτηση από τη λινεζολίδη, είναι πιθανώς το αποτέλεσμα μιας βακτηριακής μεταβολικής αλλαγής, που εμπλέκει αυτή και το φαινόμενο της αντοχής στη λινεζολίδη. Είναι πιθανό, η εξάρτηση να προέκυψε μετά από την παρατεταμένη και επαναλαμβανόμενη έκθεση σε δυσμενές περιβάλλον με παρουσία λινεζολίδης, που να οδήγησε στην ενεργοποίηση εναλλακτικών μεταβολικών δρόμων οι οποίοι δίνουν στο βακτήριο το συγκριτικό πλεονέκτημα της επιβίωσης και ανάπτυξης υπό τέτοιες συνθήκες. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει στην παραπάνω μελέτη το γεγονός ότι πειραματικά αποδεικνύεται ότι, η επαγωγή της ανάπτυξης του SA606, αφορά ένα φάσμα συγκεντρώσεων λινεζολίδης από 0,25 ως 64 µg/ml, καλύπτοντας επίπεδα στα οποία μπορεί να εκτεθεί *in vivo* ένα βακτήριο (εικόνα 16) (López-Hernández I *et al*, 2015).

Εικόνα 16.: (López-Hernández I *et al*, 2015 ) Εξάρτηση από τη λινεζολίδη σε στέλεχος small-collony variant of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* σε Miller-Hinton agar εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου – ανάπτυξη σε μια ζώνη που περιβάλλει το E-test strip (από 0,25 ως 64 µg/ml)



Το γεγονός ότι η εξάρτηση, ως φαινόμενο παρατηρείται ακόμη και όταν τα συγκεκριμένα στελέχη εκτίθενται *in vitro* σε χαμηλές συγκεντρώσεις λινεζολίδης που μπορούν να επιτευχθούν στους ιστούς *in vivo* με τα συνήθη θεραπευτικά πρωτόκολλα, καθώς και η άμεση συσχέτιση του με την ανάπτυξη υψηλού επιπέδου αντοχής στη λινεζολίδη (και κατ' επέκταση, με την αυξημένη κατανάλωση της λινεζολίδης) αναδεικνύει τη σοβαρότητα του φαινομένου και την ανάγκη για παγκόσμια επαγρύπνιση της επιστημονικής κοινότητας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## I. ΣΥΛΛΟΓΗ - ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

### I.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για την μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν τρεις συλλογές με στελέχη *S. epidermidis* με αντοχή στη λινεζολίδη (LRSE) τα οποία συλλέχθηκαν από διαφορετικά Νοσοκομεία στην Ελλάδα, την Γερμανία και την Ιταλία.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε τυχαία, ένας αριθμός 81 μη επαναλαμβανομένων κλινικών στελεχών LRSE από ασθενείς 6 διαφορετικών Νοσοκομείων στην Ελλάδα και από ένα σύνολο πάνω από 2500/έτος θετικών για *S. epidermidis* καλλιεργειών, για την τριετία 2011 έως 2013. Τα Νοσοκομεία αυτά εδράζονται: ένα στη Θράκη (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης), ένα στη Μακεδονία (Νοσοκομείο «Γεώργιος Παπανικολάου» Θεσσαλονίκης) και τέσσερα στην Αττική (ΚΑΤ, Γενικό Κρατικό Νικαίας «Άγιος Παντελεήμων», Τζάνειο και Ευαγγελισμός). Πρόκειται για Νοσοκομεία με διασπορά τόσο στην Κεντρική όσο και στη Βόρειο Ελλάδα και με μεγάλο αριθμό περιστατικών, τα οποία δεν έχουν κάποιο είδους διασύνδεση μεταξύ τους – αν και μετακίνηση ασθενών ανάμεσα σε Νοσοκομεία της Αττικής δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Άλλα 14 στελέχη LRSE απομονώθηκαν από 5 διαφορετικά και απομακρυσμένα μεταξύ τους Νοσοκομεία της Γερμανίας από το 2012 έως το 2014 και αποτέλεσαν τη Γερμανική συλλογή.

Τέλος στη μελέτη προστέθηκαν και 11 στελέχη επιδερμικών σταφυλοκόκκων με αντοχή στη λινεζολίδη που απομονώθηκαν στην Ιταλία (Ιταλική συλλογή).

Σε όλα τα φαινοτυπικά πειράματα, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213 ως στέλεχος ελέγχου.

Όλα τα παραπάνω στελέχη και για το διάστημα μέχρι να ξεκινήσουν και να ολοκληρωθούν οι πειραματικές μελέτες, αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε brain heart infusion με προσθήκη 15% γλυκερόλης.

## Ι.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η απομόνωση και η καλλιέργεια των επιδερμικών σταφυλοκόκκων είναι γενικά εύκολη με δεδομένο ότι δεν απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες για την ανάπτυξή τους.

Τα βακτηριακά στελέχη της μελέτης μας προήλθαν από κλινικά δείγματα διαφόρων τύπων (αίμα, ούρα, φλεβοκαθετήρες, δερματικές βλάβες, πλευριτικά υγρά κλπ).

Η απομόνωσή τους κατέστη δυνατή μετά από εμβολιασμό σε διάφορα κοινά καλλιεργητικά υλικά όπως το Blood agar, το PVX agar και το Chapman (Mannitol agar). Αυτά αφού επώαστηκαν σε κλιβάνους με αερόβιες ή μικροαερόφιλες (για το PVX) συνθήκες στους 37°C, ανέπτυξαν μετά από 18-24 ώρες, τις σταφυλοκοκκικές αποικίες.

Ειδικά στην απομόνωση των βακτηρίων από περιφερικό αίμα, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φιαλίδια υγρής καλλιέργειας συμβατά με τους αυτόματους επωαστικούς κλιβάνους τύπου Bact Alert της bioMerieux (bioMerieux, Marcy, l'Etoile, France), με δυνατότητα διαρκούς ανακίνησης και ελεγχόμενης επώασης στους 37 °C.

## Ι.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η ταυτοποίηση των επιδερμικών σταφυλοκόκκων αρχικά στο επίπεδο του γένους, στηρίχθηκε στην μακροσκοπική εικόνα των αποικιών τους στα κοινά καλλιεργητικά υλικά, την ικανότητα ανάπτυξης σε blood agar, μαννιτόλη άγαρ και PVX agar καθώς και την αναστολή ανάπτυξης σε MacConkey agar. Επίσης, στη θετική δοκιμασία καταλάσης και στην μικροσκοπική εικόνα σε χρωματισμένα κατά Gram παρασκευάσματα.

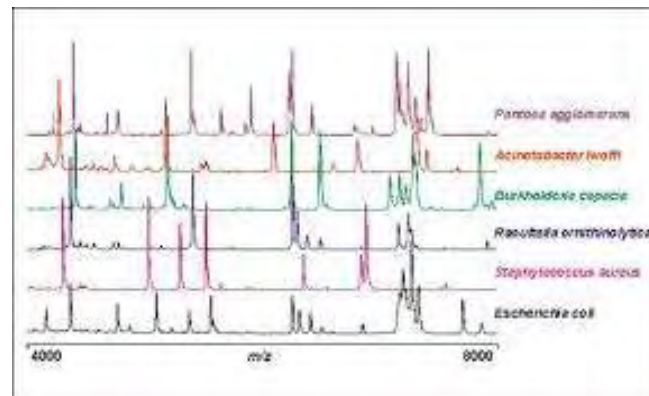
Στη συνέχεια και στο επίπεδο του είδους, η ταυτοποίηση έγινε με την ειδική κάρτα "GP", στο αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 της bioMerieux (bioMerieux, Marcy, l'Etoile, France), που στηρίζεται στην αλγοριθμική ανάλυση των βιοχημικών ιδιοτήτων των απομονωμένων βακτηρίων. Πρόκειται για μία διαδικασία που ολοκληρώνεται σε ένα διάστημα μερικών ωρών (10-12) και συνήθως ολοκληρώνεται ταυτόχρονα με τον προσδιορισμό της



ευαισθησίας του στελέχους με τη χρήση διαφορετικής κάρτας, όπως θα δούμε παρακάτω στον καθορισμό των ελάχιστων ανασταλτικών πυκνοτήτων (Minimum Inhibitory Concentration, MICs) των στελεχών.

Η ταυτοποίηση των επιδερμικών σταφυλοκόκκων της μελέτης επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση του αναλυτή Maldi Biotyper της εταιρίας Bruker. Αυτός στηρίζει τη λειτουργία του στην αναγνώριση χαρακτηριστικών του είδους βακτηριακών πρωτεϊνών, με φασματομετρικές μεθόδους. Η πρωτεϊνική ταυτότητα του βακτηρίου αναγνωρίζεται μέσα σε λίγα λεπτά από το λογισμικό του αναλυτή, χρησιμοποιώντας μικροβιακά κύτταρα (100.000 CFU είναι αρκετά) από πρόσφατες καθαρές αποικίες του (στερεές ή υγρές).

Εικόνα 17: φασματογραφική ανάλυση προφίλ πρωτεϊνών διαφόρων βακτηρίων



Εικόνα 18: Αναλυτής Maldi biotyper (Bruker)



#### 1.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC

Η MIC προσδιορίστηκε ανά στέλεχος και αντιμικροβιακό παράγοντα. Μελετήθηκε η ευαισθησία τόσο στην λινεζολίδη, όσο και σε μια σειρά άλλων μικροβιακών παραγόντων και συγκεκριμένα σε β-λακταμικά, καρβαπενέμες, μακρολίδες, λινκοζαμίδες, σουλφοναμίδες, κινολόνες, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες.

Ο προσδιορισμός της MIC στα στελέχη της παρούσας μελέτης, έγινε, με τη χρήση ειδικών καρτών (AST 580 και AST586) στο αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (Biomérieux, Marcy, l'Etoile, France), για όλα τα στελέχη και για ένα μεγάλο αριθμό προεπιλεγμένων από τον κατασκευαστή αντιβιοτικών, που αντιπροσωπεύουν όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών με αντισταφυλοκοκκική δράση.

Για κάποια αντιβιοτικά και συγκεκριμένα για τη λινεζολίδη, τη βανκομυκίνη, τη χλωραμφενικόλη, την ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, η MIC προσδιορίστηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια με τη χρήση E-test, ενώ ειδικά για τη λινεζολίδη, η MIC προσδιορίστηκε επιπλέον και με τη μέθοδο των αραιώσεων σε agar Mueller Hinton.

Αφού προσδιορίστηκε με κάθε μέθοδο η τιμή της MIC κάθε στελέχους για καθένα από τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν, εν συνεχεία τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως προς την αντοχή τους για κάθε αντιβιοτικό ως ανθεκτικά, μετρίως ευαίσθητα ή ευαίσθητα, με βάση τα ερμηνευτικά κριτήρια του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI, 2010).

##### 1.4.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ VITEK 2

Το VITEK 2 της εταιρίας biomérieux (εικόνα 19), είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης μικροβιακών στελεχών καθώς και καθορισμού της MIC τους σε διάφορα αντιβιοτικά. Υδατικό εναιώρημα από καθαρές αποικίες του βακτηρίου με αρχική πυκνότητα από 0.50 ως 0.65 της πρότυπης κλίμακας McFarland, εισάγεται σε ειδικές κάρτες με «πηγαδάκια» (εικόνα 19), τα οποία φέρουν προκαθορισμένες από τον κατασκευαστή συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και αυτόματα επωάζονται στους 37 °C για άλλοτε

άλλο χρονικό διάστημα. Μετά από επώαση και με φωτομετρική μέθοδο, προσδιορίζεται η MIC και με βάση τα καθορισμένα από τον κατασκευαστή όρια γίνεται ο χαρακτηρισμός των στελεχών ως ευαίσθητα, μετρίως ευαίσθητα ή ανθεκτικά για τα αντιβιοτικά που μελετώνται. Συνήθως η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται μέσα σε διάστημα 12-14 ωρών. Η λίστα αυτών των αντιβιοτικών περιλαμβάνει β-λακταμικά (πενικιλίνες, αναστολείς, κεφαλοσπορίνες, μονομπακτάμες, καρβαπενέμες), τετρακυκλίνες, μακρολίδες, λινκοζαμίδες, γλυκοπεπτιδία, κινολόνες, σουλφοναμίδες, αμινογλυκοσίδες, οξαζολιδιόνες καθώς και άλλα αντιβιοτικά όπως μουπιροσίνη, χλωραμφενικόλη, ριφαμπικίνη, δαπτομυκίνη και τιγκεκυκλίνη.

Εικόνα19: VITEK 2 (Biomérieux, Marcy, l'Etoile, France) και κάρτες ταυτοποίησης και καθορισμού MIC βακτηρίων



#### 1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ E-TEST

Τα E-test είναι ειδικές ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις. Εναιώρημα του βακτηρίου προετοιμάζεται, διαλύοντας σε φυσιολογικό ορό μικροβιακά κύτταρα που αποσπώνται με αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στυλεούς από καθαρές αποικίες του βακτηρίου, όπως αυτές προκύπτουν μετά από ενοφθαλμισμό και καλλιέργειά του σε agar και επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες. Η πυκνότητα του εναιωρήματος ρυθμίζεται στα 0.5 McFarland και με βαμβακοφόρο στυλεό επιστρώνεται σε θρεπτικό υλικό Mueller Hinton agar σε τέσσερις διευθύνσεις καθώς και στην περιφέρεια του τρυβλίου, κατά τρόπο ώστε αυτό να καλύπτεται εξ ολοκλήρου και ομοιόμορφα. Στη συνέχεια, στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται η ταινία E-test αφού παραμείνει για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ταινίες E-test είναι

λεπτές πλαστικές ταινίες μήκους 60 και πλάτους 5 mm. Στην πάνω επιφάνεια του E-test αναγράφονται οι διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού – σε υποδιπλάσιες αραιώσεις - ενώ η κάτω επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό στο τρυβλίο.

Τα τρυβλία με τα E-test επωάζονται στους 37°C σε αερόβιους επωαστικούς κλιβάνους για 18 έως 24 ώρες. Μετά την επώαση, επισκοπείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο τρυβλίο. Γύρω από το E-test παρατηρείται μία σταγονοειδής ελλειπτική περιοχή αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου. Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του φαρμάκου, ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του φαρμάκου που μετά 18-24 ώρες επώαση δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Αυτή, συμπίπτει με την αναγραφόμενη στο E-test συγκέντρωση του αντιβιοτικού, στη θέση όπου η έλλειψη της αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου συναντά την ταινία του E-test (εικόνα 20).

Εικόνα 20: E-test λινεζολίδης σε Mueller Hinton agar με *S. epidermidis*, μετά από επώαση 24 ωρών σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C



Με E-test, καθορίστηκε για όλα τα στελέχη των επιδερμικών σταφυλοκόκκων η MIC για τη λινεζολίδη. Χρησιμοποιήθηκαν ταινίες E-test τύπου AB Biodisk της εταιρίας BioMerieux. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το όριο ευαισθησίας των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλοκόκκων για τη λινεζολίδη όπως καθορίζεται από το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών

Προτύπων (CLSI, 2010) και το οποίο είναι 4 µg/ml. Με βάση αυτό το όριο, τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά ή όχι στη λινεζολίδη.

#### 1.4.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ MUELLER HINTON

Η MIC των στελεχών στη λινεζολίδη, υπολογίστηκε και με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού σε Mueller Hinton agar σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε από καθαρή σκόνη λινεζολίδης πρότυπο υδατικό διάλυμα λινεζολίδης με συγκέντρωση 2 mg/ml. Με τη βοήθεια αυτού, ετοιμάστηκαν νέα διαλύματα με Mueller Hinton agar και λινεζολίδη, σε υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού, από 0,25 έως 512 µg/ml. Οι τιμές αυτές επιλέχτηκαν με βάση τα αποτελέσματα των MICs των σταφυλοκόκκων από τα E-test και το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK, αλλά και έτσι ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες του πρότυπου στελέχους *S. aureus* ATCC 29213 το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό στέλεχος ελέγχου (MIC LZD:0.5 µg/ml). Οι τελικές συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 και 512 µg/ml.

Εν συνεχεία προετοιμάστηκαν τα εναιωρήματα των στελεχών: βακτήρια από καθαρές καλλιέργειες σε Mueller Hinton agar μετά από 24 ώρες επώαση στους 37°C, εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού σε H<sub>2</sub>O, μέχρι να επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με 0.5 της πρότυπης κλίμακας MacFarland. Η παραπάνω πυκνότητα αντιστοιχεί σε περίπου 10<sup>8</sup> cfu/ml. Ακολούθησε αραιώση 1:100 και έτσι επιτεύχθηκε τελική συγκέντρωση 10<sup>6</sup> cfu/ml.

Από τα παραπάνω τελικά εναιωρήματα, ενοφθαλμίστηκαν 10 µl σε μορφή μικρής σταγόνας ανά στέλεχος, δηλαδή 10<sup>4</sup> cfu/spot ανά τρυβλίο. Όλα τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες σε αερόβιο επωαστικό κλίβανο και στη συνέχεια επισκοπήθηκαν. Το τρυβλίο με την μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη των μικροβίων, αντιστοιχεί στην MIC του στελέχους στη λινεζολίδη.

## II. ΜΟΡΙΑΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

### II.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Στα πλαίσια της μελέτης των στελεχών που απομονώθηκαν, σημαντικό στάδιο αποτελεί ο μοριακός έλεγχος για γονίδια αντοχής, στο γονιδίωμα των απομονωθέντων μικροοργανισμών.

Πρώτο βήμα και απαραίτητη προϋπόθεση γι' αυτό, αποτελεί η εξαγωγή του DNA από το μικροβιακό κύτταρο (DNA extraction).

Για την απομόνωση του βακτηριακού DNA από τους ανθεκτικούς στη λινεζολίδη επιδερμικούς σταφυλοκόκκους, χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit Qiamp DNA Mini Kit από την εταιρία Qiagen (Qiagen, Valenzia, CA). Η όλη διαδικασία που ακολουθείται έχει όπως παρακάτω.

Τα βακτηριακά στελέχη αρχικά ανακαλλιεργούνται σε Mueller Hinton agar και επωάζονται για 18-24 ώρες στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες. Από την καλλιέργεια λαμβάνονται δύο με τρεις καθαρές αποικίες, εναιωρούνται σε 180μl ειδικού λυτικού διαλύματος (ATL buffer) που εμπεριέχεται στο kit και αναδεύονται για 15 λεπτά. Εν συνεχεία προστίθενται 20μl πρωτεϊνάσης K (proteïnase K) και τα εναιωρήματα επωάζονται στους 56°C για 2 ώρες σε ειδικό κλίβανο με δυνατότητα συνεχούς – ήπιας - ανάδευσης.

Μετά την επώαση, προστίθεται δεύτερο λυτικό διάλυμα (AL buffer) το οποίο αποδεσμεύει τις πρωτεΐνες. Αναδεύουμε καλά με vortex προκειμένου να ομογενοποιηθεί καλά το μείγμα και στη συνέχεια επωάζουμε στους 70°C για 10 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 200 μl απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση για 15 λεπτά, και το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Spin column) που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάριο των 2 ml. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις: αρχικά για 1 λεπτό στις 8000 rpm.

Εν συνεχεία μεταφέρεται σε άλλο σωληνάριο, προστίθενται τα πλυστικά διαλύματα AW1 και AW2 (από 500μl έκαστο) και φυγοκεντρείται διαδοχικά, στις 8000 rpm για 1 λεπτό, στις 13000 rpm για 3 λεπτά και στις 14.000 rpm για 1 λεπτό. Απομακρύνονται τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης και προστίθενται 200 μl διαλύματος έκπλυσης AE buffer. Παραμονή και επώαση

για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για ένα λεπτό, ολοκληρώνουν τη διαδικασία. Το υλικό μεταφέρεται σε σωληνάρια erpendorf και φυλάσσεται στους -20 °C.

## II.2 ΜΕΘΟΔΟΙ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ

Η PCR χρησιμοποιήθηκε σε επιλεγμένα στελέχη της μελέτης, προκειμένου να μελετηθούν οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντοχή στη λινεζολίδη:

- για τη μελέτη των μεταλλάξεων στο γονίδιο του 23S rRNA (όπου χρησιμοποιήθηκε η μακριά PCR (“long” PCR))
- για την μελέτη ενός τμήματος της περιοχής V του 23S rRNA μήκους 419bp, (όπου χρησιμοποιήθηκε η “nested” PCR).
- για την ανίχνευση του γονιδίου *cfr*
- για την ανίχνευση των γονιδίων *rpIC*, *rpID*, *rpIV* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22.

### II.2.1. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ 23S rRNA

Προκειμένου να διερευνήσουμε τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στη λινεζολίδη, για κάθε στέλεχος μελετήθηκαν και τα 6 αντίγραφα του 23S rRNA με 2 διαφορετικές PCR για καθένα τους: μία εσωτερική και μία εξωτερική. Συνολικά δηλαδή για κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν 12 PCR. Με τις εσωτερικές PCR, έγινε πολλαπλασιασμός ενός μέρους του 23S rRNA μήκους 419 bp που αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης της λινεζολίδης. Με αλληλούχιση έγινε ανίχνευση των μεταλλάξεων σε κάθε ένα αντίγραφο ξεχωριστά. Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων έγινε με την ειδική συσκευή AB Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας καθαρό ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών.

Αναλυτικότερα: Χρησιμοποιήθηκαν 6 ζευγάρια εκκινητών για την ενίσχυση των διαφόρων αντιγράφων του 23S rRNA των στελεχών της μελέτης. Το μείγμα αντιδραστηρίων περιείχε εκτός από τα ζεύγη εκκινητών, μείγμα ελονγκασών (Elongase Enzyme Mix, Taq πολυμεράση και GB-D

θερμοσταθερές πολυμεράσες του είδους *Pyrococcus*), dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), 5X Buffer A και 5X Buffer B (για να επιτευχθεί η συγκέντρωση  $Mg^{+} 1.6 \text{ mM}$ ). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl, 48 μl μείγματος και 2 μl DNA.

Στη συνέχεια, για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ενισχύθηκε με κατάλληλο ζεύγος εκκινήτων η περιοχή σύνδεσης της λινεζολίδης, μήκους 419 bp στην περιοχή V του 23S rRNA. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε μείγμα αντιδραστηρίων που περιείχε: τα ζεύγη των εκκινήτων, DNA πολυμεράση (Platinum® Pfx DNA Polymerase), dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), ρυθμιστικό διάλυμα 10X Pfx Amplification buffer και  $MgSO_4$ , όλα αντιδραστήρια της εταιρίας Invotrogen Inc. Carsbad, CA, USA.

Παρακάτω παραθέτονται σε δύο διαδοχικούς πίνακες, οι συστάσεις των προαναφερθεισών PCR, με τελικό όγκο – μετά την προσθήκη και του μικροβιακού DNA - 50μl η κάθε μία.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων στο μείγμα PCR ελονγκάσης (*Elongase® enzyme mix.*)

Σύσταση διαλύματος PCR	ποσότητα σε μl
H <sub>2</sub> O	33
5x Buffer A	4
5x Buffer B	6
dNTPs	1
Εκκινήτης 1 (forward)	1
Εκκινήτης 2 (reverse)	1
Elongase enzyme mix	2
Μικροβιακό DNA	2

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων στο μείγμα PCR DNA πολυμεράσης (*Platinum® Pfx DNA Polymerase*)

Σύσταση διαλύματος PCR	ποσότητα σε μl
H <sub>2</sub> O	39
10X Pfx Amplification Buffer	5
MgSO <sub>4</sub> 1mM	1
dNTPs	1.5
Εκκινήτης 1 (forward)	1
Εκκινήτης 2 (reverse)	1
Platinum Pfx DNA Polymerase	0.5
Μικροβιακό DNA	1



Αμέσως παρακάτω, φαίνονται οι αλληλουχίες βάσεων των εκκινητών στις PCR που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να ανιχνευτεί, στα στελέχη της μελέτης, η παρουσία γονιδίων αντοχής στη λινεζολίδη. Για κάθε γονίδιο φαίνονται δύο αλληλουχίες εκκινητών (forward και reverse, F και R αντίστοιχα).

Πίνακας 12: (Liakopoulos et al, 2009) PCR για την ενίσχυση των αντιγράφων του 23S rRNA

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος προϊόντος (bp)	Συνθήκες
<i>rrlA</i>	F	5'...AAACCAATTGGGATTAAAGT...3'	5548	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35
	R	5'...TCGAGGGATCTTATAACCG...3'		
<i>rrlB</i>	F	5'...CCTCCAACCTGGTGGTCTAGG...3'	6371	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 48 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35
	R	5'...TCCTTGCCATTGTCACCAGA...3'		
<i>rrlC</i>	F	5'...GAGTCCACTTAGGCCACCA...3'	5999	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35
	R	5'...CTACTCTTTTTATAGCAATG...3'		
<i>rrlD</i>	F	5'...GCCTGGCAACGTCCTACTCT...3'	7362	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35
	R	5'...AACATTTATTCTCGATGAAA...3'		
<i>rrlE</i>	F	5'...TGTTGATGGAGCTTCAGTAG...3'	4358	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35
	R	5'...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3'		
<i>rrlF</i>	F	5'...TCTTGATCTCTTCCTACTA...3'	6058	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, x35,68 °C 6 min] x35
	R	5'...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3'		
Εσωτερικό τμήμα της περιοχής V	F	5'...GCGGTCGCCTCCTAAAAG...3'	419	94 °C 2 min, [94 °C 45 sec, 58 °C 30 sec, 68 °C 35 sec] x35, 72 °C 10 min
	R	5'...ATCCCGGTCCTCTCGTACTA...3'		

## II.2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ PCR ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *rplC*, *rplD* ΚΑΙ *rplV*

Μεταλλάξεις στα γονίδια *rplC*, *rplD* και *rplV* στους σταφυλοκόκκους, μπορούν να συνδέονται με αλλαγές στη στερεοδομή των ριβοσωμικών πρωτεϊνών L3, L4 και L22 και έτσι να τροποποιούν τη θέση σύνδεσης της λινεζολίδης στο ριβόσωμα. Με τον τρόπο αυτό, οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής έναντι της λινεζολίδης. Με PCR, έγινε αρχικά ενίσχυση των παραπάνω γονιδίων για τα στελέχη της μελέτης και στη συνέχεια αλληλούχισή των βάσεων τους προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις (**Mendes RE *et al*, 2010**).

Οι PCR, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων της εταιρίας Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA. Στον πίνακα 13 φαίνονται ακριβώς τα αντιδραστήρια και οι όγκοι τους ανά αντίδραση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του μείγματος αντιδραστηρίων (master mix): DNA πολυμεράση (Platinum® DNA Polymerase), dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), ρυθμιστικό διάλυμα 10X Amplification Buffer, MgCl<sub>2</sub> 50 mM και το ζεύγος των εκκινητών. Ο τελικός όγκος του master mix είναι 45μl και αναμυγνυόμενος με 5 μl δίνει τελικό όγκο αντίδρασης ανά PCR, 50 μl. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καθαρό ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών.

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια PCR για την ανίχνευση των *rplC*, *rplD* και *rplV* γονιδίων

Σύσταση διαλύματος PCR	ποσότητα σε μl
H <sub>2</sub> O	36.35
Platinum® DNA Polymerase	0.5
10X Pfx Amplification Buffer	5
dNTPs	1.25
Εκκινητής 1 (forward)	0.2
Εκκινητής 2 (reverse)	0.2
MgCl <sub>2</sub>	1.5
Μικροβιακό DNA	5

Η αλληλουχία των βάσεων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: (Mendes et al, 2010) Αλληλουχία βάσεων εκκινήτων και συνθήκες PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *rpIC*, *rpID* και *rpIV* των σταφυλοκόκκων

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινήτη		Μέγεθος προϊόντος (bp)	Συνθήκες
<i>rpIC</i>	F	5'...ACC CTG ATT TAG TTC CGTCTA...3'	822	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min
	R	5'...GTT GAC GCT TTA ATG GGCTTA...3'		
<i>rpID</i>	F	5'...TCG CTT ACC TCC TTA ATG...3'	1200	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min
	R	5'...GGT AAC ACT GTA ACT G...3'		
<i>rpIV</i>	F	5'... CAA CAC GAA GTC CGA TTGGA...3'	350	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min
	R	5'... GCA GAC GAC AAG AAA ACAAG...3'		

Κατόπιν, με τη χρήση της ειδικής συσκευής αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) έγινε αλληλούχιση των βάσεων των γονιδίων για να διαπιστωθεί η παρουσία μεταλλάξεων.

### II.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *cfi* ΜΕ PCR

Όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης *Cfr*, *cfi*, στους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους, σχετίζεται με ανάπτυξη αντοχής απέναντι στη λινεζολίδη.

Με τη χρήση της PCR έγινε ενίσχυση και ανίχνευση της παρουσίας του συγκεκριμένου γονιδίου μεγέθους 740bp (Kehrenberg C *et al*, 2005). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA. Το μείγμα των αντιδραστηρίων περιελάμβανε DNA πολυμεράση (Platinum® DNA Polymerase), dNTPs τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ρυθμιστικό διάλυμα 10X Amplification Buffer, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, το ζεύγος των εκκινητών και το μικροβιακό DNA. Σε τελικό όγκο αντίδρασης PCR 50μl, όπως φαίνεται στον πίνακα 15, τα 45 μl αποτελούν των όγκο των αντιδραστηρίων και τα 5 μl του μικροβιακού DNA. Στον συγκεκριμένο πίνακα, καταγράφονται οι μερικοί όγκοι των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 15: Αντιδραστήρια PCR για την ανίχνευση του *cfr* γονιδίου

Σύσταση διαλύματος PCR	ποσότητα σε μl
H <sub>2</sub> O	36.35
Platinum® DNA Polymerase	0.5
10X Pfx Amplification Buffer	5
dNTPs	1.25
Εκκινητής 1 (forward)	0.2
Εκκινητής 2 (reverse)	0.2
MgCl <sub>2</sub>	1.5
Μικροβιακό DNA	5

Αμέσως παρακάτω παρατίθενται σε πίνακα (πίνακας 16) οι αλληλουχίες των βάσεων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την ενίσχυση και την ανίχνευση του γονιδίου *cfr*.

Πίνακας 16: (Kehrenberg C *et al*, 2005) Αλληλουχία βάσεων εκκινητών PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *cfr* των σταφυλοκόκκων

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος προϊόντος	Συνθήκες
<i>cfr</i>	F	5'...TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA...3'	740 bp	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min
	R	5'...ACCATATAATTGACCACAAGCAGC...3'		

## II.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΒΑΣΕΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

### II.3.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

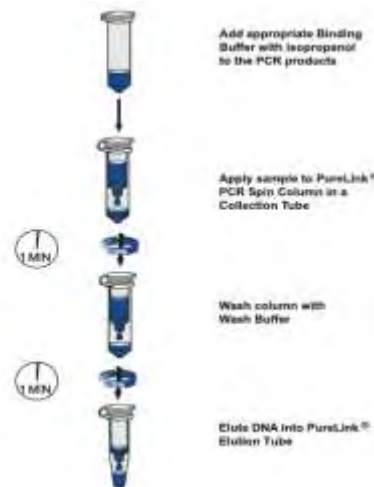
Ο καθορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των τμημάτων του γενετικού υλικού των σταφυλοκόκκων που μελετήθηκαν και που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής έναντι της λινεζολίδης, ήταν ένα κομβικό σημείο προκειμένου να μπορέσουν να αναδειχθούν οι σχετικοί μηχανισμοί αντοχής μέσα από την πιθανή παρουσία μεταλλάξεων. Προτού όμως προχωρήσουμε στην διαδικασία της αλληλούχισης, απαραίτητο ήταν να απαλλάξουμε τα προϊόντα των PCR από υλικά που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν την τελική έκβασή της, όπως άλατα, εκκινητές και δεοξυριβονουκλεοτίδια καθώς και μη νουκλεϊκές ενώσεις. Για το σκοπό αυτό και πριν την αλληλούχιση, έγινε καθαρισμός των προϊόντων των PCR με την χρήση ειδικού εμπορικού συστήματος της εταιρίας Invitrogen (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA) με την ονομασία Purelink® PCR Purification Kit. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει όπως παρακάτω, παρουσιάζεται δε σχηματικά στην εικόνα 21:

160 μl ρυθμιστικού διαλύματος PureLink Binding Buffer με ισοπροπανόλη αναμειγνύονται με 40 μl προϊόντος PCR και εν συνεχεία αναδεύεται ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί. Χρησιμοποιώντας την ειδική στήλη PureLink Spin Column όπου μεταφέρουμε το παραπάνω διάλυμα και αφού το φυγοκεντρήσουμε στις 10,000 xg για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, πετυχαίνουμε την πρόσδεση του δίκλωνου DNA στη στήλη. Στη συνέχεια απορρίπτουμε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη και προσθέτουμε 650 μl wash buffer (ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) με αιθανόλη. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση της στήλης στα 10,000 xg σε θερμοκρασία δωματίου για άλλο ένα λεπτό και απόρριψη του υγρού που έχει εισρεύσει. Φυγοκεντρούμε ξανά τη στήλη σε μέγιστη ταχύτητα και απομακρύνονται τα τελευταία υπολλείματα του wash buffer.

Στη συνέχεια η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου erpedorf των 1.5 ml. Στο κέντρο της στήλης προστίθεται διάλυμα έκλουσης (elution buffer) (Tris-HCL 10mM, pH: 8.5) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Το διάλυμα έκλουσης που προκύπτει, περιέχει καθαρό προϊόν PCR απαλλαγμένο από παραπροϊόντα και αντιδραστήρια, κατάλληλο για να προχωρήσει στη διαδικασία της αλληλούχισης των βάσεων του. Στη μορφή αυτή δε, μπορεί να αποθηκευτεί στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για όσο διάστημα χρειαστεί μέχρι να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω.

Εικόνα 21: Διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων PCR με τη χρήση του Purelink® PCR Purification Kit.



### II.3.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR (DNA SEQUENCING)

Ο καθορισμός της αλληλουχίας των βάσεων σε καθορισμένα τμήματα του μικροβιακού υλικού των σταφυλοκόκκων, με απώτερο σκοπό την ανάδειξη μεταλλάξεων σχετιζομένων με ανάπτυξη αντοχής στη λινεζολίδη, πραγματοποιήθηκε σε ειδικό μηχάνημα αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA της εταιρίας Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) με την εφαρμογή της μεθόδου Sanger.

Αυτή στηρίζεται στην χρησιμοποίηση ειδικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, σεσημασμένων με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές (ddNTPs). Κάθε χρωστική αντιστοιχεί σε μία εκ των τεσσάρων βάσεων του DNA, και έτσι προκύπτουν ddATPs, ddGTPs, ddTTPs και ddCTPs. Τα σεσημασμένα dNTPS δεν φέρουν την 3' υδροξυλομάδα ( $3\text{ -OH}$ ) και έτσι ενσωματώνονται στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων χωρίς να επιτρέπουν

την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν διάφορα κομμάτια μικροβιακού DNA, άλλοτε άλλου μήκους, ανάλογα με το που και πως συνδέονται τα ddNTPs στη διπλή έλικα.

Τα κομμάτια αυτά του DNA, μπαίνουν σε θερμοκυκλοποιητή και πολλαπλασιάζονται με τη χρήση ενός και όχι δύο εκκινητών όπως στην PCR. Για κάθε δείγμα γίνονται 4 διαφορετικές αντιδράσεις. Σε κάθε μία από αυτές, χρησιμοποιείται ο εκκινητής και ένας τύπος ddNTPs (ddATPs, ddGTPs, ddTTPs ή ddCTPs) Έτσι επιτυγχάνεται γραμμικός πολλαπλασιασμός των προϊόντων επέκτασης του DNA και προκύπτουν 4 διαφορετικά σεσημασμένα κομμάτια DNA τα οποία στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Με τη βοήθεια ειδικού αναλυτή (DNA sequencer) γίνεται η συνδυαστική ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων και ο καθορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους (dna sequencing).

Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τις αλληλουχίες προτύπων στελεχών οι οποίες είναι καταχωρημένες σε ειδική τράπεζα γονιδιακών πληροφοριών (GenBank, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) στο NCBI (National Center of Biological Information).

### III. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

Για την μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης, χρησιμοποιήθηκε ένα παλαιότερο πρωτόκολλο (Pournaras S *et al*, 2013) που εφαρμόστηκε με κάποιες τροποποιήσεις. Με αυτό το πρωτόκολλο μελετήθηκαν ως προς την εξάρτησή τους από τη λινεζολίδη, 63 στελέχη επιδερμικών σταφυλοκόκκων με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml) που αποτελούσαν την αρχική συλλογή από τα Ελληνικά Νοσοκομεία όσο και 11 στελέχη απομονωθέντα από Γερμανικά Νοσοκομεία επίσης επιλεγμένα ως προς την υψηλή τους MIC (>256 µg/ml) για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Παράλληλα μελετήθηκαν και 18 στελέχη από τα ελληνικά και 3 από τα γερμανικά νοσοκομεία με χαμηλότερου επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη καθώς και 9 στελέχη επιδερμικών σταφυλοκόκκων από Νοσοκομεία της Ιταλίας που επίσης παρουσίαζαν αντοχή στη λινεζολίδη με MICs από 8 έως 64 µg/ml. Ως

στελέχη ελέγχου (controls) χρησιμοποιήθηκαν το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213 με MIC για τη λινεζολίδη 0,5 µg/ml, καθώς και στέλεχος *S. epidermidis* ευαίσθητο στη λινεζολίδη (Linezolid Sensitive *Staphylococcus epidermidis*, LSSE) με MIC 1 µg/ml.

Αρχικά, κάθε στέλεχος ξεχωριστά – μαζί και το στέλεχος ελέγχου - ενοφθαλμίζεται σε Mueller Hinton agar και επωάζεται στους 37°C σε αερόβιο επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. Μετά την επώαση, μία αποικία του κάθε στελέχους, ενοφθαλμίζεται σε σωληνάριο με 5 ml Mueller Hinton broth. Όλα τα σωληνάρια τοποθετούνται σε ειδικό αερόβιο κλίβανο με δυνατότητα ανάδευσης των δειγμάτων, όπου και επωάζονται στους 37 °C για χρονικό διάστημα 18 ωρών.

Με τη βοήθεια πρότυπου διαλύματος λινεζολίδης 2 mg/ml, ετοιμάζονται σε σωληνάρια, διαλύματα Mueller Hinton broth των 2 ml με ελεγχόμενες συγκεντρώσεις λινεζολίδης. Αυτές, ειδικά για τα στελέχη με MIC για τη λινεζολίδη >256 µg/ml, είναι όπως παρακάτω (πίνακας 17):

Πίνακας 17: προετοιμασία Mueller Hinton broth με ελεγχόμενη συκέντρωση λινεζολίδης για τη μελέτη της εξάρτησης σε LRSE με MIC:>256 µg/ml.

Ζητούμενη τελική συγκέντρωση (µg/ml)	Όγκος προτύπου δ/τος λινεζολίδης (2 mg/ml) (µl)	Όγκος δ/τος MH broth (µl)	Τελικός όγκος (ml)
0	0	2000	2
32	32	1968	2
64	64	1936	2

Για τα στελέχη ελέγχου, οι συγκεντρώσεις της λινεζολίδης είναι 0, 0.25 και 0.5 µg/ml, αντίστοιχα, ενώ σε κάθε περίπτωση που θα μελετηθούν στελέχη LRSE με MIC μικρότερη του 256, χρησιμοποιούνται δύο υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις λινεζολίδης και η μηδενική. Δηλαδή για τα στελέχη με MIC 64 µg/ml συγκεντρώσεις 32, 16 και 0 µg/ml, για εκείνα με MIC 32 µg/ml, 16, 8 και 0 µg/ml, σε MIC 16 µg/ml 8, 4 και 0 µg/ml και για 8 µg/ml, 4, 2 και 0 µg/ml. Για κάθε στέλεχος που μελετάται, ετοιμάζονται 3 σετ Mueller Hinton broth με λινεζολίδη, ώστε το φαινόμενο να επιβεβαιώνεται εις τριπλούν και έτσι να διασφαλίζεται η επαναληψιμότητα της μεθόδου.



Στα παραπάνω σετ σωληναρίων, ενοφθαλμίζονται τα στελέχη που καλλιεργήθηκαν στην πρώτη υγρή καλλιέργεια με MH broth, όπως παρακάτω: Αφού ολοκληρωθεί η δεκαοκτάωρη επώασή τους, οι υγρές καλλιέργειες με κατάλληλη αραιώση με MH broth φέρονται στην συγκέντρωση 1.0 της πρότυπης κλίμακας MacFarland. Από το διάλυμα αυτό, ενοφθαλμίζονται 20 μl σε κάθε ένα από τα 3 σετ σωληναρίων των 2 ml με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις λινεζολίδης. Αυτά επωάζονται σε ειδικό κλίβανο με δυνατότητα ανάδευσης, στις 110 rpm, σε αερόβιες συνθήκες, στους 37°C και για διάστημα 48 ωρών. Σημειώνεται ότι ένα σετ σωληναρίων που δεν έχει ενοφθαλμιστεί και επομένως παραμένει στείρο μικροβίων, χρησιμοποιείται σαν «τυφλό» δείγμα για διασφάλιση της αποφυγής εξωγενούς επιμόλυνσης.

Καθ' όλο το παραπάνω διάστημα της επώασης των υγρών καλλιεργειών, ανά 12ωρο μετράται η μικροβιακή ανάπτυξη με τη βοήθεια θολοσιμέτρου και με βάση την πρότυπη κλίμακα MacFarland, ξεκινώντας από τις 0 ώρες (δηλαδή στις 0, 12, 24, 36 και 48 ώρες). Πριν από κάθε μέτρηση πυκνότητας, τα σωληνάκια αναδεύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα τύπου vortex για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα προκειμένου να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης και των μετρήσεων, ακολουθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη διπλή δοκιμασία *t-test* και  $\chi^2$  *test* και με τη βοήθεια λογισμικού Minitab software (version 13.31). Η ανάπτυξη των στελεχών συν τω χρόνω παρουσία και απουσία λινεζολίδης, αποτυπώνεται σε καμπύλες ανάπτυξης. Αναζητείται η στατιστικά σημαντική επιτάχυνση της ανάπτυξης των στελεχών παρουσία του αντιβιοτικού, σε σχέση με την ανάπτυξή τους στο καλλιεργητικό υλικό απουσία λινεζολίδης. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στην τιμή  $P \leq 0.05$ . Στελέχη που αναπτύσσονται ταχύτερα σε περιβάλλον με το αντιβιοτικό, χαρακτηρίζονται ως εξαρτώμενα από την λινεζολίδα (linezolid dependent).

#### IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΓΕΡΜΑΝΙΑ

#### IV.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS –PFGE)

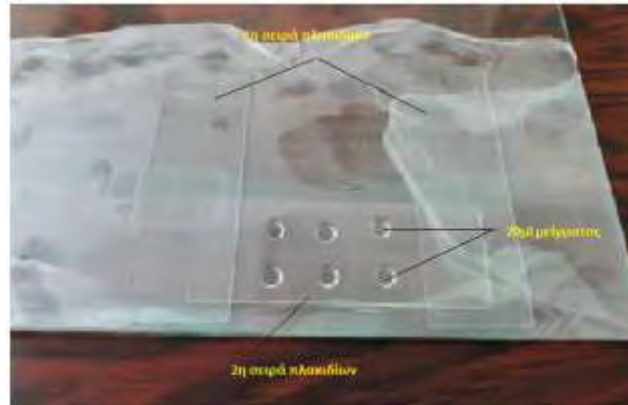
Η γενετική συσχέτιση των στελεχών της μελέτης, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE). Σκοπός ήταν να καταδειχτεί αν υπήρχε κλωνικότητα στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά νοσοκομεία. Η PFGE πραγματοποιήθηκε στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης CHEF-DRIII της εταιρίας Biorad, (Biorad. Hemel Hempstead, UK) με το παρακάτω τρόπο:

Αρχικά τα στελέχη καλλιεργούνται σε τρυβλία που περιέχουν trypticase soy agar (TSA) και επωάζονται για 20 ώρες στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες. Από τις αποικίες που προκύπτουν, μία ανακαλλιεργείται σε σωληνάριο με 5 ml ζωμό Trypticase Soy broth και επωάζεται και πάλι για 20 ώρες στους 37 °C σε ειδικό κλίβανο με δυνατότητα ήπιας ανάδευσης. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCL, 1 M NaCl, pH 8.0) και γίνεται ανασύσταση.

Σε άλλο σωληνάριο τύπου για προστίθεται 1 ml καθαρού PIV και σ' αυτό προστίθεται τόση ποσότητα από το προηγούμενο διάλυμα με το μικροβιακό στέλεχος, ώστε η πυκνότητά του να φτάσει τα 5.0 της κλίμακας MacFarland. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και ανασυσταίνεται με 200 μl PIV. Στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης 2% χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA), σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος PIV. Τα διαλύματα της αγαρόζης και των εναιωρημένων στελεχών τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 10 λεπτά κατ' ελάχιστον. Από αυτά παίρνουμε 100 μl δείγματος και 100 μl αγαρόζης και τα αναμειγνύουμε. Από το μείγμα αυτό, ετοιμάζουμε μικρά «κομβία» μείγματος

αγαρόζης – μικροβιακού εναιωρήματος, με την παρακάτω διαδικασία (εικόνα 22):

Εικόνα 22: Διαδικασία δημιουργίας κομβίων μείγματος αγαρόζης-μικροβιακού εναιωρήματος για τη διεξαγωγή της PFGE



Πάνω σε μία γυάλινη πλάκα καλυμμένη με parafilm, τοποθετούμε μία πρώτη σειρά παραλλήλων γυάλινων πλακιδίων (αντικειμενοφόρων πλακών) όπως φαίνεται στην εικόνα και στη συνέχεια μεταφέρουμε 6-8 σταγόνες των 20μl ανά στέλεχος στο χώρο ανάμεσα στα πλακίδια. Στη συνέχεια, καλύπτουμε με μία δεύτερη σειρά γυάλινων καλυπτριδών καθέτων στην πρώτη, έτσι ώστε να σχηματίζονται μικρές κηλίδες μείγματος μικροβιακού εναιωρήματος και αγαρόζης. Ακολούθως, η γυάλινη πλάκα τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 5 λεπτά ακριβώς και μετά σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 5 λεπτά.

Η πηκτή αγαρόζης με το μικροβιακό εναιώρημα, έχοντας πάρει μία μορφή μικρών κομβίων μπαίνει σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν 1 ml διαλύματος EC (6mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium laurylsarcosine, pH 8.0) που περιέχει επιπλέον 100μg/ml λυσοζύμη (lysozyme Sigma-Aldrich), 50 μg/ml RNAaseA (Sigma-Aldrich) και 50 μg/ml λυσοσταφίνη (lysostaphin Sigma-Aldrich). Όλα τα κομβία αγαρόζης ανά μικροβιακό στέλεχος τοποθετούνται στο ίδιο σωληνάριο και στη συνέχεια, όλα τα σωληνάρια επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 20 ώρες. Με αυτή τη διαδικασία, καταστρέφεται το μικροβιακό τοίχωμα.

Αφού απομακρυνθούν από τον επωαστικό κλίβανο, τα σωληνάρια τοποθετούνται για 10 λεπτά στους 4°C προκειμένου να στερεοποιηθεί η αгарόζη και εν συνεχεία αφαιρείται όλο το διάλυμα EC και προστίθεται 1 ml διάλυμα ESP (EDTA 0,5M, Sarcosyl 1% και pH:9.0). Αυτό το διάλυμα περιέχει πρωτεΐνάση K (bioline) με περιεκτικότητα 40 U/mg και αφού επωαστεί για μία νύχτα (overnight) στους 60°C, προκαλεί πέψη όλων των βακτηριακών πρωτεϊνών.

Όταν ολοκληρωθεί και αυτή η διαδικασία, αφαιρείται το ESP και χρησιμοποιώντας διάλυμα TE (Tris 10mM pH:7.5 και EDTA 1 mM pH:8.0) γίνονται 5 διαδοχικές πλύσεις ανά 20 λεπτά, έτσι ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία κατάλοιπα της πρωτεΐνάσης K και των πρωτεϊνών. Έτσι, τα κομβία αгарόζης καταλήγουν να περιέχουν μόνο μικροβιακό DNA. Αυτά μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα TE στους 4°C για όσο διάστημα χρειαστεί.

Στο επόμενο στάδιο, γίνεται πέψη του DNA με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος Tango 1X που περιέχει ενζύμου *Sma*I. Χρησιμοποιούνται 80 μl διαλύματος περιεκτικότητας 10 U/μl σε *Sma*I για κάθε στέλεχος μετά από overnight επώαση στους 30°C. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 10μl χρωστικής 10X Blue Juice Loading Buffer (Tris-HCl 10mM pH:7.5, EDTA 10mM, 65% sucrose, 0.3% w/v Bromophenol Blue) και τα δείγματα τοποθετούνται για 10 λεπτά στους 4°C για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

Τέλος τα κομβία της αгарόζης με το κατατεμαχισμένο μετά την πέψη γενετικό υλικό, ηλεκτροφορούνται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης με πηκτή αгарόζης (1% agarose for pulsed field electrophoresis gunning gel σε 0.5X TBE) σε θερμοκρασία 11.3 °C, με τάση V=6 volts/cm 120° switch angle, initial switch time 5 δευτερόλεπτα και final switch time 35 δευτερόλεπτα, για 20 ώρες. Στην παραπάνω διαδικασία σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται το εμπορικό σκεύασμα PULSE MARKER™ 50-1,000 kb (SigmaAldrich) που περιέχει κομμάτια DNA λ φάγου, γνωστών μεγεθών και πραγματοποιείται στην

ειδική συσκευή CHEF-DRIII της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK).

Μετά την ηλεκτροφόρηση το DNA κάθε στελέχους αφήνει στο gel χαρακτηριστικά ίχνη με τη μορφή ηλεκτροφορητικών ζωνών. Η εικόνα αυτών εξαρτάται από το μέγεθος των κομματιών στα οποία αναλύθηκε το μικροβιακό DNA καθώς υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, τα ελαφρύτερα κομμάτια του DNA διανύουν μεγαλύτερη απόσταση στο gel αгарόζης, σε σχέση με τα βαρύτερα.

Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, η γέλη αгарόζης χρωματίζεται με τη χρήση διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 1μg/ml μέσα σε ειδικό δοχείο όπου και τοποθετείται για 30 λεπτά. Μετά αποπλένεται με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και εκτίθεται με ειδική συσκευή σε υπεριώδη ακτινοβολία. Υπό UV ακτινοβολία, το ηλεκτροφόρημα παρατηρείται σε οθόνη με τη βοήθεια Η/Υ και δύναται να αποτυπωθεί ψηφιακά ή/και σε χαρτί.

Η ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων γίνεται με επισκόπηση των ταινιών και με βάση τα ερμηνευτικά κριτήρια των Tenover *et al* (Tenover FC *et al*, 1995). Όσα στελέχη διαφέρουν σε έξι και λιγότερες μπάντες, θεωρούνται ότι έχουν κάποιου τύπου επιδημιολογική συγγένεια. Αντιθέτως, αν κάποια στελέχη διαφέρουν στο ηλεκτροφόρημά τους σε περισσότερα από 6 σημεία, τότε θεωρείται ότι δεν έχουν επιδημιολογική συγγένεια. Αναλυτικότερα, τα κριτήρια των Tenover *et al*, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 18).

Πίνακας 18: Κριτήρια αξιολόγησης της PFGE κατά Turnover.

Αριθμός διαφορετικών ζωνών	Τύπος συγγενείας στελεχών	Επιδημιολογική ερμηνεία
0	Πανομοιότυπα	επιδημικός κλώνος
2-3	στενή συγγένεια	στελέχη που πιθανόν σχετίζονται επιδημιολογικά
4-6	πιθανή συγγένεια	στελέχη που είναι δυνατόν να σχετίζονται επιδημιολογικά
>6	διαφορετικά στελέχη	στελέχη που δεν σχετίζονται επιδημιολογικά

## IV.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΘΕΣΕΩΝ (MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING, MLST)

Η MLST είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας, πολύ χρήσιμη στην τυποποίηση και τον καθορισμό της κλωνικότητας διαφόρων στελεχών του ίδιου είδους. Στηρίζεται τη λειτουργία της στην αλληλούχηση (DNA sequencing) και ανίχνευση του πώς διαφοροποιούνται, συγκεκριμένα και προκαθορισμένα εσωτερικά τμήματα DNA μήκους 450 – 500 bp, πολλαπλών, χαρακτηριστικών του είδους, γονιδίων (housekeeping genes). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα κάθε μελέτης με μία κεντρική βάση δεδομένων, καθίσταται δυνατός ο καθορισμός της γενετικής συγγένειας και της κλωνικότητας διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους, σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η αρχή λειτουργίας της MLST στηρίζεται στον συνδυασμό της τεχνικής πολλαπλασιασμού του DNA με PCR (amplification), με εκείνη της αλληλούχησης των βάσεων του DNA (DNA sequencing). Διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, ελέγχονται για έναν άλλοτε άλλο αριθμό θέσεων γονιδίων, ανάλογα με τον επιθυμητό βαθμό διάκρισης των κλώνων που μελετώνται. Συνήθως όμως και για πρακτικούς λόγους, αναλύονται επτά έως οκτώ γονιδιακές θέσεις, αριθμός που διασφαλίζει ικανή διακριτική ικανότητα με το ελάχιστο δυνατόν κόστος. Ειδικά για τους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους, τα σημεία αυτά αφορούν σε επτά γονίδια: carbamate cinase (*arc*), shikimate dehydrogenase (*aroE*), glytathione redactase (*gtr*), methylmanole Co-A mutase (*mutS*), pyrimidine-nucleide (*pyrR*), triphosphate isomerase (*tpi*) και acetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*) (Thomas JC *et al*, 2007).

Η MLST στηρίζεται στη συλλογή δεδομένων αλληλούχησης και ανάλυσή τους κατά τρόπο ώστε να αναδεικνύονται και να αξιολογούνται οι διαφοροποιήσεις των γονιδίων ανά κλώνο. Έτσι, τα διαφορετικά στελέχη, αναλύονται και κατατάσσονται σε διάφορους τύπους αλληλομόρφων (sequence types, STs), που καταχωρούνται σε μία παγκόσμια βάση δεδομένων. Ανατρέχοντας σ' αυτή τη βάση βιολογικών δεδομένων, αναγνωρίζουμε τους διάφορους μικροβιακούς κλώνους και παίρνουμε

χρήσιμες πληροφορίες για την διασπορά τους. Στελέχη που διαφοροποιούνται έστω και σε ένα νουκλεοτίδιο, κατατάσσονται σε διαφορετικό ST τύπο. Με δεδομένο ότι η πιθανότητα, μεταλλάξεις να οδηγήσουν διαφορετικούς κλώνους στην ανάπτυξη ίδιου MLST προφίλ είναι απειροελάχιστη, αντιλαμβάνεται κανείς τη χρησιμότητα της μεθόδου στην επιδημιολογική μελέτη των μικροβιακών ειδών.

## V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### V.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η μελέτη συμπεριέλαβε τελικά 3 συλλογές επιδερμικών σταφυλοκόκκων με αντοχή στη λινεζολίδη (LRSE) και με διαφορετική προέλευση η κάθε μία. Η πρώτη με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ελλάδα, η δεύτερη στη Γερμανία και η τρίτη αντίστοιχα με στελέχη από την Ιταλία. Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *S. epidermidis* τόσο με τη χρήση του Vitek 2 της BioMerieux όσο και με το Maldi bionalyzer της Bruker.

Η πρώτη συλλογή, αποτελείται από 81 μη επαναλαμβανόμενα στελέχη LRSE που συλλέχθηκαν από 6 διαφορετικά μεγάλα Νοσοκομεία της Ελλάδας, από το 2011 έως το 2013. Τα νοσοκομεία αυτά βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία της ελληνικής επικράτειας και μπορούμε να πούμε πως δίνουν μια αντιπροσωπευτική εικόνα για τη διασπορά αυτών των στελεχών στη χώρα μας. Συγκεκριμένα, αυτά είναι, το Γενικό Πανεπιστημιακό της Αλεξανδρούπολης και το Γενικό Θεσσαλονίκης «Γεώργιος Παπανικολάου» που εδράζονται στη Βόρειο Ελλάδα (στη Θράκη και τη Μακεδονία αντίστοιχα), καθώς και τέσσερα μεγάλα Νοσοκομεία της Αττικής: το Γενικό Νοσοκομείο Αττικής «ΚΑΤ» και το Γενικό Αθηνών «Ευαγγελισμός» που εδράζονται στην Αθήνα και τα, Γενικό Κρατικό Νικαίας «Άγιος Παντελεήμων» και «Τζάννειο» Περιφερειακό Νοσοκομείο με έδρα τον Πειραιά. Στα νοσοκομεία αυτά απομονώθηκαν συνολικά 665 στελέχη *S. epidermidis* ανθεκτικά στη λινεζολίδη, από τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία 63, με κριτήριο την υψηλή αντοχή τους στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml), ενώ άλλα 18 αποτέλεσαν μία

επιμέρους συλλογή LRSE με αντοχή στη λινεζολίδη και με MICs από 8 έως 64 µg/ml.

Η συνολική κατανομή ανά έτος για κάθε ένα από τα νοσοκομεία και για την τριετία 2011-2013 φαίνεται στον πίνακα 19. Πρόκειται για έναν αριθμό απομονωθέντων στελεχών που για κάθε χρονιά και για το σύνολο των Νοσοκομείων που συμμετείχαν στη μελέτη, ξεπέρασε τις 2500, το όλον σύνολο δε και για το διάστημα της τριετίας 2011 – 2013, άγγιξε τα 8000 (συγκεκριμένα 7967) στελέχη *S.epidermidis*. Επί αυτού του αριθμού, το ποσοστό των LRSE ανήλθε συνολικά στο 8.35%.

Πίνακας 19: Διακύμανση LRSE στελεχών σε 6 ελληνικά νοσοκομεία (2011- 2013).

ΣΥΝΟΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ <i>S. epidermidis</i> (ΠΟΣΟΣΤΑ LRSE %)						
Νοσοκομείο	2011		2012		2013	
	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ
1	46 (23.9)	78 (6.4)	59 (27.1)	58 (12.2)	49 (32.6)	59 (8.5)
2	121 (8.3)	430 (2.1)	128 (20.3)	437 (3.0)	155 (18.7)	535 (2.1)
3	200 (3.0)	411 (1.7)	183 (18.6)	465 (2.6)	169 (18.9)	502 (1.6)
4	51 (35.3)	571 (6.7)	33 (18.1)	501 (9.4)	38 (31.7)	312 (9.6)
5	134 (17.9)	78 (1.3)	140 (12.2)	109 (0.9)	156 (16.7)	158 (4.4)
6	182 (23.1)	302 (3)	234 (24.0)	380 (4.0)	186 (22.6)	317 (6.0)
ΣΥΝΟΛΟ	<b>734 (15.1)</b>	<b>1870 (3.7)</b>	<b>777 (20.0)</b>	<b>1950 (4.9)</b>	<b>753 (20.9)</b>	<b>1883 (4.2)</b>

Αναλύοντας τα στοιχεία που παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα, κατά τη διάρκεια της τριετίας 2011 έως 2013 ο επιπολασμός των ανθεκτικών επιδερμικών σταφυλοκόκκων επί συνόλου επιβεβαιωμένων λοιμώξεων από επιδερμικούς σταφυλοκόκκους, στα έξι νοσοκομεία της μελέτης αυξήθηκε από το 6,9% στο 9,0% (P=0.006) με σημαντικότερη αύξηση στα περιστατικά της ΜΕΘ από 15,1% σε 20,9% (P=0.005). Μάλιστα η μεγαλύτερη επί μέρους αύξηση των περιστατικών LRSE γι' αυτή την τριετία, παρατηρήθηκε σε δύο Νοσοκομεία της μελέτης σε ασθενείς της ΜΕΘ και ήταν από 3.0% σε 18.9% και από 8.3% σε 18.7%. Ήδη από το 2011 καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά LRSE, με υψηλότερο το 35.3% σε ένα από τα νοσοκομεία της μελέτης και σε ασθενείς της ΜΕΘ, ενώ για το 2013 παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά LRSE στο σύνολο των νοσοκομείων (από 16,7% ως 32,6%). Σε ασθενείς εκτός ΜΕΘ, από το 2011 ως το 2013, παρατηρήθηκε αύξηση στα ποσοστά των



LRSE, σε τέσσερα από τα έξι νοσοκομεία (νοσοκομεία: 1, 4, 5 και 6), ενώ τα υπόλοιπα 2, διατήρησαν σταθερά τα σχετικά χαμηλά ποσοστά τους.

Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *S. epidermidis*, με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 της εταιρείας bioMerieux ενώ με τον ίδιο τρόπο και τη χρήση ειδικών για τους σταφυλοκόκκους καρτών, καθορίστηκε αρχικά και το αντιβιογράμμά τους. Με την παραπάνω διαδικασία έγινε η πρώτη επιλογή των στελεχών της συλλογής. Η ταυτοποίηση των στελεχών, επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση του προτύπου συστήματος Maldi Biotyper της εταιρείας Bruker.

Η προέλευση ειδικά των 63 στελεχών με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, όσον αφορά το είδος των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν, καθώς και την κλινική στην οποία νοσηλεύονταν οι ασθενείς, παρατίθεται αμέσως παρακάτω (πίνακες 20, 21). Είναι φανερό πως η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες βαρέως πασχόντων ασθενών, κάτι που συνάδει με την γενικότερη πρακτική για χρήση της λινεζολίδης σε σοβαρές λοιμώξεις που αφορούν ασθενείς σε σοβαρότερη κατάσταση.

Πίνακας 20: προέλευση LRSE σε σχέση με το δείγμα απομόνωσης

ΔΕΙΓΜΑ (είδος)	Απομονωθέντα δείγματα (αριθμός)
Αίμα	47
Κεντρικός Φλεβικός Καθετήρας	6
Τραύμα / πύο	7
Πλευριτικό υγρό	3
ΣΥΝΟΛΟ	63

Πίνακας 21: προέλευση LRSE σε σχέση με την κλινική νοσηλείας

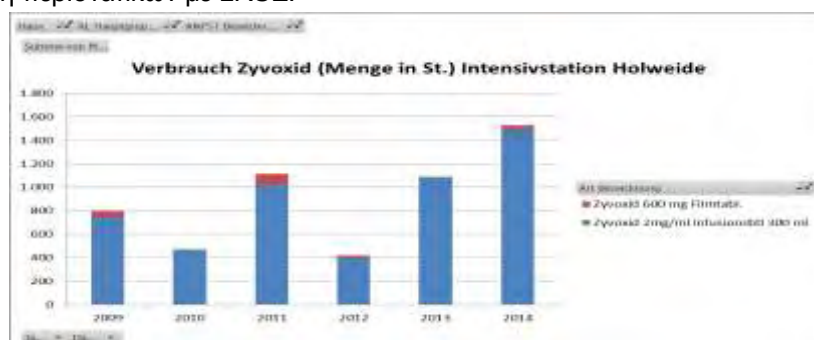
ΕΙΔΟΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ	Απομονωθέντα δείγματα (αριθμός)
ΜΕΘ	46
ΜΑΦ	4
Καρδιοχειρουργική	1
Παθολογική	4
Νευρολογική	1
Ορθοπαιδική	1
Αγγειοχειρουργική	1
Νευροχειρουργική	2
ΦΙΑ (Φυσική Ιατρική Αποκατάσταση)	3
ΣΥΝΟΛΟ	63

Μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε είναι το αν και για πόσο χρονικό διάστημα εφαρμόστηκε θεραπεία με λινεζολίδη στον ασθενή πριν την απομόνωση του LRSE. Από τα ιστορικά των ασθενών της Ελληνικής συλλογής φαίνεται ότι από τους 81 οι 69 (85,2%), δέχτηκαν μακροχρόνια θεραπεία με λινεζολίδη από 3 έως και 28 ημέρες με μέσο όρο ημερών χορήγησης 16,25 ημέρες.

Το συμπέρασμα που σαφώς προκύπτει είναι ότι η χορήγηση λινεζολίδης για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα, επάγει την ανάπτυξη αντοχής της στους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους. Από την άλλη, η απομόνωση στελεχών ανθεκτικών στη λινεζολίδη σε κάποιους ασθενείς που δεν τέθηκαν σε αγωγή με λινεζολίδη, αναδεικνύει και τη διασπορά αυτών των στελεχών από ασθενή σε ασθενή μέσα στα νοσηλευτικά ιδρύματα.

Η δεύτερη συλλογή της μελέτης, αποτελούνταν από 14 στελέχη επιδερμικών σταφυλοκόκκων με αντοχή στη λινεζολίδη που απομονώθηκαν από 5 διαφορετικά και απομακρυσμένα μεταξύ τους Νοσοκομεία της Γερμανίας από το 2012 ως το 2014. Από αυτά, τα 11 παρουσίαζαν υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml) ενώ τα υπόλοιπα 3 χαμηλή αντοχή, με MICs 8, 12 και 16 µg/ml. Ένα πολύ ενδιαφέρον στοιχείο, αποτελεί το γεγονός ότι από τα παραπάνω περιστατικά, τα 6 απομονώθηκαν από το ίδιο Νοσοκομείο σε μία περίοδο έξαρσης λοιμώξεων με LRSE (29 απομονωθέντα στελέχη σε 2 ΜΕΘ και για διάστημα 14 μηνών από τον Νοέμβριο του 2013 έως το Δεκέμβριο 2014) αμέσως μετά την εφαρμογή μίας 12μηνιας πολιτικής αύξησης της κατανάλωσης λινεζολίδης προκειμένου να αντιμετωπιστεί προηγηθείσα έξαρση περιστατικών με MRSA (εικόνα 23).

Εικόνα 23: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανάλωσης λινεζολίδης σε Νοσοκομείο της Γερμανίας. Η αύξηση για τα έτη 2013 και 2014 μετά από έξαρση MRSA λοιμώξεων, οδήγησε στην αύξηση περιστατικών με LRSE.



Το παραπάνω γεγονός και πάλι αναδεικνύει τη συσχέτιση της ανάπτυξης ανθεκτικών στη λινεζολίδη επιδερμικών σταφυλοκόκκων, με την αυξημένη χρήση της στη θεραπευτική.

Τέλος μία τρίτη συλλογή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας αποτελούνταν από 9 στελέχη επιδερμικών σταφυλοκόκκων ανθεκτικών στη λινεζολίδη, που απομονώθηκαν σε Ιταλικά νοσοκομεία της περιοχής της Τοσκάνης. Κανένα από τα στελέχη αυτά δεν παρουσίαζε υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη και οι MICs τους κυμαίνονταν από 8 έως 64 µg/ml. Για τα παραπάνω στελέχη δεν κατέστη δυνατόν να ανακτηθούν στοιχεία σχετικά με τη χρήση ή μη της λινεζολίδης ως θεραπεία στους ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν.

## **V.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MIC ΣΕ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ, ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ, ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗ, ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ ΚΑΙ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ E-TEST ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (ΓΙΑ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ)**

Στο σύνολο των στελεχών της συλλογής από τα ελληνικά νοσοκομεία καθορίστηκε με τη μέθοδο του E-test σε Mueller Hinton agar, η MIC τόσο στη λινεζολίδη, όσο και σε άλλα τέσσερα αντιβιοτικά: τη βανκομυκίνη, την κλινδαμυκίνη την ερυθρομυκίνη και τη χλωραμφενικόλη. Η εικόνα 24 είναι ενδεικτική ενός E-test στελέχους επιδερμικού σταφυλοκόκκου με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη (MIC:>256µg/dl).

Ειδικά για τη λινεζολίδη, η MIC καθορίστηκε επιπλέον με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε Mueller Hinton agar. Αυτό έγινε προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα του Vitek 2 και των E-test.

Σε γενικές γραμμές δεν υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα των τριών μεθόδων, ενώ όσες – ελάχιστες – παρατηρήθηκαν, δεν ξεπέρασαν την μία τάξη μεγέθους. Στην περίπτωση καθορισμού της MIC με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και για τα στελέχη υψηλής αντοχής, δεν παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης σε κανένα τρυβλίο ακόμη και στη συγκέντρωση των 512 µg/dl. Αυτό συνεπάγεται ότι δεν είναι δυνατός ο

ακριβής προσδιορισμός αυτής, αν και το αποτέλεσμα επικαλύπτεται από εκείνο των άλλων μεθόδων και επομένως απλά καταγράφεται αλλά δεν διαφοροποιεί ουσιαστικά την τελική εικόνα.

Εικόνα 24: Καθορισμός, των MICs επιδερμικού σταφυλοκόκκου σε λινεζολίδη, με E-test σε Mueller Hinton agar.



Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακες παρακάτω. Αρχικά και ανά νοσοκομείο, φαίνονται εκείνα που αφορούν στελέχη με υψηλή αντοχή, ενώ στη συνέχεια σε ένα πίνακα τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη. Σε όλους τους πίνακες και σε δεξιά στήλη, παρατίθενται τα αποτελέσματα της MIC για τη λινεζολίδη, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε άγαρ.

Πίνακας 22: MICs για τα στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη από το Ελληνικό Νοσοκομείο 1

Αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	Στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
1	1	1029	>256	1.0	>8	27	>256	>512
2		1750	>256	2.0	>8	26	>256	>512
3		6786	>256	1.5	>8	34	>256	>512
4		7110	>256	2.0	>8	36	>256	>512
5		7123	>256	1.0	>8	33	>256	>512
6		7164	>256	2.0	>8	37	>256	>512
7		11193	>256	1.5	>8	25	>256	>512
8		16543	>256	1.5	>8	25	>256	>512
9		16798	>256	2.0	>8	25	>256	>512
10		17245	>256	1.5	>8	23	>256	>512
11		18471	>256	1.0	>8	30	8	>512

Πίνακας 23: MICs για τα στελέχη του Νοσοκομείου 2 με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη

αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
12	2	320/5245	>256	2.0	>8	1	>256	>512
13		480/5264	>256	1.0	>8	>8	>256	>512
14		752/5453	>256	1.0	>8	1	>256	>512
15		758/5452	>256	1.0	>8	>8	>256	>512
16		760/5451	>256	2.0	>8	>8	>256	>512
17		989/5320	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
18		1130/5328	>256	1.0	>8	26	>256	>512
19		835	>256	2.0	>8	34	>256	>512

Πίνακας 24: MICs για τα στελέχη του Νοσοκομείου 3 με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη

αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
20	3	EY-1	>256	1.5	>8	2.0	>256	>512
21		EY-2	>256	3	>8	>8	>256	>512
22		EY-3	>256	2	>8	>4	>256	>512
23		EY-42	>256	2	>8	>8	>256	>512
24		EY-5	>256	2	>8	>8	>256	>512
25		EY-6	>256	2	>8	>8	>256	>512
26		EY-7	>256	1.5	>8	>8	>256	>512

Πίνακας 25: MICs για τα στελέχη του Νοσοκομείου 4 με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη

αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
27	4	21700	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
28		15425	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
29		6031	>256	2	>8	>8	>256	>512
30		3784	>256	1	>8	>8	>256	>512
31		A9360	>256	2	>8	>8	>256	>512
32		A7542	>256	2	>8	>8	>256	>512
33		A628	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
34		A188	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
35		A162	>256	2	>8	>8	>256	>512
36		A2523	>256	2	>8	>8	>256	>512

Πίνακας 26: MICs για τα στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη από το Ελληνικό Νοσοκομείο 5

αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
37	5	203	>256	1	>8	>8	>256	>512
38		195	>256	2	>8	>8	>256	>512
39		190	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
40		173	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
41		163	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
42		161	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
43		149	>256	1.5	0.5	0.5	>256	>512
44		241	>256	2.0	>8	>8	>256	>512
45		468	>256	2.0	0.5	0.5	>256	>512
46		641	>256	0.5	>8	>8	4	>512
47		674	>256	0.5	>8	0.5	>256	>512
48		713	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
49		736	>256	0.25	>8	>8	>256	>512
50		570-A	>256	1.0	>8	>8	>256	>512
51		570-B	>256	1.0	>8	>8	>256	>512
52		624	>256	1.0	>8	>8	>256	>512
53		3695	>256	2	>8	>8	>256	>512
54		153	>256	1.0	>8	>8	>256	>512

Πίνακας 27: MICs για τα στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη από το Ελληνικό Νοσοκομείο 6

αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test								αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
55	6	2114518	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
56		2108749	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
57		1866680	>256	1	>8	>8	>256	>512
58		1865685	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
59		2187901	>256	1	>8	>8	>256	>512
60		1853800	>256	1	>8	>8	>256	>512
61		1855287	>256	1	>8	>8	>256	>512
62		1694209	>256	1	>8	>8	>256	>512
63		2014573	>256	1	>8	>8	>256	>512

Πίνακας 28: MICs για τα στελέχη με χαμηλή αντοχή στη λινεζολίδη στο σύνολο των Ελληνικών Νοσοκομείων

α/α	νοσοκομείο	στέλεχος	αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test					αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
			MICs					
			LZD	VAN	CM	E	CHL	
1	2	794/5305	24	1.0	>8	>8	>256	32
2	2	1356/5336	24	1.0	>8	>8	>256	32
3	2	1385/5388	64	1.5	>8	>8	>256	128
4	2	351	96	1.5	>8	>8	>256	128
5	2	399/5247	32	1.0	>8	>8	>256	32
6	2	445/5248	24	1.0	>8	>8	64	32
7	2	1991/5388	96	1.0	>8	>8	>256	128
8	2	1548/5373	48	1.0	>8	>8	>256	64
9	5	808	64	2.0	>8	>8	>256	64
10	5	128	8	1	>8	>8	>256	16
11	1	12717	4	1.0	>8	>8	64	8
12	3	EY-17	32	1	>8	>8	>256	32
13	4	571	32	1	>8	>8	>256	32
14	4	965	48	0.5	>8	>8	>256	64
15	4	633	32	1	4	0.5	4	32
16	4	907	64	1	>8	>8	>256	64
17	5	2187901	12	1	>8	>8	>256	12
18	5	1855427	64	1	>8	>8	>256	64

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα Γερμανικά και τα Ιταλικά στελέχη αντιστοίχως παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες

Πίνακας 29: Προσδιορισμός της MIC των στελεχών από τα Γερμανικά Νοσοκομεία

α/α	στέλεχος	αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των E-test					αποτελέσματα MIC σε λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
		LZD	VAN	CM	E	CHL	
1	13-01084	>256	1.5	>8	2.0	>256	>512
2	12-03723	>256	1	>8	>8	>256	>512
3	13-04707	>256	1	>8	>8	>256	>512
4	14-00183	8	1	>8	>8	>256	8
5	14-01514	>256	1	>8	>8	>256	>512
6	14-02427	>256	0.5	>8	>8	>256	>512
7	14-03576	>256	1	>8	>8	>256	>512
8	14-03623	12	2	>8	>8	>256	16
9	12-00322	16	1.5	>8	>8	>256	16
10	12-01569	>256	1.5	>8	>8	>256	>512
11	12-02439	>256	1	>8	>8	>256	>512
12	12-03718	>256	1	>8	>8	>256	>512
13	13-00905	>256	1	>8	>8	>256	>512
14	13-01045	>256	2	>8	>8	>256	>512

Πίνακας 30: Προσδιορισμός της MIC των στελεχών από την Ιταλία

α/α	στέλεχος	αποτελέσματα καθορισμού MICs με τη μέθοδο των e-test					αποτελέσματα MIC σε λινεζολιδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων
		LZD	VAN	CM	E	CHL	
1	FI-2	32	3	0.25	>8	>256	32
2	FI-3	32	2	0.5	>8	>256	32
3	FI-4	64	4	>8	>8	>256	64
4	FI-5	32	1	0.25	>8	>256	32
5	FI-6	16	0.5	0.25	>8	>256	16
6	FI-8	32	2	0.5	>8	>256	32
7	FI-9	8	2	>8	>8	>256	16
8	FI-10	32	2	0.25	>8	>256	32
9	FI-11	32	1	0.25	>8	>256	32

### V.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ

#### V.3.1 ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (“GROWTH CURVES”)

Το φαινόμενο της εξάρτησης μελετήθηκε με καμπύλες ανάπτυξης σε Mueller Hinton broth απουσία και παρουσία λινεζολιδης. Καταγράφηκε η ανάπτυξη των στελεχών σε υγρά καλλιεργητικά υλικά με συγκεντρώσεις λινεζολιδης 0, 16 και 32 µg/ml και ανά 12ωρο για ένα 48ωρο, μετρημένη με θολοσιμετρική μέθοδο σε μονάδες της πρότυπης κλίμακας MacFarland.

Ενδεικτικά, παρουσιάζεται καταγεγραμμένη σε πίνακα (πίνακας 31), η χαρακτηριστική εικόνα ανάπτυξης ενός στελέχους *S. epidermidis* που παρουσιάζει το φαινόμενο της επιτάχυνσης της ανάπτυξης του παρουσία λινεζολιδης. Το φαινόμενο αρχίζει να εμφανίζεται από το πρώτο 12ωρο της επώασης και σαφώς παρατηρείται από τις 24 ώρες και μετά (πίνακας 31). Οι τιμές αναφέρονται σε MacFarlands και οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια διαπιστευμένου θολοσιμέτρου. Το φαινόμενο εξετάστηκε εις τριπλούν



προκειμένου να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα του φαινομένου και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές.

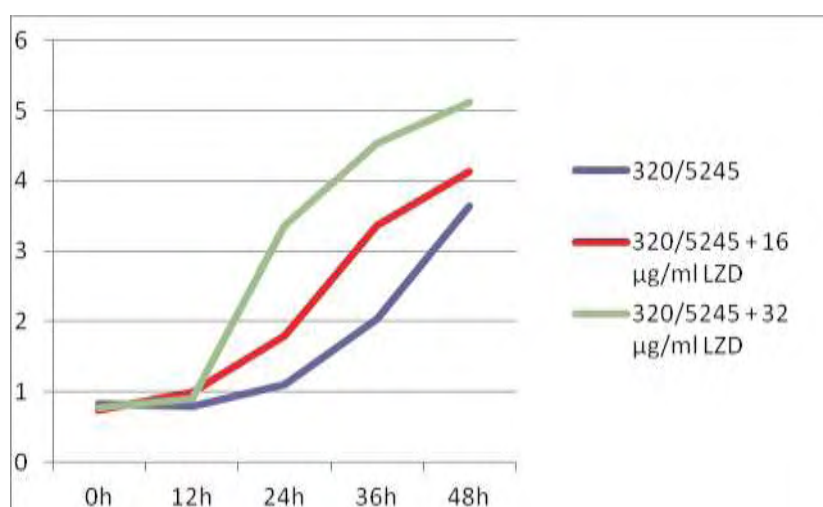
Πίνακας 31: Καταγραφή της επιταχυνόμενης ανάπτυξης ενός στελέχους LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, παρουσία του αντιβιοτικού. Οι τιμές αναφέρονται σε κλίμακα MacFarland. Με "bold" καταγράφονται οι μέσες τιμές.

α/α στελέχους	0h	12h	24h	36h	48h
320/5245 (1)	1	0,9	1	1,3	3,2
320/5245 (2)	0,8	0,8	1,2	2,5	4,1
320/5245 (3)	0,7	0,7	1,1	2,3	3,6
<b>320/5245</b>	<b>0,8333</b>	<b>0,8</b>	<b>1,1</b>	<b>2,0333</b>	<b>3,6333</b>
320/5245 (1) + 16 µg/ml LZD	0,8	1	1,9	3,6	4,2
320/5245 (2) + 16 µg/ml LZD	0,6	0,8	1,8	3,3	3,8
320/5245 (3) + 16 µg/ml LZD	0,8	0,9	1,7	3,2	4,4
<b>320/5245 + 16 µg/ml LZD</b>	<b>0,7333</b>	<b>0,9</b>	<b>1,8</b>	<b>3,366</b>	<b>4,1333</b>
320/5245 (1) + 32 µg/ml LZD	0,8	1,2	3,5	4,7	5,5
320/5245 (2) + 32 µg/ml LZD	0,7	0,8	3	4	5
320/5245 (3) + 32 µg/ml LZD	0,8	1	3,6	4,9	5,6
<b>320/5245 + 32 µg/ml LZD</b>	<b>0,7666</b>	<b>1</b>	<b>3,3666</b>	<b>4,5333</b>	<b>5,3666</b>
blank (1)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
blank (2)	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
blank (3)	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
<b>blank</b>	<b>0,7666</b>	<b>0,7666</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7666</b>	<b>0,8</b>

Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε για τις 12, τις 24, τις 36 και 48 ώρες και για την συγκέντρωση των 16 και 32 µg/dl σε σχέση με την ανάπτυξη σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη. Τα αποτελέσματα ( $P < 0.05$ ) καταδεικνύουν την στατιστικά σημαντική επιτάχυνση της ανάπτυξης του στελέχους παρουσία λινεζολίδης στη συγκέντρωση των 16 µg/dl ήδη από τις 24 ώρες ανάπτυξης παρατηρείται δε εντονότερο, για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της λινεζολίδης (32 µg/dl). Η παραπάνω παρατήρηση, αποδεικνύει πως το υπό μελέτη στέλεχος, παρουσιάζει εξάρτηση από την λινεζολίδη.

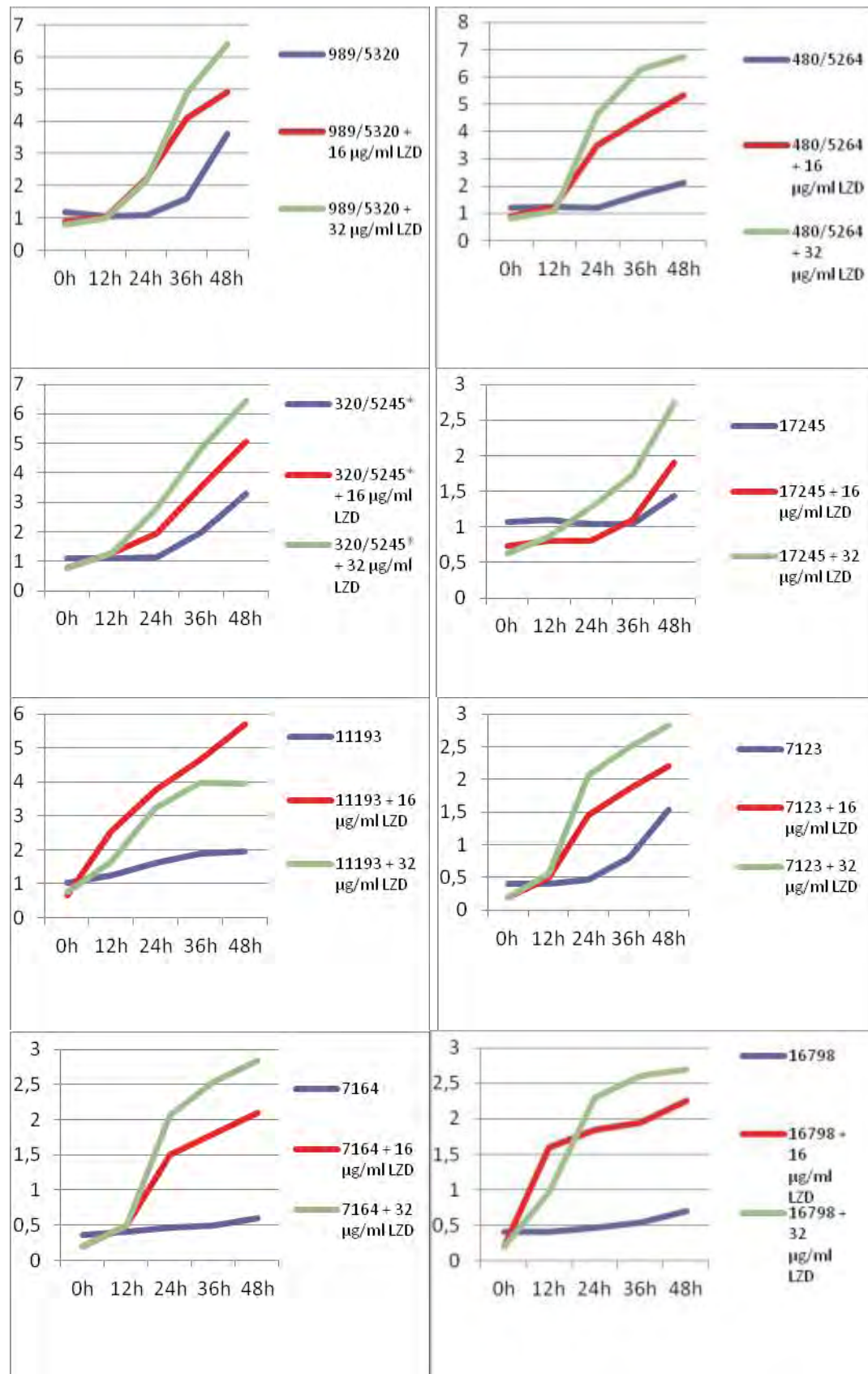
Η απεικόνιση του φαινομένου σε καμπύλες ανάπτυξης ("growth curves") παρουσιάζεται στην εικόνα 24.

Εικόνα 25: Καμπύλες ανάπτυξης ενδεικτικού στελέχους *S. epidermidis* με εξάρτηση από τη λινεζολίδη (linezolid-dependent).

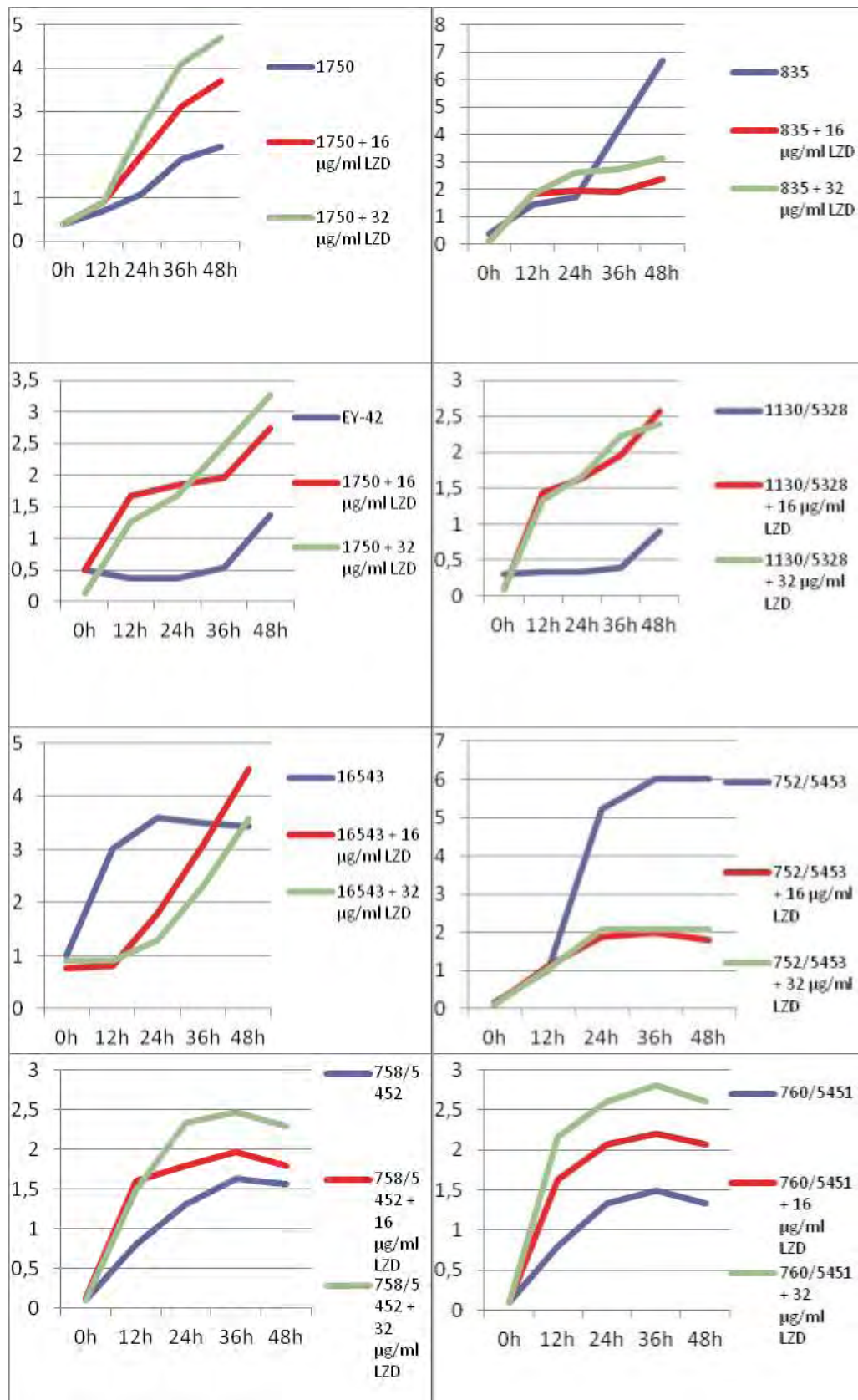


Οι καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά στις σελίδες που ακολουθούν:

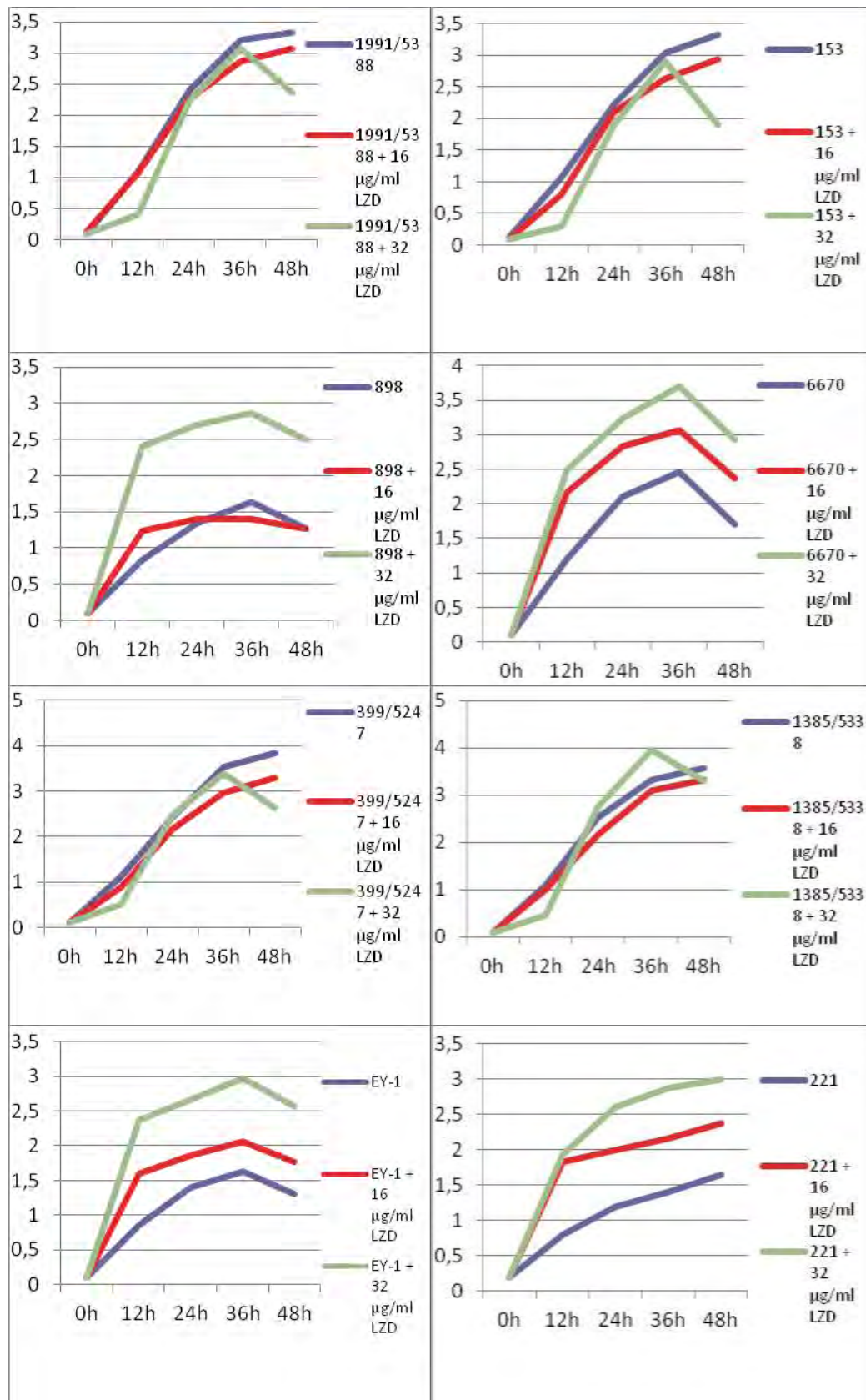
A.



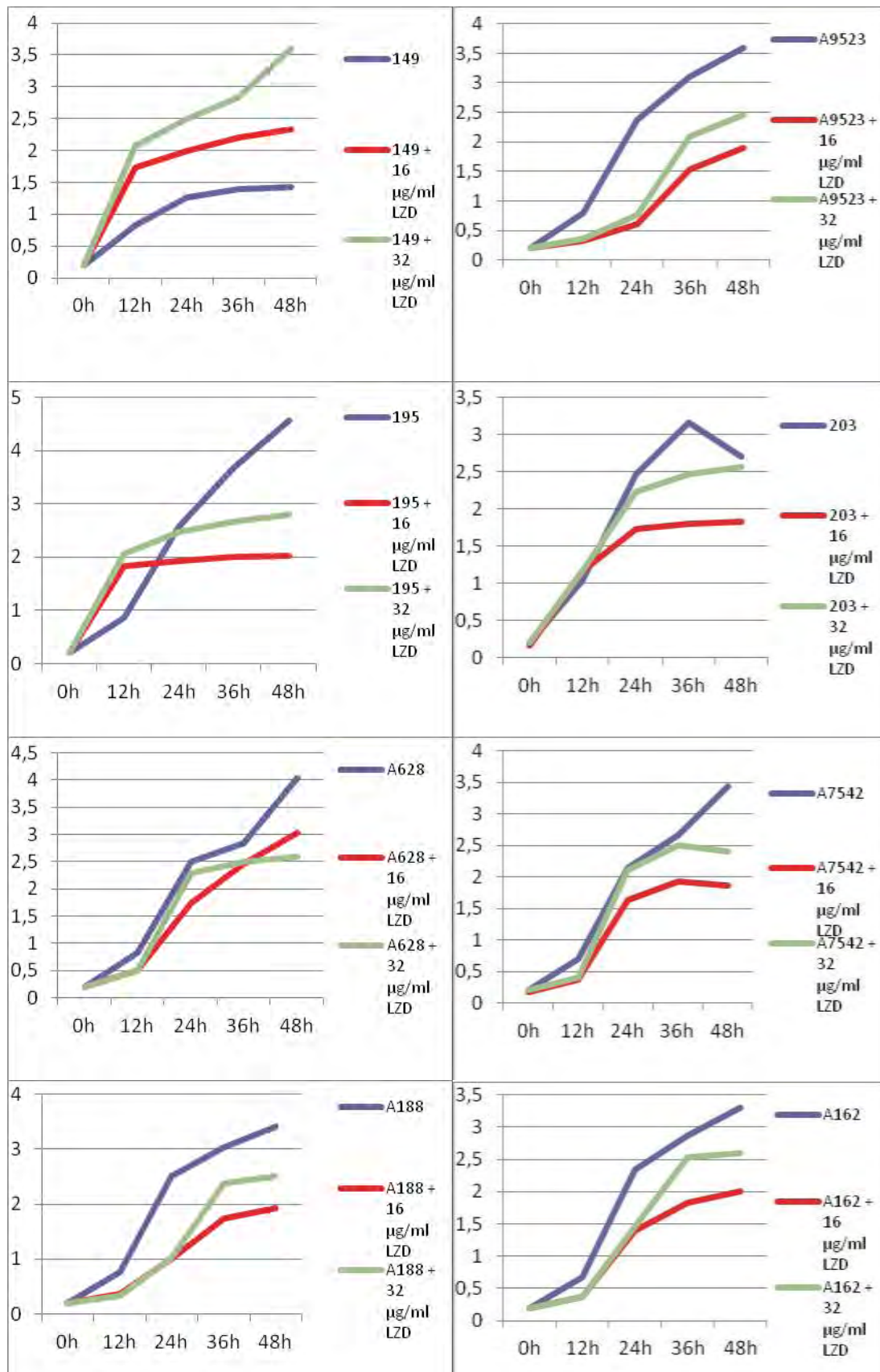
B.



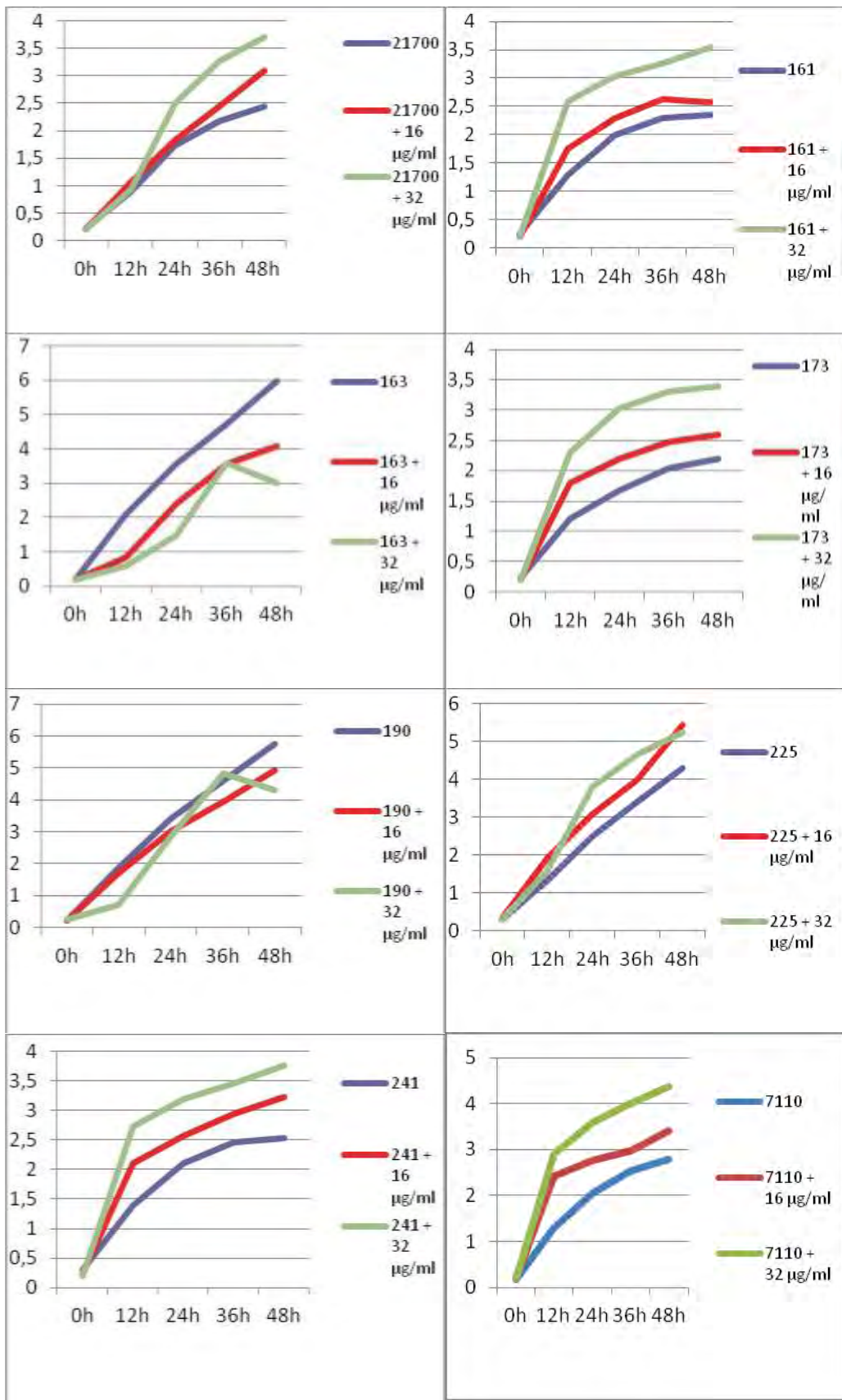
Γ.



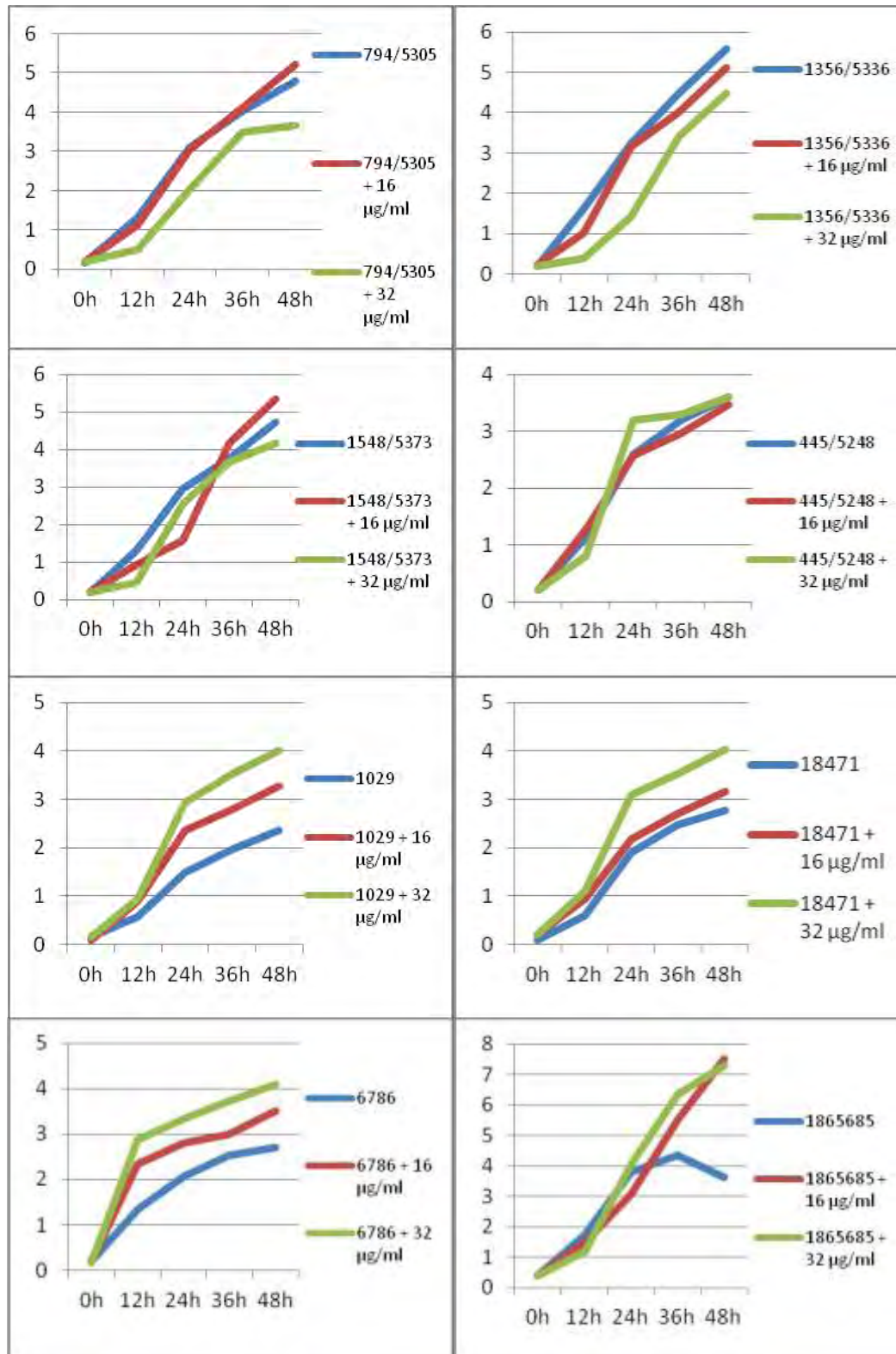
Δ.



E.

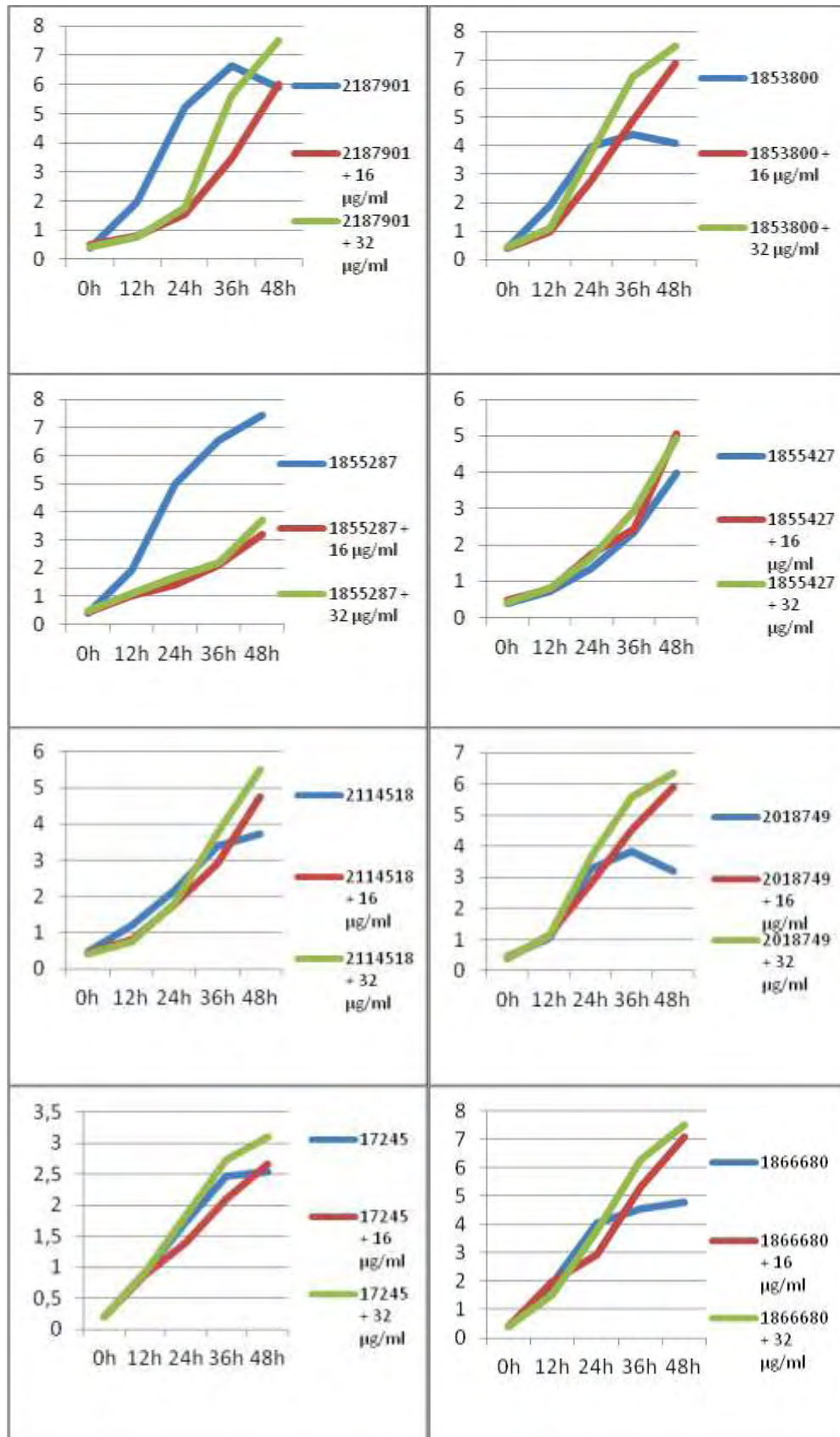


Z.

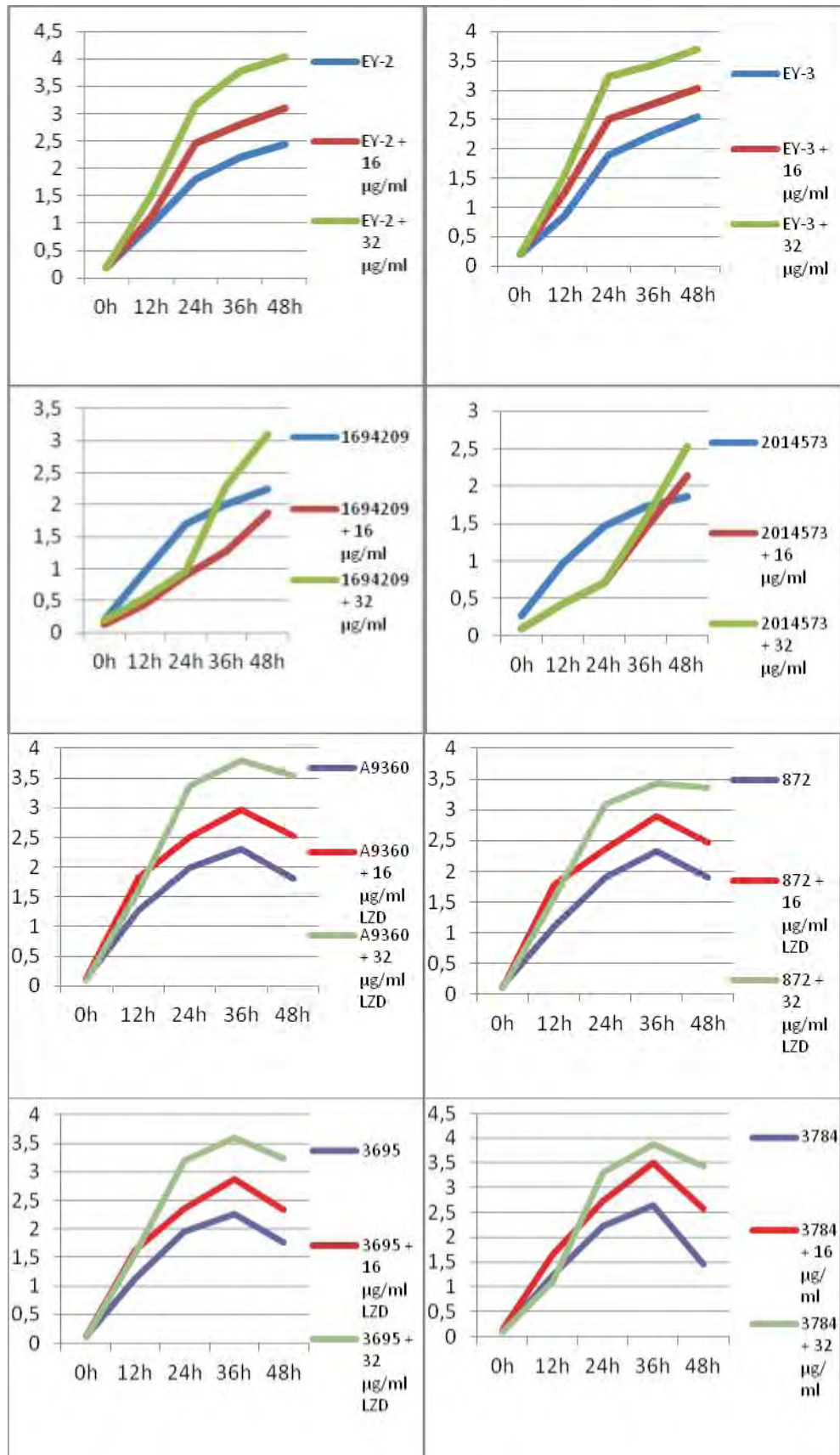




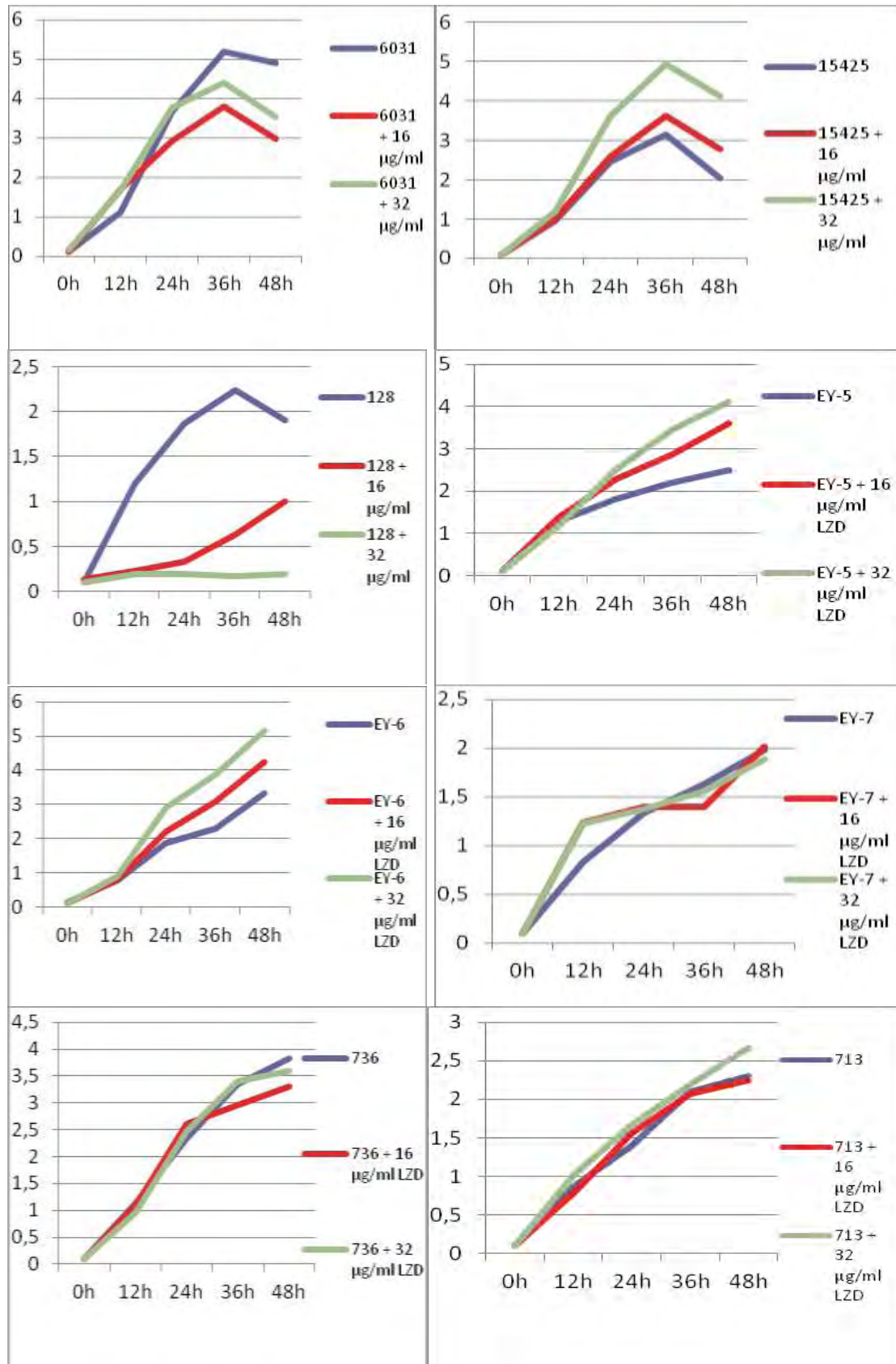
H.



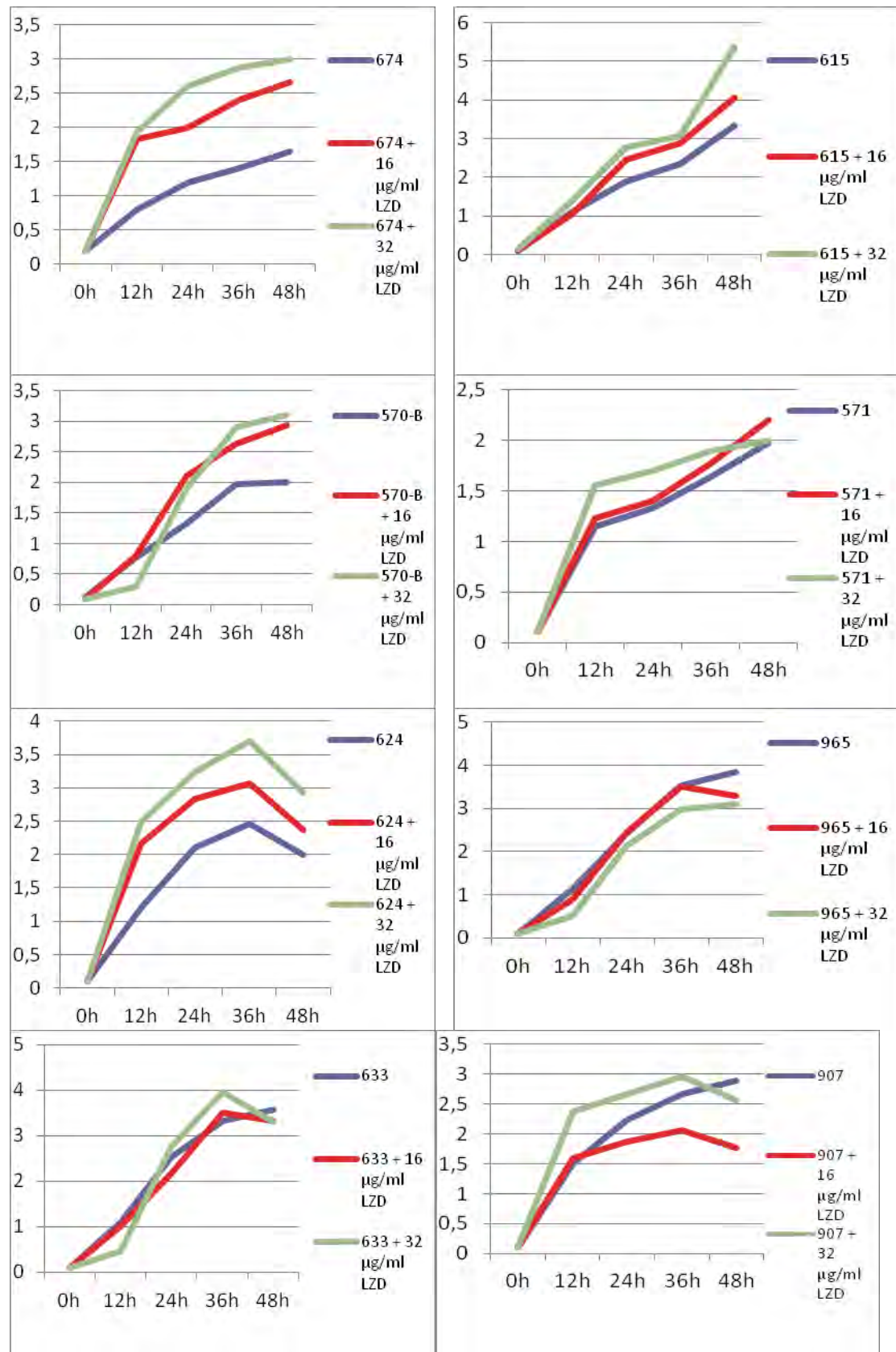
Θ.



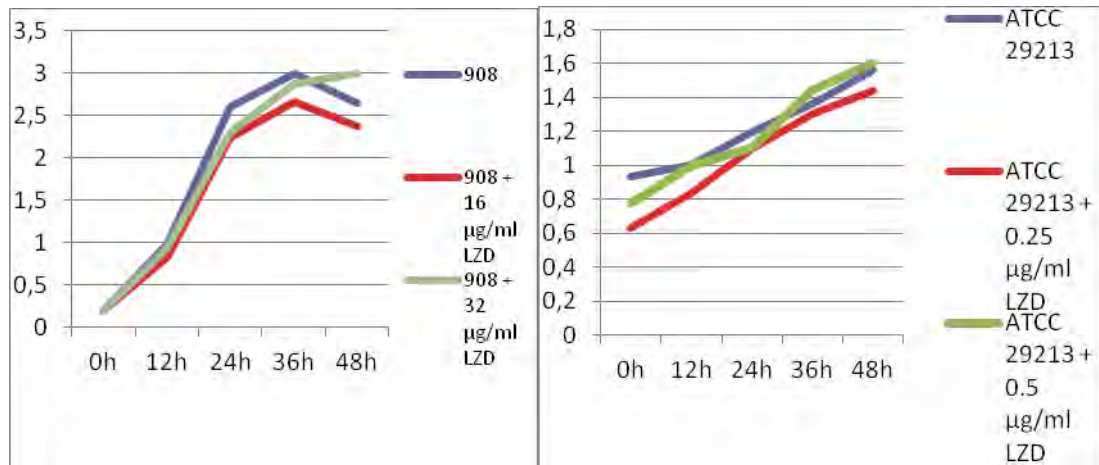
I.



Κ.

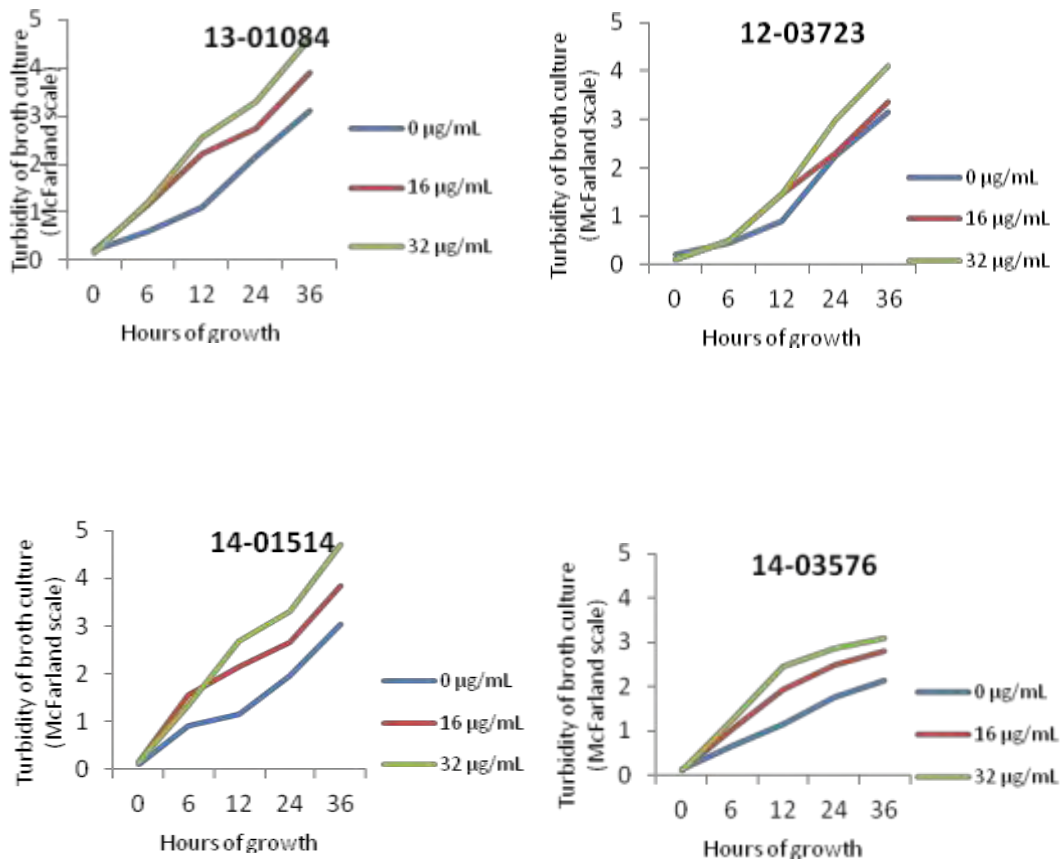


Α.

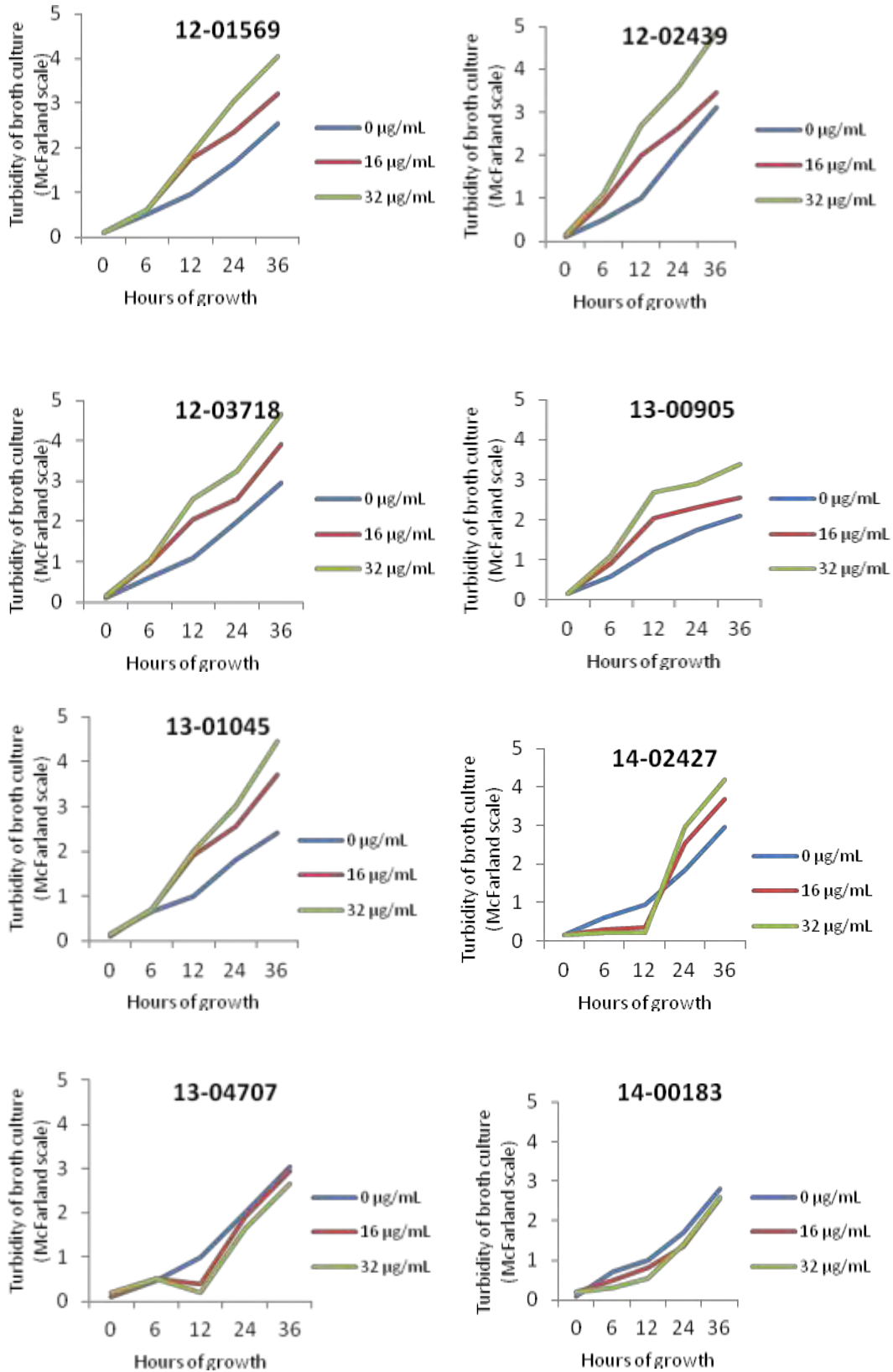


Για τα στελέχη από τη Γερμανία, οι καμπύλες ανάπτυξης παρατίθενται παρακάτω:

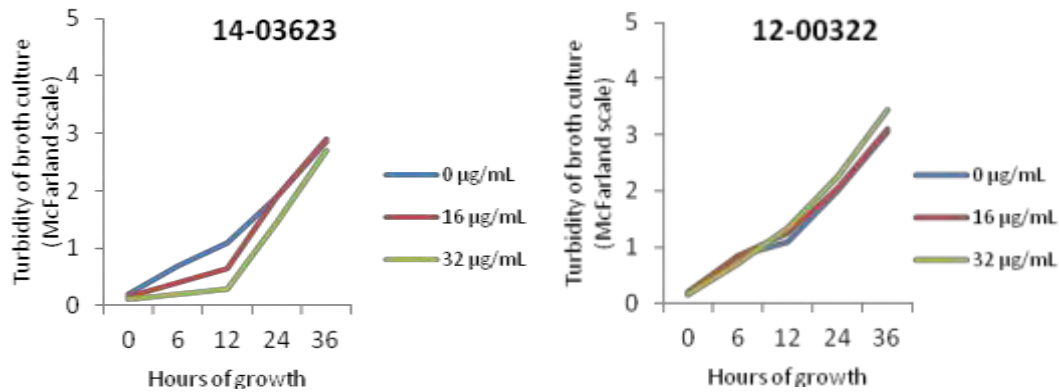
Α.



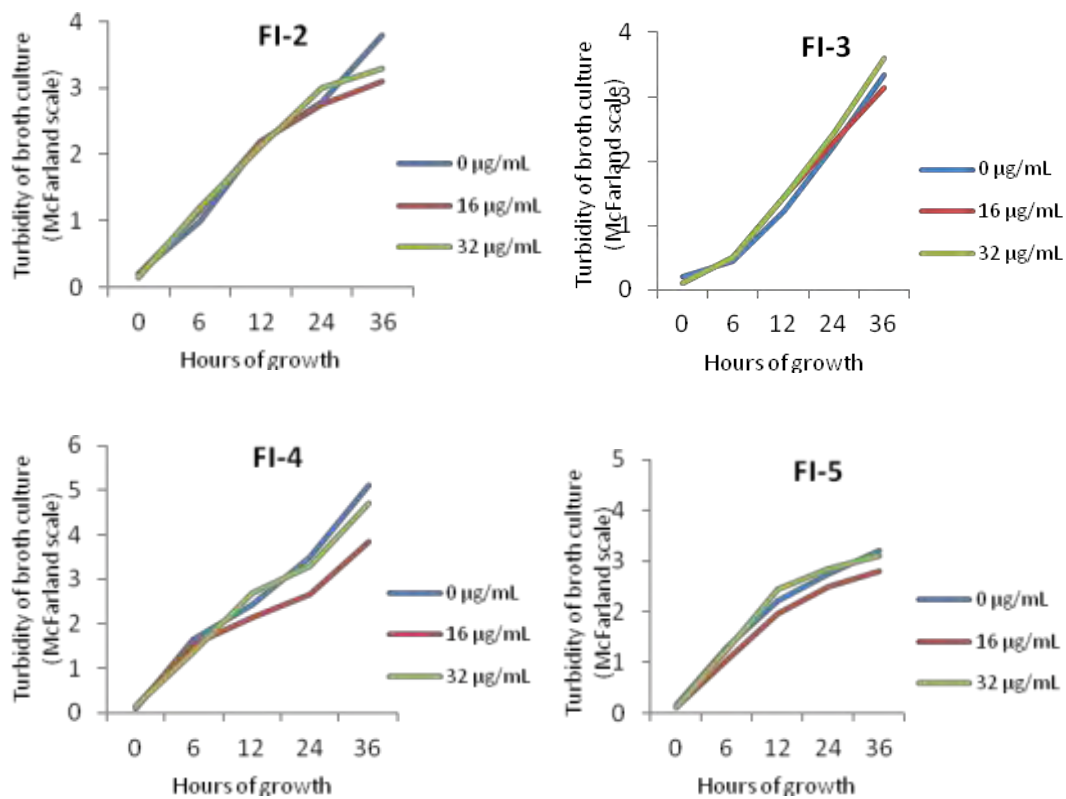
B.

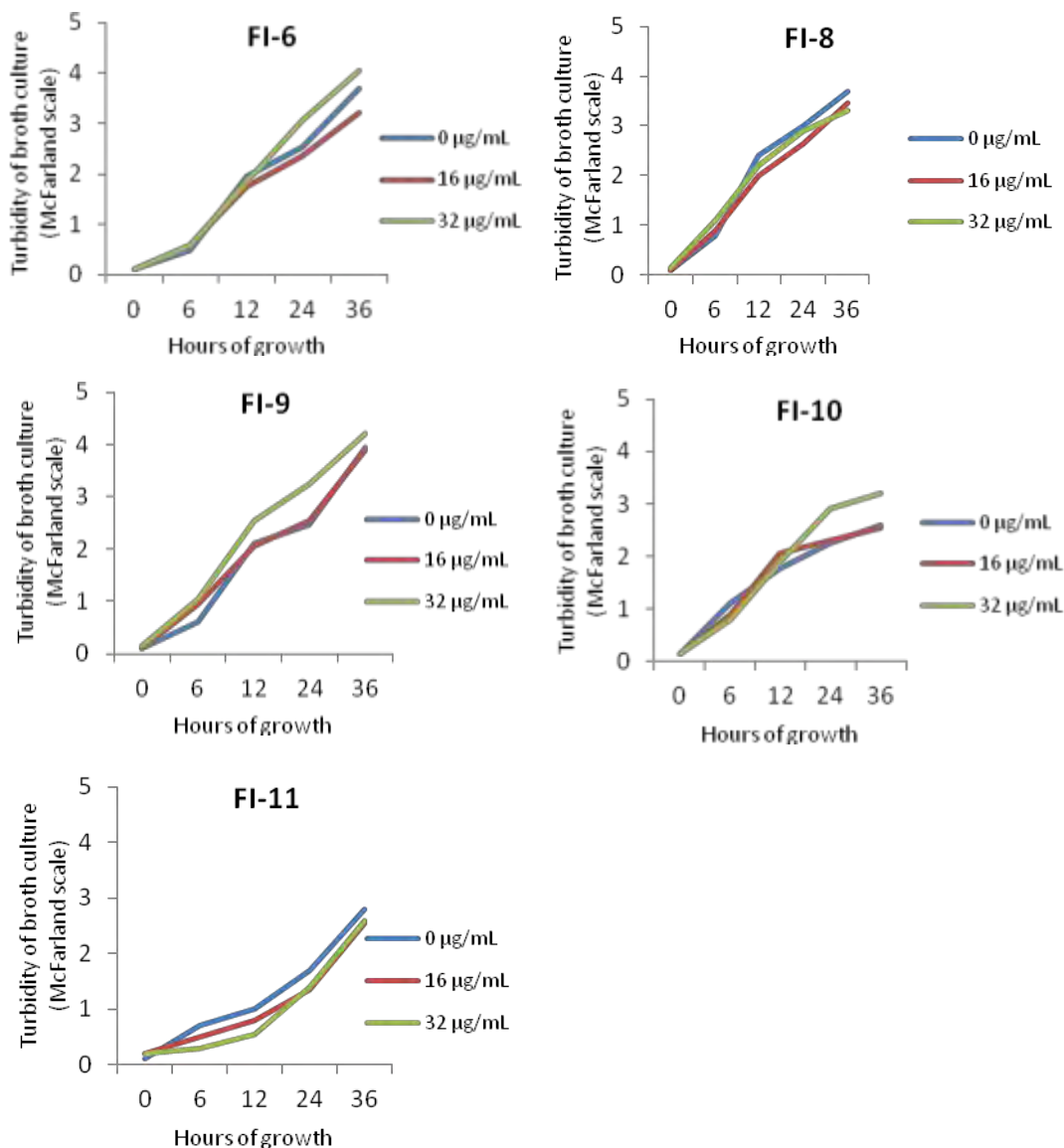


Γ.



Τέλος, τα αποτελέσματα των καμπυλών ανάπτυξης των Ιταλικών στελεχών είναι όπως παρακάτω:





Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, από τα 81 συνολικά ελληνικά στελέχη με αντοχή στη λινεζολίδη, το φαινόμενο της εξάρτησης παρουσιάζουν 47 στελέχη (58.0%). Τα στελέχη αυτά, εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική αύξηση της ανάπτυξής τους ( $P < 0.05$ ) από τις 24 ώρες επώασης και μετά, τόσο στη συγκέντρωση των 16 όσο και σε εκείνη των 32 µg/ml λινεζολίδης. Μάλιστα αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στη συγκέντρωση των 32 µg/ml σε σχέση με εκείνη των 16 µg/ml. Όλα αυτά τα στελέχη αφορούσαν LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη ( $MIC > 256$  µg/ml). Αντιθέτως, στα υπόλοιπα 34 στελέχη, εκ των οποίων και 16 με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, δεν παρατηρείται διαφοροποίηση του ρυθμού ανάπτυξης παρουσία λινεζολίδης. Τα



αποτελέσματα ανά νοσοκομείο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 32).

Πίνακας 32: Ποσοστά λινεζολίδη εξαρτημένων LRSE ανά Νοσοκομείο μελέτης

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΣΤΕΛΕΧΗ LRSE που μελετήθηκαν	Linezolid-Dependent/Non-Dependent	ΠΟΣΟΣΤΟ Linezolid-Dependent
ΚΑΤ	11	10/1	90.9%
ΤΖΑΝΝΕΙΟ	17	8/9	47.0%
ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ	7	6/1	85.7%
ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ	12	6/6	50.0%
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗΣ	10	5/5	50.0%
ΓΕΝ.ΚΡΑΤ. ΝΙΚΑΙΑΣ «ΑΓ. ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ»	24	12/12	50.0%
<b>Σ Υ Ν Ο Λ Ο</b>	<b>81</b>	<b>47/34</b>	<b>58%</b>

Μία πολύ σημαντική λοιπόν παρατήρηση κατά τη μελέτη των αποτελεσμάτων των πειραμάτων, είναι ότι το φαινόμενο της εξάρτησης από τη λινεζολίδη παρουσίασαν μόνο, στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (LZD MIC: >256 µg/dl). Κανένας από τους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους με χαμηλού επιπέδου αντοχή δεν παρουσίασε εξάρτηση. Μάλιστα, αυτό επιβεβαιώνεται και στη μελέτη των στελεχών από τη Γερμανία και την Ιταλία.

Απομονώνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης μόνο στα στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, το ποσοστό των εξαρτημένων στελεχών στην ελληνική συλλογή ανέρχεται στα 74,6%, παρατηρούμενο σε 47 από τα 63 στελέχη LRSE.

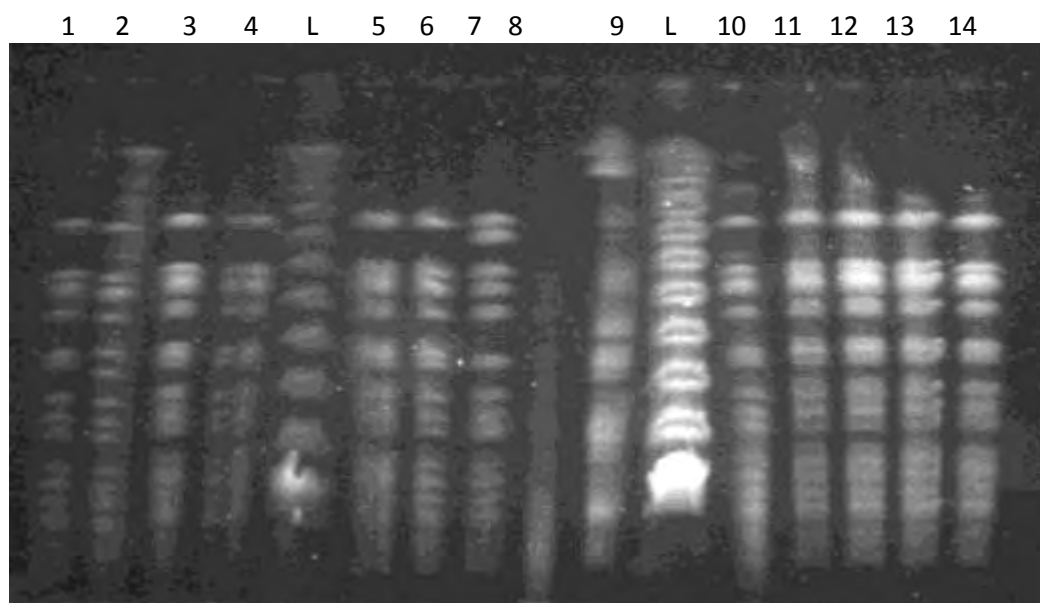
Όσον αφορά στα στελέχη της Γερμανικής συλλογής, το φαινόμενο της εξάρτησης παρατηρήθηκε σε 10 από το σύνολο των 14. Τέσσερα στελέχη ήταν σαφώς μη εξαρτώμενα από τη λινεζολίδη, ενώ 1/10 εξαρτώμενα στελέχη παρουσίαζε συμπεριφορά εξαρτημένου στελέχους μετά το πρώτο 12ωρο της ανάπτυξης. Σημειώνεται ότι από τα στελέχη της γερμανικής συλλογής, 11 παρουσίαζαν υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC: > 256 µg/ml) και από αυτά τα 9 ήταν σαφώς εξαρτημένα από τη λινεζολίδη (81,8%).

Τέλος, σε ότι αφορά στα ιταλικά στελέχη, αφού μελετήθηκαν, κανένα τους δεν παρουσίαζε το φαινόμενο της εξάρτησης. Δεδομένου ότι, οι MICs των συγκεκριμένων στελεχών είχαν τιμές από 64 µg/ml και κάτω, χαρακτηρίζονται δηλαδή ως ενδιάμεση και χαμηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη, τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την παρατήρηση ότι η εξάρτηση αφορά σαν φαινόμενο μόνο LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη.

#### Ν.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE) ΚΑΙ ΜΕ MLST ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

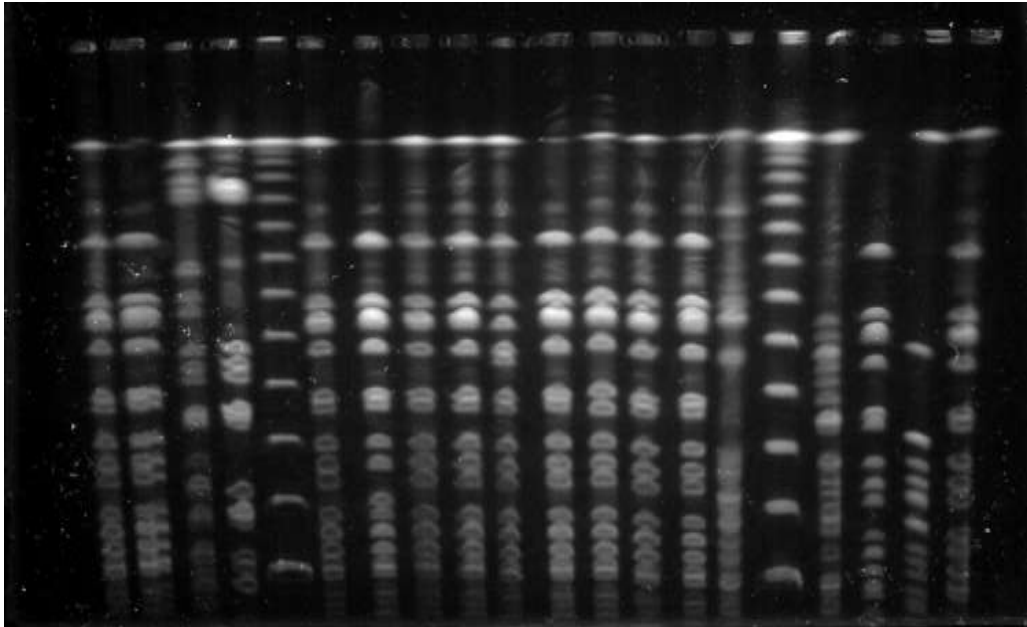
Προκειμένου να ελεγχθεί μοριακά η επιδημιολογική συσχέτιση των ανθεκτικών στην λινεζολίδη επιδερμικών σταφυλοκόκκων που παρουσίαζαν το φαινόμενο της εξάρτησης χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE). Τα ηλεκτροφορήματα παρουσιάζονται αμέσως παρακάτω και αφορούν τα 63 στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη.

Εικόνα 26: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα: 1:6786, 2:11193, 3:7164, 4:1750, 5:320/5245, 6:989/5320, 7:1130/5328, 8:835, 9:480/5264, 10:A9360, 11:A7542, 12:A628, 13:A188, 14:A162, L: ladder



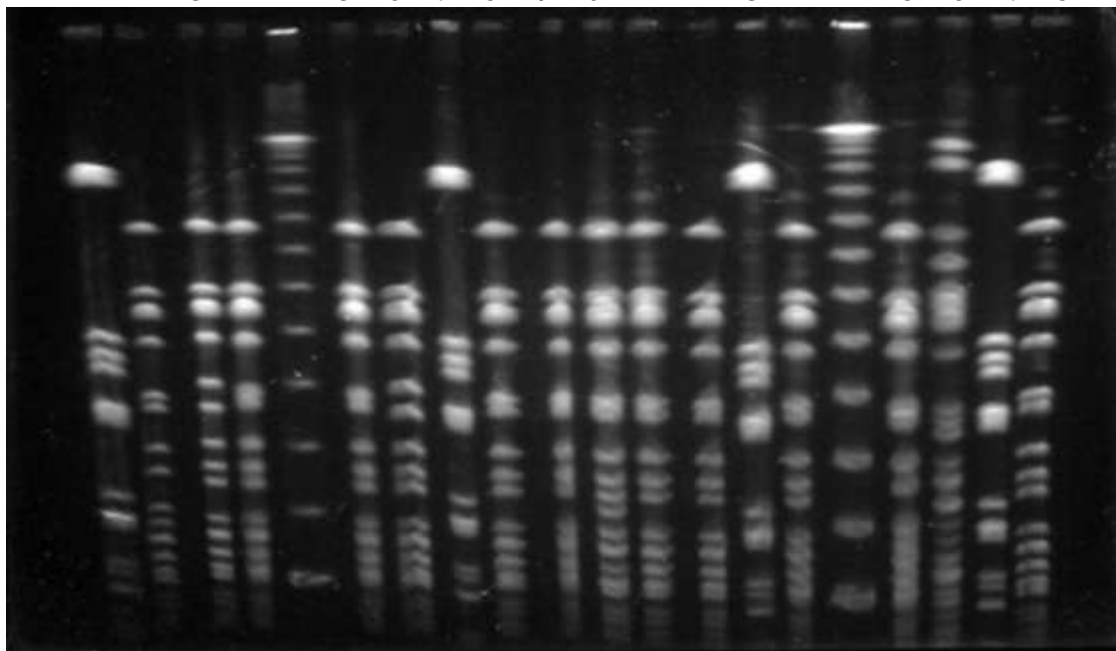
Εικόνα 27: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα: 1:7123, 2:7110, 3:794/5305, 4:1356/5336, 5:EY-1, 6:EY-2, 7:21700, 8:15425, 9:6031, 10:A9523, 11:203, 12:2114518, 13:2108749, 14:1885257, 15:2187901, 16:468, 17:641, 18:674, L: ladder

1 2 3 4 L 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 L 15 16 17 18

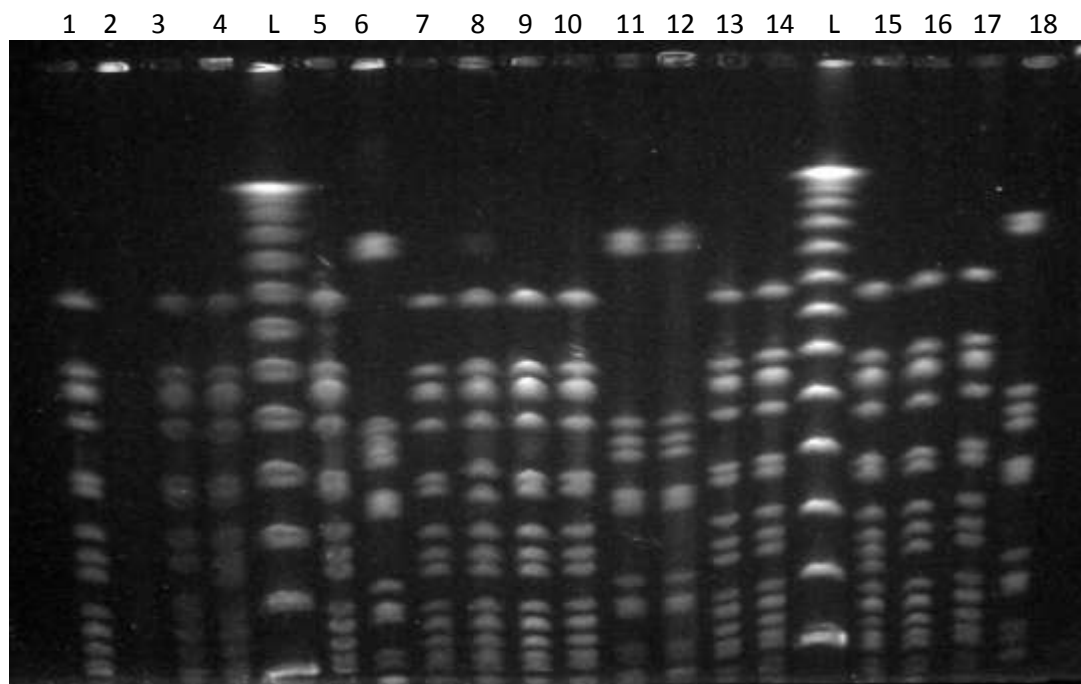


Εικόνα 28: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα: 1:445/5248, 2:149, 3:173, 4:1865685, 5:835, 6:161, 7:190, 8:2014573, 9:1855427, 10:16543, 11:1866680, 12:1694209, 13:1991/5388, 14:480/5264, 15:195, 16:760/5451, 17:1548/5373, 18:1853800, L: ladder

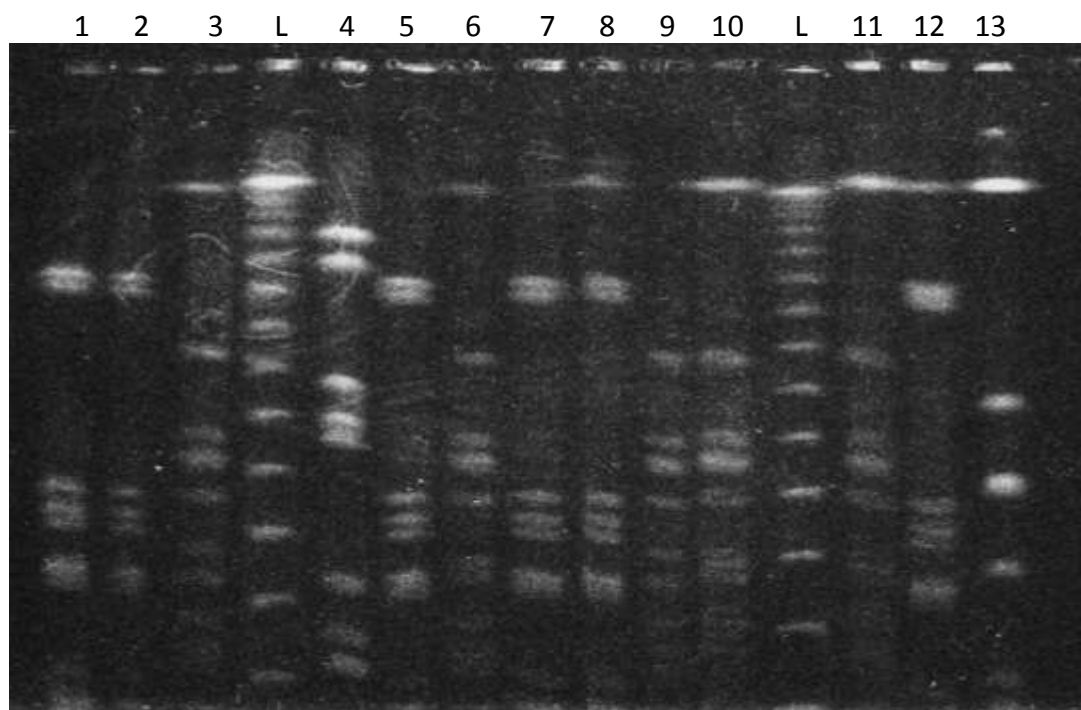
1 2 3 4 L 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 L 15 16 17 18



Εικόνα 29: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα: 1:EY-42, 2:163, 3:241, 4:17245, 5:1029, 6:1385/5338, 7:16798, 8:758/5452, 9:752/5453, 10:3784, 11:736, 12:153, 13:713, 14:A9360, 15:18471, 16:3695, 17:EY-3, 18:399/5247, L: ladder



Εικόνα 30: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα: 1: EY-7, 2:965, 3:624, 4:SA 29213, 5:633, 6:EY-6, 7:907, 8:571, 9:EY-5, 10:615, 11:570-B, 12:908, 13:570-A, L: ladder



Η ανάλυση με βάση τα ερμηνευτικά κριτήρια των Tenover *et al*, έδειξε ότι από τα 63 στελέχη, τα 61 (96,8%) ανήκαν σε έναν PFGE τύπο (τύπος I) ο οποίος παρουσίαζε πέντε υπότυπους (Ia – Ie). Από αυτούς, επικρατών ήταν ο τύπος Ia (παρουσιάζεται σε 52 από τους 61 σταφυλοκόκκους). Τα υπόλοιπα 2 στελέχη ανήκαν σε δύο διαφορετικούς τύπους (τύπος II και τύπος III) απομονώθηκαν δε από το ίδιο νοσοκομείο (πίνακας 33).

Η περαιτέρω διερεύνηση της κλωνικότητας των στελεχών με MLST απέδειξε ότι όλα τα στελέχη με PFGE τύπο I, ανήκαν στον τύπο ST22. Τα άλλα δύο στελέχη τύπου II και τύπου III, ανήκαν σε μοναδικούς, ακόμη με καταγεγραμμένους ST τύπους. Συγκεκριμένα, το ένα στέλεχος διαφοροποιείται κατά μία θέση (single locus variant, SLV) από τον τύπο ST9, ενώ το δεύτερο κατ' αντιστοιχία αποτελεί SLV του ST204 τύπου.

Πίνακας 33: PFGE ανάλυση και εξάρτηση των επιδερμικών σταφυλοκόκκων με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη (συλλογή ελληνικών στελεχών). \*: SLV των αναφερόμενων ST τύπων. D: dependent, ND: non-dependent.

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ		PFGE τύπος / MLST τύπος						
			Ia/ST22	Ib/ST22	Ic/ST22	Id/ST22	Ie/ST22	II/ST9*	III/ST204**
1	D	10	9	-	-	-	1	-	-
	ND	1	-	-	-	-	1	-	-
2	D	5	5	-	-	-	-	-	-
	ND	5	3	-	-	-	-	1	1
3	D	6	5	1	-	-	-	-	-
	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
4	D	12	9	1	2	-	-	-	-
	ND	3	2	1	-	-	-	-	-
5	D	8	7	-	-	1	-	-	-
	ND	1	1	-	-	-	-	-	-
6	D	6	6	-	-	-	-	-	-
	ND	6	5	-	1	-	-	-	-
ΣΥΝΟΛΑ	D	47	41	2	2	1	1	-	-
	ND	16	11	1	1	-	1	1	1

Όλοι οι επιδερμικοί σταφυλόκοκκοι λοιπόν, που παρουσίαζαν το φαινόμενο της εξάρτησης και απομονώθηκαν στα ελληνικά νοσοκομεία της μελέτης, ανήκαν στον τύπο ST22.

Αναλύοντας ανάλογα τα γερμανικά στελέχη, πήραμε την εικόνα που συνοψίζει ο παρακάτω πίνακας (πίνακας 34).

Πίνακας 34: MLST τυποποίηση και εξάρτηση από τη λινεζολίδη της συλλογής γερμανικών στελεχών.

α/α	στέλεχος	νοσοκομείο	ST τύπος	D/ND
1	12-00322	C	ST22	ND
2	12-01569	D	ST22	D
3	12-02439	D	ST22	D
4	12-03718	D	ST22	D
5	12-03723	D	ST22	D
6	13-00905	E	ST22	D
7	13-01045	E	ST22	D
8	13-01084	H	ST22	D
9	14-03576	Y	ST2	D
10	14-03623	Y	ST2	ND
11	14-01514	Y	ST5	D
12	14-00183	Y	ST23	ND
13	14-02427	Y	ST168	D
14	13-04707	Y	ST168	ND

Από τα 10 στελέχη με εξάρτηση τα 7 ανήκαν στον ST22 και από ένα στον ST2, ST5 και στον ST168 τύπο, τύποι που ανήκουν στο κοινό κλωνικό σύμπλεγμα CC5. Τα 4 ST22 στελέχη απομονώθηκαν στο ίδιο νοσοκομείο (D) ενώ ο ίδιος τύπος αναβρέθηκε και σε άλλα 3 νοσοκομεία – στα δύο μάλιστα ως εξαρτημένα στελέχη (νοσοκομεία E και H). Η παρουσία στελεχών με εξάρτηση του συγκεκριμένου MLST τύπου (ST22), τόσο σε διαφορετικά νοσοκομεία της Γερμανίας όσο και στην Ελλάδα, αποδεικνύει την κλωνική και την επιδημιολογική συσχέτιση αυτών των στελεχών.

Εξάρτηση από τη λινεζολίδη παρουσίασαν και δύο στελέχη της γερμανικής συλλογής που ανήκαν στους τύπους ST2 και ST5. Επιπλέον, το στέλεχος που παρουσίαζε την ιδιάζουσα συμπεριφορά μη εξαρτώμενου στελέχους στο πρώτο 12 ωρο της ανάπτυξής του και εξαρτημένου μετά το πρώτο 24ωρο, τυποποιήθηκε ως ST168 και κατατάχθηκε επίσης στα εξαρτημένα στελέχη.

Αν και αποδεικνύεται ότι η εξάρτηση από τη λινεζολίδη, δεν αποτελεί φαινόμενο που παρατηρείται αποκλειστικά στον ST22 τύπο, είναι σημαντική η διαπίστωση της κλωνικής συγγένειας (CC5) των εξαρτημένων στελεχών.

## V.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

Τα στελέχη της γερμανικής συλλογής με εξάρτηση στη λινεζολίδη, επιλέχθηκαν προκειμένου να ανιχνευτούν οι μοριακοί μηχανισμοί αντοχής τους στη λινεζολίδη. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε η παρουσία ή μη του *cfr* γονιδίου, μεταλλάξεων στο 23S rRNA καθώς και στα γονίδια που σχετίζονται με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22, προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από την συλλογή των πρώτων απομονωθέντων στελεχών LRSE με εξάρτηση (τύπου ST22) στην Ελλάδα (Pournaras S *et al*, 2013). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 35):

Πίνακας 35: Αποτελέσματα μοριακής ανίχνευσης μηχανισμών αντοχής στη λινεζολίδη στα εξαρτημένα στελέχη της Γερμανικής συλλογής

α/α	στέλεχος	ST τύπος	<i>cfr</i>	23-S RNA V region	Gene <i>rpIC</i> /Pr L3	Gene <i>rpID</i> /Pr L4	Gene <i>rpIV</i> / Protein L22
1	12-01569	ST22	(-)	C2161T/T2502A/C2532T	C301G/Leu101Val G455A,C456T/ Gly152Asp A474T / - G475T / Asp159Tyr	T150C/- A383C/ Glu 128 Ala A512G / Gin174Arg G545A/Arg182Gin	A138G / - C141T / - G166A / -
2	12-02439	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
3	12-03718	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
4	12-03723	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
5	13-00905	ST22	(-)	-/-	-/-	T150C / - A383C/ Glu 128 Ala A512G / Gin174Arg G545A/Arg182G in Pos 138 His Insertion (ACC)	-/-
6	13-01045	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
7	13-01084	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
8	14-03576	ST2	(-)	-/-	C301G/Leu101Val C456T / -	C78T / - T 102C / - T240G/ Ser61Arg A473G/ Asn158Ser	-/-
9	14-01514	ST5	(+)	C2190T	T438G /His 146Gin G460T / Val154Leu G469A, C470G / Ala157Arg	213-GGT-214/ 71-Gly-72 T240G/ Ser61Arg A473G/ Asn158Ser	-/-
10	14-02427	ST168	(+)	C2190T	C301G/Leu101Val G455A/Gly152Asp	Wildtype	wildtype

Τα 7 ST22 στελέχη, έφεραν 2 μεταλλάξεις της περιοχής V του 23S rRNA, σε γειτονικές θέσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα ελληνικά (T2502A/C2532T έναντι των T2504A και C2534U ) καθώς και 2 αμινοξικές αντικαταστάσεις στην L3 πρωτεΐνη στην ίδια θέση (G152 και L101). Μάλιστα, η αμινοξική αντικατάσταση L101V ήταν και συνολικά η μοναδική κοινή μετάλλαξη που παρατηρήθηκε σε όλα – με εξαίρεση εκείνο του ST168 τύπου - τα εξαρτημένα στελέχη που μελετήθηκαν. Το ST168 στέλεχος, ήταν το μόνο από τη γερμανική συλλογή που στερούνταν μεταλλάξεων στα *rpID* και *rpIV* γονίδια (σχετιζόμενα με τις L3 και L22 ριβοσωμικές πρωτεΐνες) ενώ αντιθέτως ήταν το ένα από τα δύο στελέχη της ίδιας συλλογής που έφεραν το γονίδιο *cfv*. Άλλες μεταλλάξεις του 23S rRNA που καταγράφηκαν ήταν η C2161T που συνδυάστηκε στα ST22 και ST2 στελέχη με τις προαναφερθείσες T2502A και C2532T καθώς και η C2190T που καταγράφηκε σαν η μόνη στα δύο ST5 και ST 168 στελέχη.

## VI. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ – ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ

### VI.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗΣ 8 mg/dl.

Έχει αποδειχτεί ότι με τα συνήθη θεραπευτικά πρωτόκολλα, μπορούν εύκολα να επιτευχθούν στο αίμα των ασθενών συγκεντρώσεις λινεζολίδης ίσες με 8 µg/ml (Stalker DJ *et al*, 2003).

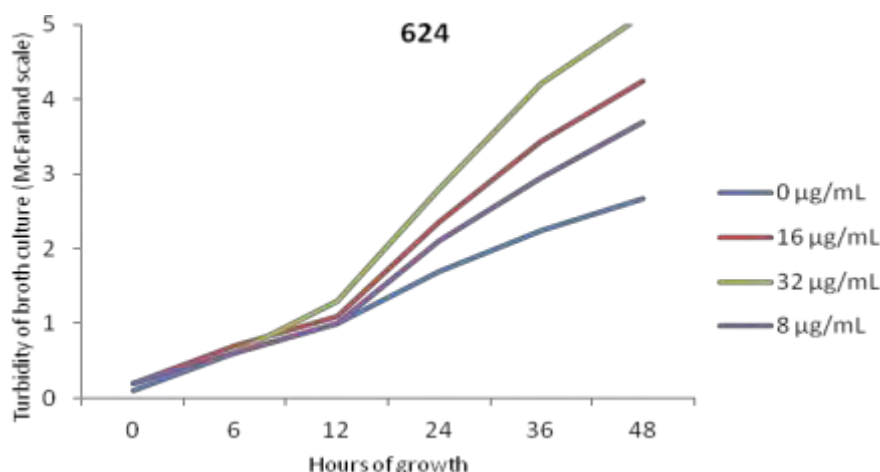
Έξι στελέχη της συλλογής μας με εξάρτηση στη λινεζολίδη, επιλέχθηκαν τυχαία προκειμένου με τη βοήθεια καμπυλών ανάπτυξης, να μελετηθεί πειραματικά αν το φαινόμενο της εξάρτησης εμφανίζεται και σε συγκεντρώσεις λινεζολίδης ίσες με 8 µg/ml.

Τα πειράματα έδειξαν ότι στα πέντε από τα έξι στελέχη, ακόμη και σ' αυτή τη συγκέντρωση λινεζολίδης, υπάρχει σαφής επιτάχυνση της ανάπτυξης από τις 24 ώρες και μετά ( $P < 0.05$ ). Επιτάχυνση μικρότερη από εκείνη που παρατηρείται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της λινεζολίδης – 16 και 32 µg/ml, εντούτοις στατιστικά σημαντική. Παρακάτω παρατίθεται ένα



αντιπροσωπευτικό παράδειγμα καμπύλης ανάπτυξης ενός από αυτά τα στελέχη που μελετήθηκαν (εικόνα 31).

Εικόνα 31: Καμπύλες ανάπτυξης στελέχους LRSE με εξάρτηση στη λινεζολίδη σε συγκεντρώσεις 0, 8, 16 και 32  $\mu\text{g/ml}$ . ( $P < 0.05$  για τις 24, 36 και 48 ώρες επώασης).



## VI.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΣΤΟΥΣ LRSE

Έξι στελέχη LRSE με αποδεδειγμένη εξάρτηση από τη λινεζολίδη και έξι χωρίς, αλλά με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη ( $\text{MIC} > 256 \mu\text{g/ml}$ ), ανακαλλιεργήθηκαν επτά συνεχόμενες φορές, τα μεν εξαρτημένα στελέχη σε υλικό (Mueller Hinton broth) χωρίς λινεζολίδη, τα δε μη εξαρτημένα σε υλικό παρουσία λινεζολίδης (με συγκέντρωση 8  $\mu\text{g/ml}$ , με δεδομένο ότι αυτή είναι συγκέντρωση που μπορεί να επιτευχθεί *in vivo*).

Συγκεκριμένα, τα μη εξαρτημένα στελέχη εμβολιάστηκαν σε 2 ml MH broth με λινεζολίδη σε συγκέντρωση 8  $\mu\text{g/ml}$  (1992  $\mu\text{l}$  broth και 8  $\mu\text{l}$  πρότυπου διαλύματος λινεζολίδης 2  $\text{mg/ml}$ ) και επωάστηκαν σε κλίβανο συνεχούς αναδέυσεως για ένα 24ωρο. Εν συνεχεία, 20  $\mu\text{l}$  του εναιωρήματος εμβολιάστηκαν σε 1980  $\mu\text{l}$  καθαρού διαλύματος MH broth με λινεζολίδη 8  $\mu\text{g/ml}$  και ακολούθησε νέα 24ωρη επώαση: ο ίδιος κύκλος επαναλήφθηκε για επτά φορές. Ανάλογοι κύκλοι επτά ανακαλλιιεργειών σε καθαρό MH broth (χωρίς λινεζολίδη) πραγματοποιήθηκαν για τα εξαρτημένα στελέχη. Μετά από την παραπάνω διαδικασία, τα στελέχη ανακαλλιιεργήθηκαν σε Mueller Hinton

agar για μία νύχτα και την επομένη, πραγματοποιήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης (growth curves) σε συγκεντρώσεις λινεζολίδης 0, 16 και 32 µg/ml και 48ωρη επώαση, προκειμένου να μελετηθεί εκ νέου η εξάρτησή τους από τη λινεζολίδη.

Από τα 6 εξαρτημένα στελέχη, μετά τις επτά ανακαλλιέργειες σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη, τα τρία στελέχη δεν παρουσίαζαν πια εξάρτηση ενώ τα υπόλοιπα τρία, παρέμειναν εξαρτημένα. Φαίνεται λοιπόν πως δυνητικά, στελέχη LRSE με εξάρτηση, μπορούν να μεταπέσουν σε μη εξαρτημένα όταν αναπτύσσονται σε περιβάλλον χωρίς λινεζολίδη, προφανώς προκειμένου να εξοικονομήσουν το ενεργειακό κόστος διατήρησης της συγκεκριμένης τους ικανότητας.

Σχετικά με τα έξι, μη εξαρτημένα στελέχη που ανακαλλιεργήθηκαν σε περιβάλλον με λινεζολίδη, τα πέντε ανέπτυξαν εξάρτηση και μόνο το ένα παρέμεινε μη εξαρτώμενο από τη λινεζολίδη παρά την έκθεση σε περιβάλλον με το αντιβιοτικό. Μάλιστα τα πέντε αυτά στελέχη μπορούσαν να εμφανίσουν εξάρτηση ακόμα και μετά από μία και μόνη 18ωρη επώαση γύρω από δισκίο λινεζολίδης σε Mueller Hinton agar (linezolid 30µg, susceptibility disks, Bio-Rad, France).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η έκθεση στη λινεζολίδη, αποτελεί προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση του φαινομένου της εξάρτησης. Φαίνεται δε ότι συγκεντρώσεις λινεζολίδης που μπορούν να επιτευχθούν *in vivo*, είναι ικανές να πυροδοτήσουν το όλο φαινόμενο.

## VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι *S. epidermidis* τα τελευταία χρόνια, αναδεικνύονται σε έναν ιδιαίτερος σοβαρό λοιμογόνο παράγοντα για τους ενδονοσοκομιακούς ασθενείς και ειδικότερα τους ασθενείς των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας. Η ικανότητά τους να αποικίζουν το δέρμα και τους βλεννογόνους υγιών και ασθενών καθώς και να επιβιώνουν για μήνες ή και χρόνια στις επιφάνειες του νοσοκομειακού περιβάλλοντος (σε ιατρικές συσκευές, εξοπλισμό κλπ) (Neely

AN *et al*, 2000), σε συνδυασμό με την αντοχή τους έναντι των περισσότερων αντιβιοτικών, δημιουργεί σοβαρό πρόβλημα στην αντιμετώπισή τους. Ήδη η αντοχή τους έναντι των β-λακταμικών αγγίζει το 70 και 80% σε διάφορες μελέτες (Diekema DJ *et al*, 2001), ενώ σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών όπως οι μακρολίδες και οι λινκοζαμίδες είναι ακόμη μεγαλύτερη. Έτσι, γίνεται επιβεβλημένη η επιστράτευση αντιβιοτικών όπως η βανκομυκίνη και η λινεζολίδη, στα οποία υπάρχει ακόμη ικανοποιητική ευαισθησία απέναντι σε αυτά τα στελέχη, με αποτέλεσμα τα αντιβιοτικά αυτά να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στα θεραπευτικά πρωτόκολλα κατά των *S. epidermidis*.

Η λινεζολίδη είναι ένα σχετικά καινούριο συνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των οξαζολιδινονών. Η χρήση της στην θεραπευτική μετά από σχετική έγκριση του FDA ξεκίνησε για τους ενήλικους το 2000 ενώ για τα παιδιά το 2005. Σ' αυτό το διάστημα έχει αποδειχθεί πολύ σημαντική στη θεραπευτική των σοβαρών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram (+) θετικά βακτήρια. Αν και την τελευταία δεκαετία, η χρήση της έχει αυξηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, εξακολουθεί να έχει άριστη δραστηριότητα έναντι των επιδερμικών σταφυλοκόκκων.

Σε γενικές γραμμές λοιπόν, *S. epidermidis* με αντοχή στη λινεζολίδη, δεν εμφανίζονται συχνά στις περισσότερες χώρες του κόσμου και μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί μόνο σε Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία, Πορτογαλία, Ιρλανδία, ΗΠΑ, Μεξικό και Ινδία (Liakopoulos A *et al*, 2010, Pournaras S *et al*, 2013, Mihaila L *et al*, 2012, Gu B *et al*, 2013). Εντούτοις τα περιστατικά σοβαρών λοιμώξεων από *S. epidermidis* σε ενδοноσοκομειακούς ασθενείς βαίνουν αυξανόμενα συν τω χρόνω (Baos E *et al*, 2013, Gu B *et al* 2013). Μάλιστα, εξάρσεις λοιμώξεων από LRSE υπό τύπο επιδημιών έχουν ήδη αναφερθεί, κυρίως σε νοσηλευόμενους σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (Kelly S *et al*, 2008, Trevino M *et al*, 2009, Serral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010, de Almeida LM *et al*, 2012, Baos E *et al*, 2013, Barros M *et al*, 2014).

Η λινεζολίδη μπήκε στα θεραπευτικά πρωτόκολλα των Ελληνικών νοσοκομείων το 2002 και από τότε χρησιμοποιείται εκτεταμένα. Ωστόσο αντοχή στη λινεζολίδη δεν είχε καταγραφεί στη Ελλάδα μέχρι το 2008 οπότε και αναφέρθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στέλεχη *S. epidermidis* (Pournaras S *et al*, 2013, Liakopoulos A *et al*, 2009).

Στη μελέτη μας, που αφορούσε στοιχεία που συλλέχθηκαν από το 2011 ως το 2013 από 6 διαφορετικά νοσοκομεία της ελληνικής επικράτειας, σχετικά με τους επιδερμικούς σταφυλοκόκκους, αναδείχθηκε το πρόβλημα των LRSE. Μελετώντας ένα μεγάλο δείγμα, περισσότερων από 7500 κλινικά σημαντικών λοιμώξεων από *S. epidermidis*, καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά στελεχών με αντοχή στη λινεζολίδη, ποσοστά σαφώς αυξανόμενα συν τω χρόνω. Αυτή η αύξηση οπωσδήποτε σχετίζεται με την παρατεταμένη χρήση της λινεζολίδης στη θεραπεία τέτοιων λοιμώξεων σαν επακόλουθο της πολυαντοχής των *S. epidermidis* στα κοινά αντιβιοτικά. Το πρόβλημα φαίνεται πως είναι μεγαλύτερο στους ασθενείς που Νοσηλεύονται σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, όπου καταγράφηκαν ποσοστά LRSE που κατά περίπτωση άγγιξαν το 35,3% επί των λοιμώξεων από *S. epidermidis* ενώ το συνολικό ποσοστό για την τριετία και το σύνολο των νοσοκομείων άγγιξε το 8,8%.

Η μελέτη μας όμως, πέραν των παραπάνω, ανέδειξε και την έκταση ενός άλλου φαινομένου συνυφασμένου με εκείνο της αντοχής στην λινεζολίδη: του φαινόμενο της μερικής εξάρτησης των LRSE από τη λινεζολίδη. Της ικανότητάς τους δηλαδή, να αναπτύσσονται σημαντικά ταχύτερα όταν αυτή είναι παρούσα στο υλικό ανάπτυξής τους (**Pournaras S et al, 2013**). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, ο φαινότυπος της εξάρτησης σχετίζεται με την επιτάχυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης όταν τα ριβοσώματα των συγκεκριμένων στελεχών εκτίθενται στη λινεζολίδη (**Kokkori S et al 2014**). Αυτός ο ιδιαίτερος τρόπος ανάπτυξης, θεωρείται ότι προσφέρει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στα στελέχη *S. epidermidis* όταν εκτίθενται στη λινεζολίδη και συνεισφέρει στην επιλογή και την επικράτησή τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Στα έξι Ελληνικά νοσοκομεία που συμμετείχαν στην μελέτη μας, τα οποία μπορούν να χαρακτηριστούν αντιπροσωπευτικά του συνόλου των ελληνικών νοσοκομείων, λοιμώξεις από LRSE είχαν ήδη αναφερθεί από το 2009 – 2010. Εν τούτοις, στα επόμενα χρόνια, καταγράφηκε μία έξαρση των λοιμώξεων από τέτοια στελέχη, καταλήγοντας το 2013 οι LRSE να αποτελούν το 20,9% των απομονωθέντων κλινικά σημαντικών στελεχών επιδερμικών σταφυλοκόκκων για ασθενείς μονάδων ΜΕΘ και το 4,2% όλων των υπολοίπων. Ομοίως, έξαρση των LRSE λοιμώξεων καταγράφηκε και στη Γερμανία (**Bender J et al, 2015**) αλλά και στην Πορτογαλία (**Barros M et al, 2013**).

Είναι άξιο λόγου το γεγονός ότι στην παρούσα πολυκεντρική μελέτη, το 96,8% των στελεχών που μελετήθηκαν, αποδείχθηκε με PFGE και MLST πως ήταν κλωνικά και ανήκαν στον τύπο ST22, ο οποίος υπάγεται στο ευρύτερο κλωνικό σύμπλεγμα CC5. Αυτός φαίνεται να είναι ένας κοινός κλώνος στα ελληνικά νοσοκομεία καθώς πέρα από τα έξι Νοσοκομεία της μελέτης μας, περιλαμβάνει και όλα τα μη-ευαίσθητα-στη-λινεζολίδη στελέχη *S. epidermidis*, 29 στον αριθμό, που απομονώθηκαν πρόσφατα και από ένα τρίτο ελληνικό νοσοκομείο (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013). Ακόμη περισσότερο, στελέχη LRSE του συγκεκριμένου κλώνου ST22 και τριών άλλων ST τύπων (ST2, ST5, ST168), που όλοι ανήκουν στο κλωνικό σύμπλεγμα CC5, με εξάρτηση από τη λινεζολίδη, βρέθηκαν και σε νοσοκομεία της Γερμανίας (Bender J *et al*, 2015) αποδεικνύοντας πόσο εύκολα μπορεί, χάρις και στο ότι οι *S. epidermidis* αποτελούν κοινούς αποικιστές για τον άνθρωπο, να εξαπλώνεται και να διασπείρεται σε παγκόσμιο επίπεδο.

Στη μελέτη μας, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον μας στα 63 ελληνικά στελέχη LRSE με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη, δείξαμε ότι το 74,6% αυτών, συγκεκριμένα 47 στελέχη, παρουσίαζαν το φαινόμενο της εξάρτησης από τη λινεζολίδη. Όλα ανήκαν στον ST22 τύπο και, αν απομονώσουμε το παραπάνω εύρημα στα στελέχη αυτού του τύπου, το ποσοστό των εξαρτημένων από τη λινεζολίδη στελεχών, ανέρχεται στο 77%. Η παραπάνω διαπίστωση ενισχύεται και από το γεγονός ότι και τα πέντε στελέχη LRSE στα οποία αρχικά περιγράφηκε το φαινόμενο της εξάρτησης σε προηγούμενη μελέτη, ανήκαν στον ίδιο κλώνο (Pournaras *et al*, 2013). Επομένως μπορεί ασφαλώς να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η εξάπλωση των ST22 LRSE έγινε παράλληλα στα Ελληνικά Νοσοκομεία και προφανώς σχετίζεται με τη διάδοση των εξαρτημένων από τη λινεζολίδη στελεχών, με την εξελικτική συμβολή της υψηλής χρήσης λινεζολίδης.

Το γεγονός ότι όλα τα στελέχη με εξάρτηση που απομονώθηκαν στην Ελλάδα ανήκαν στον ST22 κλώνο, οδήγησε σε μία αρχική υπόθεση ότι το φαινόμενο πιθανώς να εμφανίστηκε σε μία ή σε κάποιες λίγες περιπτώσεις και στη συνέχεια εξαπλώθηκε μαζί με τη διάδοση των LRSE. Εναλλακτικά, θα μπορούσε η εξάρτηση να είναι ένα σύμφυτο, κληρονομούμενο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου κλώνου *S. epidermidis*, που συνεισέφερε πιθανώς και στην

επιδημιολογική εξάπλωση του ST22. Μάλιστα στην τελευταία αυτή υπόθεση οδηγεί και η καταγεγραμμένη πειραματικά «μεταστροφή» 5 από τα 6 μη εξαρτώμενα στελέχη της μελέτης μας σε εξαρτημένα, μετά από έκθεση σε περιβάλλον με λινεζολίδη.

Εντούτοις, η μελέτη των στελεχών από τη Γερμανία, έδειξε ότι το φαινόμενο της εξάρτησης, αποτελεί ίδιον όχι μόνο του ST22 κλώνου, αλλά και άλλων κλώνων που ανήκουν στο σύμπλεγμα CC5. Φαίνεται λοιπόν, ότι στελέχη *S. epidermidis* του κλωνικού συμπλέγματος CC5 φέρουν κάποια γενετικά χαρακτηριστικά που οδηγούν τα ριβοσώματά τους να αυξάνουν την πρωτεϊνοσύνθεση μετά από σύνδεση με τη λινεζολίδη καθιστώντας τα βακτήρια εξαρτημένα από τη λινεζολίδη. Ανεξάρτητα από αυτό, το γεγονός ότι ο εξαρτημένος ST22 κλώνος αναδείχθηκε και στα Γερμανικά Νοσοκομεία έχει ιδιαίτερη επιδημιολογική σημασία, αποδεικνύει δε, τόσο την ευκολία με την οποία ταξιδεύουν οι επιδερμικοί σταφυλόκοκκοι, όσο και το εξελικτικό πλεονέκτημα για επικράτηση που η αντοχή και η εξάρτηση στη λινεζολίδη δίνει σε αυτά τα στελέχη.

Είναι σημαντικό ότι η εξάρτηση από τη λινεζολίδη αποδείχθηκε ότι πυροδοτείται και σε περιβάλλοντα με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις λινεζολίδης, 8 µg/ml, οι οποίες μπορούν εύκολα να επιτευχθούν στους ιστούς ή τα υγρά ασθενών, με τα συνήθη θεραπευτικά σχήματα (**Dehghanyar P *et al* 2005, Stalker DJ *et al* 2003**). Η παρατεταμένη έκθεση στη λινεζολίδη έχει ήδη συσχετιστεί επιδημιολογικά με την ανάπτυξη του φαινομένου της εξάρτησης από την πρώτη περιγραφή του φαινομένου (**Pournaras S *et al*, 2013**). Σ' αυτή την πρώτη μελέτη καταγράφηκε η συσχέτιση του φαινομένου της εξάρτησης στους *S. epidermidis* με την έκθεσή τους στη λινεζολίδη, όσο και το γεγονός ότι το φαινόμενο αφορά στελέχη με υψηλού βαθμού αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml). Στη συζήτηση της μελέτης αυτής είχε υπογραμμιστεί η ανάγκη για μελέτη μεγαλύτερων συλλογών *S. epidermidis*, ώστε να τεκμηριωθεί το φαινόμενο σε ευρύτερη βάση και να γίνει σαφής η επιδημιολογική του σημασία.

Η αρχική αυτή μελέτη λοιπόν, αποτέλεσε το έναυσμα της δικής μας μελέτης. Μέσα από αυτή, μελετώντας έναν αριθμό 104 *S. epidermidis* με προέλευση από συνολικά περισσότερα από 11 διαφορετικά νοσοκομεία τριών

ευρωπαϊκών χωρών, παρατηρήσαμε το φαινόμενο της εξάρτησης σε 56 στελέχη LRSE, όλα με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml) και αναδείξαμε επιδημιολογικά και πειραματικά τη συσχέτισή του με την έκθεση στη λινεζολίδη. Το συνολικό συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι ότι η εξάρτηση ως φαινόμενο, ίσως είναι ο μηχανισμός που ευθύνεται υπό την πίεση της φυσικής επιλογής για την επιδημιολογική εξάπλωση του κλώνου ST22 στην Ελλάδα και αλλού (Γερμανία, Ισπανία; (Lozano C *et al* 2012)), ή τουλάχιστον, συνεισφέρει σ' αυτό αν και δεν μπορούν να αποκλειστούν και άλλοι παράγοντες (Pournaras S *et al*, 2013, Liakopoulos A *et al* 2010, Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013). Οπωσδήποτε, φαίνεται πως ανάμεσα στους LRSE με υψηλή αντοχή στην λινεζολίδη, οι εξαρτημένοι από αυτήν, αποκτούν το επιλεκτικό πλεονέκτημα για επικράτηση έναντι των μη εξαρτημένων στελεχών και σ' αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι τα εξαρτημένα στελέχη καταγράφουν υψηλά ποσοστά, επομένως επιβιώνουν καλύτερα έναντι των άλλων στελεχών. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε εξάρτηση από τη λινεζολίδη σε κανένα στέλεχος *S. epidermidis* με χαμηλότερα επίπεδα αντοχής στη λινεζολίδη, από καμία από τις χώρες που συμμετείχαν. Η παρατήρηση αυτή δείχνει πιθανώς ότι τα ριβοσώματα των στελεχών αυτών έχουν διαμόρφωση που δεν επηρεάζεται από τη σύνδεση της λινεζολίδης με τρόπο που να αυξάνει τους ρυθμούς της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η ανάδειξη και μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης και σε άλλες χώρες πέραν της Ελλάδας και της Γερμανίας, όπως στην Ισπανία όπου έχει καταγραφεί και ο επικρατών ST22 κλώνος, θα ήταν ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα. Η αναδυόμενη απειλή της εξάπλωσης των LRSE με τη μορφή επιδημιών σε παγκόσμιο επίπεδο, σε σχέση με το φαινόμενο της εξάρτησης αλλά και την κατάχρηση της λινεζολίδης στη θεραπευτική, κάνει επιβεβλημένη την στενή παρακολούθηση του φαινομένου αλλά και τη λήψη μέτρων για την αντιμετώπισή του και τον περιορισμό της εξάπλωσης τέτοιων στελεχών.





**ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. **Αρσένη Α.** Αξιολόγηση των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλοκόκκων. Εφαρμ κλιν Μικροβιολ Διαγν 1990, 5:67-69.
2. **de Almeida LM, Lincopan N, de Araujo MR et al.** Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 768–9.
3. **Arias CA, Vallejo M, Reyes J et al.** Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 892-896.
4. **Auckland C, Teare L, Cooke F et al.** Linezolid resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 743-746.
5. **Baos E, Candell FJ, Merino P et al.** Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 325–9. Bassetti M, Farrel PA, Callan DA et al. Emergence of linezolid resistant *Enterococcus faecium* during treatment of enterococcal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 593-594.
6. **Barros M, Branquinho R, Grosso F et al.** Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal, 2012. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 903–5.
7. **Bashan A, Agmon I, Zarivach R et al.** Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell* 2003; 11: 91-102.
8. **Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C, Dagwadordsch U, Kekulé AS, Werner G, Layer F.** Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1630-8. doi: 10.1093/jac/dkv025. Epub 2015 Mar 3

9. **Bernard Weisblum.** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 577-585.
10. **Benbouzid F, Kodjikian L, Hartmann D, Renaud F, Baillif S.** Moxifloxacin superior to cefuroxime in reducing bacterial adhesion of staphylococcus epidermidis on hydrophobic intraocular lenses. *Acta Ophthalmol.* 2016 Feb;94(1):e11-5. doi: 10.1111/aos.12827. Epub 2015 Sep 8.
11. **Biedenbach DJ, Farrell DJ, Mendes RE *et al.*** Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum proGram. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 49-67.
12. **Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G *et al.*** DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2336-2340.
13. **Bonilla H, Huband MD, Seidel J.** Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfr*-containing strain. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 796-800.
14. **Bowersock TL, Salmon SA, Portis ES.** Minimum inhibitory concentrations of oxazolidinones for *Rhodococcus equi* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1367-1369.
15. **Brenciani A, Morroni G, Pollini S, Tiberi E, Mingoia M, Varaldo PE, Rossolini GM, Giovanetti E.** Characterization of novel conjugative multiresistance plasmids carrying *cfr* from linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Feb;71(2):307-13. doi: 10.1093/jac/dkv341. Epub 2015 Oct 15.
16. **Brown-Elliott BA, Ward SC, Crist CJ *et al.*** In vitro activity of linezolid against multiple *Nocardia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1295-1297.
17. **Cafini F, Nguyen le TT, Higashide M, Román F, Prieto J, Morikawa K.** Horizontal gene transmission of the *cfr* gene to MRSA and *Enterococcus*: role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Mar;71(3):587-92. doi: J Antimicrob Chemother. 2016 Mar;71(3):587-92. doi:

18. **Choi Y, Kotzin B, Herron L *et al.*** Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin “supernatigens” with human T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 8941-8945.
19. **Cidral TA, Carvalho MC, Figueiredo AM, de Melo MC** Emergence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci resistant to linezolid with rRNA gene C2190T and G2603T mutations. APMIS. 2015 Oct;123(10):867-71. doi: 10.1111/apm.12426. Epub 2015 Jul 30.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. 2011; 30: 76-98.
21. **Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ *et al.*** Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. J Biol Chem 2003; 278: 21972-21979.
22. **Crossley Kb, Archer GL (eds).** The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, USA, 1997.
23. **Dehghanyar P, Bu“rger C, Zeitlinger M *et al.*** Penetration of linezolid into soft tissues of healthy volunteers after single and multiple doses. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2367–71.
24. **Devasahayam G, Scheld MW, Hoffman PS.** Newer Antibacterial Drugs for a New Century. Expert Opin Investig Drugs 2010; 19: 215-234.
25. **Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, *et al.*** Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the sentry antimicrobial surveillance proGram, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl. 2): S114-132.
26. **Djalal Meziane-Cherif, Saul FA, Moubareck C, Weber P, Haouz A, Courvalin P, Périchon B.** Molecular basis of vancomycin dependence in VanA-type *Staphylococcus aureus* VRSA-9. J Bacteriol. 2010 Oct;192(20):5465-71. doi: 10.1128/JB.00613-10. Epub 2010 Aug 20.

27. **Doern GV, Pfaller MA, Kugler K *et al.*** Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis 1998; 27: 764-768.
28. **Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakakis A, Jelastopulu E, Chini V, Spiliopoulou A, Levidiotou S, Panagea T, Vogiatzi A, Lebessi E, Petinaki E, Spiliopoulou I.** A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? Clin Microbiol Infect. 2014 Nov;20(11):O796-803.
29. **Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE *et al.*** Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER ProGram for 2008). Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 392-403.
30. **Franceschi F, Kanyo Z, Sherer EC *et al.*** Macrolide resistance from the ribosome perspective. Curr Drug Targets Infect Disord 2004; 4: 177-191.
31. **Frazer B, Flaherty J.** Septic endarteritis of femoral artery following angioplasty. Rev Infect Dis 1991, 13: 620-623.
32. **Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT.** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989, 42: 872-874.
33. **Fridkin SK,** Vancomycin-intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. Clin Infect Dis 2001, 32: 108-115.
34. **Friedrich Gotz.** *Staphylococcus* and biofilms. Mol. Microbiol. 43 (6), 1367-1378. 2002.
35. **Gabriel EM, Fitzgibbon S, Clair J, Coffey A, O'Mahony JM.** Characterisation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* demonstrating high levels of linezolid resistance (>256 µg/ml) resulting from transmissible and mutational mechanisms. J Infect Chemother. 2015 Jul;21(7):547-9. doi: 10.1016/j.jiac.2015.03.012. Epub 2015 Mar 30.

36. **Gao W, Chua K, Davies JK, Newton HJ, Seemann T, Harrison PF, Holmes NE, Rhee HW, Hong JI, Hartland EL, Stinear TP, Howden BP.** Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 10;6(6):e1000944. doi: 10.1371/journal.ppat.1000944
37. **González-Zorn B, Courvalin P.** VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:67-8.
38. **Goulding R.** (Editor). Toxic shock syndrome. Proceeding of a symposium held at Gilston Park. *postgraduate Med J* 1985, 61 (suppl. 1): 1-51.
39. **Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM.** The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):4-11. doi: 10.1093/jac/dks354. Epub 2012 Sep 4
40. **Heilman C, Hussain M, Peters G, Gotz F.** Evidence for aytolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.*24:1013-1024. 1997
41. **Hill RL, Kearns AM, Nash J *et al.*** Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 442-445.
42. **Hong HJ, Hutchings MI, Buttner MJ, Biotechnology and Biological Sciences Research Council UK.** Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv. Exp. Med Biol* 2008;631:200-13
43. **Honore N, Marchal G, Cole ST.** Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 769-770.
44. **Howe RA, Wooton M, Noel AR *et al.*** Activity of AZD2563, a novel oxazolidinone, against *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin or linezolid. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3651-3652.

45. **Johnson AP, Tysall L, Stockdale MV *et al.*** Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 751-754.
46. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR.** Detection of gens for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 426 - 430.
47. **Jones RN, Johnson DM, Erwin ME.** In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 1996: 40: 720-726.
48. **Jones RN, Della-Latta P, Lee LV *et al.*** Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: report from the SENTRY antimicrobial surveillance proGram. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002: 42: 137-139.
49. **Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al.*** LEADER surveillance program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007A: 59: 309-317.
50. **Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al.*** Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum ProGram Results for 2006: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007B: 59: 199-209.
51. **I.López-Hernández, M. Delgado, Valverde,N. Batista Díaz and A. Pascual** First report of linezolid dependence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 650.e1–650.e4
52. **Ikonomidis A, Grapsa A, Pavlioglou C, Demiri A, Batarli A, Panopoulou M.** Accumulation of multiple mutations in linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* causing bloodstream infections; in silico analysis of L3 amino acid substitutions that might confer high-level linezolid resistance. *J Chemother.* 2016 Dec;28(6):465-468. Epub 2016 Feb 10.

53. **Ishak MA, Groschel DM, Mandel RP.** Association of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 1985, 22: 1025-1029.
54. **Karavasilis V, Zarkotou O, Panopoulou M., Kachrimanidou M., Themeli-Digalaki K, Stylianakis A, Gennimata V, Ntokou E, Stathopoulos C, Tsakris A, Pourmaras S.** Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone. Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1625-9. doi: 10.1093/jac/dkv028. Epub 2015 Feb 23.
55. **Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L *et al.*** A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance. Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 2005: 57: 1064-1073.
56. **Kelly S, Collins J, Maguire M.** An outbreak of colonization with linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2008: 63: 901-907.
57. **Kenny G E, Gartwright FD.** Susceptibilities of *M. hominis*, *M. pneumoniae* and *U. urealyticum* to GAR-936, dalbavancin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines and quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep;45(9):2604-8.
58. **Klimiene I, Virgailis M, Pavilonis A, Siugzdiniene R, Mockeliunas R, Ruzauskas M.** Phenotypical and Genotypical Antimicrobial Resistance of Coagulase-negative staphylococci Isolated from Cow Mastitis. *Pol J Vet Sci.* 2016 Sep 1;19(3):639-646. doi: 10.1515/pjvs-2016-0080.
59. **Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL *et al.*** Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* 1999: 294: 93-101.
60. **Kojima Y, Tojo M, Goldmann DA, Tosteson TD, Pier GB.** Antibody to the capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter – related bacteremia due to coagulase – negative staphylococci, *J Infect. Dis.* 162:435-411.1990.



61. **Kokkori S, Apostolidi M, Tsakris A, Pournaras S, Stathopoulos C, Dinos G.** Linezolid-Dependent Function and Structure Adaptation of Ribosomes in a *Staphylococcus epidermidis* Strain Exhibiting Linezolid Dependence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4651-6. doi: 10.1128/AAC.02835-14. Epub 2014 Jun 2.
62. **Kuo FC, Yen SH, Peng KT, Wang JW, Lee MS.** Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* periprosthetic joint infections can be effectively controlled by systemic and local daptomycin. *BMC Infect Dis.* 2016 Feb 1;16:48. doi: 10.1186/s12879-016-1366-9.
63. **LaMarre JM, Howden BP, Mankin AS.** Inactivation of the indigenous methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* increases linezolid resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):2989-91. doi: 10.1128/AAC.00183-11. Epub 2011 Mar 28
64. **Layer F, Helmers A, Strommenger B, Klare I, Bender J, Werner G.** Characterization of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecium* from two ICUs, preceded by an increase in the linezolid utilization rate of the hospital. *ECCMID 2015*, 26.04.2015
65. **Leach KL, Swaney SM, Colca JR et al.** The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* 2007; 26:393-402.
66. **Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z, Economou M, Papoutsidou E, Koutsia-Carouzou C, Anastassiou E.D, Diza E, Zintzaras E, Spiliopoulou I, Petinaki E.** Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011 30:701-705.
67. **Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D et al.** A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 206-211.
68. **Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A et al.** Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1070-1071.

69. **Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ *et al.*** The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 2127-2131.
70. **Lincopan N, de Almeida LM, Elmor de Araujo MR *et al.*** Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 281-282.
71. **Livermore DM.** Antibiotic resistance in staphylococci. *Inter J Antimicrob Agents* 2000, 16: S3-S10.
72. **Livermore DM, Warner M, Mushtaq S *et al.*** *In vitro* activity of the oxazolidinone RWJ-416457 against linezolid-resistant and -susceptible staphylococci and enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1112-1114.
73. **Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ.** Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009A: 53: 5275-5278.
74. **Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ.** Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother* 2009B: 53: 5265-5274.
75. **Long KS, Vester B.** Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:603-612. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.05702-11.2012>
76. **Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.*** The *cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptoGramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2500-2505.
77. **López-Hernández I, Delgado Valverde M, Batista Díaz N, Pascual A.** First report of linezolid dependence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Jul;21(7):650.e1-4. doi: 10.1016/j.cmi.2015.03.012. Epub 2015 Apr 13.
78. **Lozano C, Ruiz-García M, Gómez-Sanz E, López-García P, Royo-García G, Zarazaga M, Torres C.** Characterization of a *cfr* - positive methicillin-

resistant *Staph. epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Aug;73(4):380-2. doi: 10.1016 / j. diagmicrobio. 2012.04.013. Epub 2012 Jun 6

79. **Marks J, Kannan K, Roncase EJ, Klepacki D, Kefi A, Orelle C, Vázquez-Laslop N, Mankin AS.** Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 25;113(43):12150-12155. Epub 2016 Oct 10.
80. **Martín B, Corominas L, Garriga M *et al.*** Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. J Appl Microbiol 2009; 106: 66-77.
81. **Matassova NB, Rodnina MV, Endermann R *et al.*** Ribosomal RNA is the target for oxazolidinones, a novel class of translational inhibitors. RNA 1999; 5: 939-946.
82. **Mazzariol A, Lo Cascio G, Kocsis E *et al.*** Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 523-527.
83. **Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G *et al.*** Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. J Infect Dis 2004; 190: 311-317.
84. **Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M *et al.*** First report of *cfm* mediated resistance to linezolid in human staphylococci clinical isolates recovered in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2244-2246.
85. **Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ *et al.*** Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2329-2335.
86. **Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN** Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. Drug Resist Updat. 2014 Apr;17(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.drug.2014.04.002. Epub 2014 Apr 6.

87. **Mercier RC, Penzak SR, Rybak MJ.** In vitro activities of an investigational quinolone, glycylicline, glycopeptide, streptoGramin, and oxazolidinone tested alone and in combinations against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2573-2575.
88. **Mihaila L, Defrance G, Levesque E et al.** A dual outbreak of bloodstream infections with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus pettenkoferi* in a liver intensive care unit. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 472-4.
89. **Moellering Jr RC.** A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. *Ann Intern Med* 1999; 130: 155-157.
90. **Moellering Jr RC.** Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1196-1199.
91. **Morrone G, Brenciani A, Vincenzi C, Barocci S, Tili E, Manso E, Mingoia M, Menzo S, Varaldo PE, Giovanetti E.** A clone of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* bearing the G2576T mutation is endemic in an Italian hospital. *J Hosp Infect.* 2016 Oct;94(2):203-6. doi: 10.1016/j.jhin.2016.07.012. Epub 2016 Jul 25.
92. **Moubareck C, Meziane-Cherif D, Courvalin P et al.** VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3657-3663.
93. **Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP.** Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer center linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2001-2004.
94. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al (ed.).** *Manual of Clinical Microbiology*, Vol 1, 8th ed, p 304-404, 2003. Am Soc Clin Microbiol, Washington, D.C.
95. **Musumeci R, Calaresu E, Gerosa J, Oggioni D, Bramati S, Morelli P, Mura I, Piana A, Are BM, Cocuzza CE.** New Microbiol. Resistance to linezolid in *Staphylococcus* spp. clinical isolates associated with ribosomal binding site

modifications: novel mutation in domain V of 23S rRNA. 2016 Oct;39(4):269-273. Epub 2016 Sep 13.

96. **Neely AN, Maley MP.** Survival of enterococci and staphylococci on hospitalfabrics and plastic. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 724-726.
97. **Nierhaus KH, chapter 3.** *In Nierhaus KH, Wilson DN (ed.), Protein synthesis and ribosome structure*, 2004. Wiley-VCH & Co, Weinheim, Germany.
98. **North SE, Ellington MJ, Johnson AP et al, p. 102.** Novel pyrosequencing assays to detect T2500A and other mutations conferring linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. *In ProGram and Abstracts of the 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, DC, USA, 16-19 December 2005. American Society for Microbiology, Washington, D.C
99. **Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V et al.** In vitro activities of linezolid against important Gram-positive bacterial pathogens including vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2059-2062.
100. **O'Connor C, Powell J, Finnegan C, O'Gorman A, Barrett S, Hopkins KL, Pichon B, Hill R, Power L, Woodford N, Coffey JC, Kearns A, O'Connell NH, Dunne CP.** Incidence, management and outcomes of the first cfr-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland. *J Hosp Infect.* 2015 Aug;90(4):316-21. doi: 10.1016/j.jhin.2014.12.013. Epub 2015 Jan 13.
101. **Osman K, Badr J, Al-Maary KS, Moussa IM, Hessain AM, Girah ZM, Abo-Shama UH, Orabi A, Saad A.** Prevalence of the Antibiotic Resistance Genes in Coagulase-Positive-and Negative-Staphylococcus in Chicken Meat Retailed to Consumers. *Front Microbiol.* 2016 Nov 22;7:1846. eCollection 2016.
102. **Otto M, Sussmuth R, Jung G, Gotz F.** Structure of the pherormone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* system. *FEBS Lett.* 424:89-94. 1998.
103. **Papadimitriou-Olivgeris M, Giormezis N, Fligou F et al.** Factors influencing linezolid-nonsusceptible coagulase-negative staphylococci dissemination

- among patients in the intensive care unit: a retrospective cohort study. *Chemotherapy* 2013; 59: 420–6.
104. **Peters G, Locci R, Pulverer G.** Adherence and growth of coagulase negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982, 146: 479-482.
105. **Peters J, Kondo KL, Lee RK *et al.*** In vitro activity of oxazolidinones against *Mycobacterium avium* complex. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:675-679.
106. **Pfaller MA, Herwaldt LA,** Laboratory clinical and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 281-299.
107. **Pfaller MA, Jones RN, Doern GV *et al.*** Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1762-1770.
108. **Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C *et al.*** Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* 2002; 186: 1603-1607.
109. **Poumaras S, Karavassilis V, Panopoulou M *et al.*** Predominance of a linezolid dependent *Staphylococcus epidermidis* ST22 clone among linezolid resistant *S. epidermidis* clinical isolates in Greek Hospitals. In: Posters of the Fifty-fourth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, 2014. Poster C-1378 American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
110. **Poumaras S, Ntokou E, Zarkotou O, Ranellou K, Themeli-Digalaki K, Stathopoulos C, *et al.*** Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg Infect Dis* 2013;19:129–32.
111. **Qin Y, Polacek N, Vesper O *et al.*** The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. *Cell* 2006; 127: 721-733.

112. **Rahim S, Pillai SK, Gold HS *et al.*** Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. Clin Infect Dis 2003; 36: 146-148.
113. **Regueiro BJ.** Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 May;28(5):527-33 doi: 10.1007/s10096 - 008-0657-5 Epub 2008 Nov 5.
114. **Roberts MC.** Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide and oxazolidinone resistance genes. FEMS Microbiol Lett 2008; 282: 147-159.
115. **Rupp ME, Archer GL.** Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis 1994; 19: 231-245.
116. **Russo A, Campanile F, Falcone M, Tascini C, Bassetti M, Goldoni P, Trancassini M, Della Siega P, Menichetti F, Stefani S, Venditti M.** Linezolid-resistant staphylococcal bacteraemia: A multicentre case-case-control study in Italy. Int J Antimicrob Agents. 2015 Mar;45(3):255-61. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.008. Epub 2014 Dec 30
117. **Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T *et al.*** In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin intermediate and resistant strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1062-1066.
118. **Rytel M.** Serology of *Staphylococcus aureus* infections. Clin Microbiol News 1989, 11: 156-157.
119. **Sander P, Belova L, Kidan YG *et al.*** Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. Mol Microbiol 2002; 46: 1295-1304.
120. **Schlievert PM.** TSST-1. Structure, function, purification and detection. Rev Infect Dis 1989, 11 (Suppl 1): S107-S109.
121. **Schlievert P, Kim M.** Reporting the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* in 1982 to 1990. J Infect Dis 1991, 164: 1245-1246.
122. **Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C.** Identification of a plasmid-borne chloramphenicol florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000; **44**: 2530-3.

123. **Sekiguchi J, Fujino T, Saruta K *et al.*** Prevalence of erythromycin-, tetracycline- and aminoglycoside- resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 74-77.
124. **Seral C, Saenz Y, Algarate S.** Nosocomial outbreak of 256 methicillin and linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care units. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 354-358.
125. **Shilnikova II, Dmitrieva NV.** Evaluation of Antibiotic Susceptibility of Gram-Positive Anaerobic Cocci Isolated from Cancer Patients of the N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center. *J Pathog.* 2015;2015:648134. doi: 10.1155/2015/648134.
126. **Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ.** Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1791-1797.
127. **Spink WW, Ferris V.** Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. *Science* 1945; 102: 221-223.
128. **Stalker DJ, Jungbluth GL, Hopkins NK *et al.*** Pharmacokinetics and tolerance of single - and multiple-dose oral or intravenous linezolid, an oxazolidinone antibiotic, in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1239-46.
129. **Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G *et al.*** Linezolid resistance in Staphylococci. *Pharmaceut* 2010; 3: 1988-2006.
130. **Swaney SM, Shinabarger DL, Schaadt RD *et al.*** Oxazolidinone resistance associated with a mutation in the peptidyl transferase region of 23S rRNA. *In* ProGram and Abstracts of the 38th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA USA, 24-27 September 1998. American Society for Microbiology, Washintgon, D.C.



131. **Swoboda S, Fritz S, Martignoni ME *et al.*** Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 787-789.
132. **Taegtmeyer AB, Kononowa N, Fasel D, Haschke M, Burkhalter F.** Successful Treatment of a Pacemaker Infection with intraperitoneal Daptomycin. *Perit Dial Int.* 2016 Jan-Feb;36(1):114-7. doi: 10.3747/pdi.2014.00271
133. **Tambyah PA, Marx JA, Maki DG.** Nosocomial infection with vancomycin-independent enterococci. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1277-1281.
134. **Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M *et al.*** Improved multilocus sequence typing scheme for 545 *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of clinical microbiology* 2007; 45: 616-9.
135. **Toh SM, Xiong L, Arias CA *et al.*** Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular microbiology* 2007; 64: 1506-14.
136. **Tojo M, Yamashita N, Goldmann D, Pier G.** Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1988, 157: 713-722.
137. **Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, Giráldez JM, Alvarez-Escudero J** Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 May;28(5):527-33. doi: 10.1007/s10096-008-0657-5. Epub 2008 Nov 5.
138. **Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G *et al.*** Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 358: 207-208.
139. **Vallianou N, Evangelopoulos A, Hadjisoteriou M, Avlami A, Petrikos G.** Prevalence of macrolide, lincozamide, and streptogramin resistance among staphylococci in a tertiary care hospital in Athens, Greece. *J Chemother* 2015 Dec;27(6):319-23.
140. **Vardakas KZ, Kioumis I, Falagas ME.** Association of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of linezolid with infection outcome. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 2-12.

141. **Veenstra GJ, Cremmers FF, van Dijk H, Fleer A.** Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J.Bacteriol.* 178:537-541. 1996
142. **Vuong Cuong, Otto Michael.** *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbs and Infection* 4:481-489. 2002
143. **Wang Y, He T, Schwarz S et al.** Multidrug resistance gene *cfr* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2013; **303**: 84-7.
144. **Wilson DN, Nierhaus KH.** The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. *Mol Cell* 2007; 26: 460-462.
145. **Wilson DN,** p. 449-527. *In* Nierhaus KH, Wilson DN, (ed.), *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, 2004. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
146. **Wilson DN.** The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44: 393-433.
147. **Wilson M.** Bacterial biofilms and human disease *Sci. Prog.*84(3):235-254. 2001.
148. **Wong A, Reddy SP, Smyth DS et al.** Polyphyletic emergence of linezolidresistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 742-748.
149. **Wu Z, Wright GD, Walsh CT.** Overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochem* 1995; 34:2455-2463.
150. **Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA et al.** Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 109-113

151. Yan F, LaMarre JM, Röhrich R, Wiesner J, Jomaa H, Mankin AS, Fujimori DG. **J Am Chem Soc.** RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA. 2010 Mar 24;132(11):3953-64. doi: 10.1021/ja910850y.
152. Yovel OS, Ben Eliahu S, Kleinmann G. Prevention of staphylococcus epidermidis endophthalmitis by different moxifloxacin Prophylaxis Routes **Curr Drug Deliv.** 2016;13(1):90-4.
153. Zapum A, Contreras-Martel C, Vemet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS Microbiol Rev** 2008; 32: 361-385.
154. Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. **Antimicrob Agents Chemother** 1996; 40: 839-845.



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

## Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone

Vasilios Karavasilis<sup>1</sup>†, Olympia Zarkotou<sup>2</sup>†, Maria Panopoulou<sup>3</sup>, Melina Kachrimanidou<sup>4</sup>, Katerina Themeli-Digalaki<sup>2</sup>, Antonios Stylianakis<sup>5</sup>, Vassiliki Gennimata<sup>6</sup>, Eleni Ntokou<sup>1</sup>, Constantinos Stathopoulos<sup>7</sup>, Athanasios Tsakris<sup>6</sup> and Spyros Pournaras<sup>6\*</sup> on behalf of the Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance‡

<sup>1</sup>Department of Hygiene and Epidemiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Tzaneio Hospital, Piraeus, Greece; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Thrace, Alexandroupolis, Greece; <sup>4</sup>Department of Microbiology, Medical School, Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece; <sup>5</sup>Department of Microbiology, KAT Hospital, Athens, Greece; <sup>6</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece; <sup>7</sup>Department of Biochemistry, Medical School, University of Patras, Patras, Greece

\*Corresponding author. Tel: +30-210-7462126; Fax: +30-210-7462210; E-mail: spournaras@med.uoa.gr

†These authors contributed equally to this article.

‡See the Acknowledgements section.

Received 22 October 2014; returned 1 December 2014; revised 21 January 2015; accepted 25 January 2015

**Objectives:** Dependence on linezolid was recently described as significant growth acceleration of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) isolates upon linezolid exposure. We investigated the possible contribution of linezolid dependence to LRSE dissemination in Greece.

**Methods:** Linezolid resistance rates were estimated in six tertiary hospitals located throughout Greece between 2011 and 2013. Sixty-three randomly selected LRSE recovered in these hospitals during this period were studied. Growth curve analysis was conducted with and without linezolid. Clonality of the isolates was investigated by PFGE and MLST.

**Results:** During the study period, the LRSE rate in the participating hospitals rose significantly from 6.9% to 9% ( $P=0.006$ ); the increase was more prominent in ICUs (from 15.1% to 20.9%;  $P=0.005$ ). Forty-seven (74.6%) of the 63 LRSE, derived from all study hospitals, clearly exhibited linezolid dependence, growing significantly faster in the presence of 16 and 32 mg/L linezolid. Of note, 61 (96.8%) LRSE exhibited a single macrorestriction pattern and belonged to ST22, which included all linezolid-dependent LRSE. The remaining two LRSE belonged to unique STs. Five of six linezolid-dependent isolates tested also exhibited linezolid dependence upon exposure to 8 mg/L linezolid. Interestingly, five of six ST22 linezolid-non-dependent isolates tested developed linezolid dependence when linezolid exposure preceded growth analysis.

**Conclusions:** The rapid LRSE dissemination in Greek hospitals threatens linezolid activity. The observation that most LRSE belonged to ST22 and expressed dependence on linezolid clearly implies that the spread of linezolid resistance should have been driven by this trait, which provided the LRSE with a selective advantage under linezolid pressure.

**Keywords:** linezolid pressure, growth curves, MLST, linezolid resistance, linezolid dependence

### Introduction

Linezolid was the first oxazolidinone drug that received FDA approval. At the time of its introduction, linezolid displayed excellent activity against *Staphylococcus epidermidis*<sup>1,2</sup> and still retains high potency, exhibiting *in vitro* susceptibility rates as high as 98.8%–99% in large international surveillance studies.<sup>3,4</sup> However, outbreaks of linezolid-resistant *S. epidermidis* (LRSE) were documented in several countries.<sup>5–11</sup> In Greece, LRSE

were first identified in 2008<sup>12</sup> and since then are increasingly reported.<sup>13–15</sup> We have recently described that LRSE may exhibit dependence on linezolid, growing significantly faster under linezolid presence.<sup>13</sup> This peculiar mode of growth was considered to confer a selective advantage to the respective *S. epidermidis* strains upon exposure to linezolid. It should be noted that in Greece, the usage of linezolid is particularly high due to increased rates of MRSA and vancomycin-resistant enterococcal clinical isolates.<sup>16</sup> Notifications of LRSE emergence from many Greek

hospitals prompted the present study, which investigated the possible contribution of linezolid dependence to the dissemination of LRSE in Greece.

## Materials and methods

### Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility testing

A total of 63 non-repetitive LRSE, isolated from patients hospitalized in six distinct tertiary Greek hospitals during 2011–13, were selected randomly among the collections of LRSE in these hospitals. The hospitals were located in distinct regions throughout Greece: Hospital 2 is located in Alexandroupolis (Thrace, north-eastern Greece), Hospital 6 in Thessaloniki (Macedonia, northern Greece), Hospitals 1 and 3 in Athens and Hospitals 4 and 5 in Piraeus (Attica, central Greece). These hospitals are not connected with each other and regular transfer of patients from different regions is not common, but a degree of exchange may occur between patients from hospitals within Attica. Linezolid resistance rates were estimated in each participating hospital from 2011 to 2013. Identification and initial antibiotic susceptibility testing of the 63 study isolates was performed by the Vitek 2 automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The identification was confirmed by using MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Linezolid MIC testing was carried out by broth microdilution following CLSI guidelines and interpretative criteria<sup>17</sup> and Etest (bioMérieux). *Staphylococcus aureus* strain ATCC 29213 (linezolid MIC 0.5 mg/L) was used as a control in all phenotypic assays.

### Growth curves of bacterial isolates

Growth curves were conducted in triplicate as described previously,<sup>7</sup> using *S. aureus* ATCC 29213 as a control strain. All 63 LRSE study isolates were tested in the absence and presence of linezolid at 16 and 32 mg/L, concentrations under which dependence was evident in our previous study<sup>7</sup> and at 0.25 mg/L for the ATCC 29213. As the mean linezolid concentrations in the serum and tissues of patients receiving linezolid are usually lower than 16 or 32 mg/L,<sup>18,19</sup> we also tested by growth analysis using 8 mg/L linezolid, six randomly selected linezolid-dependent isolates (one from each hospital).

To investigate the stability of linezolid dependence, the above-mentioned six linezolid-dependent isolates were subjected to growth curve analysis in the presence of linezolid at 16 and 32 mg/L, after seven daily subcultures in broth without linezolid. Further, to investigate whether linezolid-dependent cells can emerge if growth analysis is preceded by exposure to linezolid, we selected six linezolid non-dependent isolates from Hospitals 2 and 6 (where such isolates were found to be more common). We subcultured these non-dependent isolates for seven

successive days in broth with 16 mg/L linezolid and then performed growth analysis using 16 and 32 mg/L linezolid. Additionally, we subcultured these isolates for one single time in an agar plate with a linezolid disc and harvested cells grown around the disc to be tested by growth analysis upon exposure to 16 and 32 mg/L linezolid.

### Molecular typing

PFGE of SmaI-digested genomic DNA of the LRSE was performed with a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). The running time of the PFGE was 20 h with pulse times ranging from 5 to 35 s. PFGE patterns were compared visually and interpreted according to the criteria established by Tenover et al.<sup>20</sup> All isolates were tested using the MLST scheme developed by the Pasteur Institute (<http://sepidermidis.mlst.net/>), which involves PCR amplification and sequencing of seven housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *yqiL*, *pyr* and *tpi*).

### Statistical analysis

The paired t-test and  $\chi^2$  test were used for statistical analysis. For all comparisons, a *P* value of  $\leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed using Minitab (version 13.31) and SPSS statistical software (version 17; SPSS, Chicago, IL, USA).

## Results

The evolution of linezolid resistance among *S. epidermidis* in the six study hospitals between 2011 and 2013 is shown in Table 1. During this period, the rate of LRSE in the six hospitals overall rose significantly from 6.9% to 9% ( $P=0.006$ ), being more prominent in the ICUs, where the prevalence of LRSE grew from 15.1% to 20.9% ( $P=0.005$ ); in general wards a slighter increase was observed (from 3.7% to 4.2%;  $P=0.4$ ). Within the participating hospitals, the sharpest increase in linezolid resistance was experienced in the ICUs of Hospitals 2 and 3, where LRSE isolations rose between 2011 and 2013 from 8.3% to 18.7% and from 3.0% to 18.9%, respectively. The ICUs of the other four hospitals had high LRSE rates (17.9%–35.3%) already in 2011, with the substantial increase having occurred earlier, in 2009 and 2010 (data not shown). In 2013, remarkably high rates of LRSE, ranging from 16.7% to 32.6%, were observed in all six hospitals. In the non-ICU wards of the participating hospitals, increased prevalence of LRSE was noted between 2011 and 2013 in four hospitals

**Table 1.** Resistance rates to linezolid among *S. epidermidis* isolates in the study hospitals

Hospital	Number of linezolid-resistant <i>S. epidermidis</i> isolates (%)					
	2011		2012		2013	
	ICU	non-ICU	ICU	non-ICU	ICU	non-ICU
1	46 (23.9)	78 (6.4)	59 (27.1)	58 (12.2)	49 (32.6)	59 (8.5)
2	121 (8.3)	430 (2.1)	128 (20.3)	437 (3.0)	155 (18.7)	535 (2.1)
3	200 (3.0)	411 (1.7)	183 (18.6)	465 (2.6)	169 (18.9)	502 (1.6)
4	51 (35.3)	571 (6.7)	33 (18.1)	501 (9.4)	38 (31.7)	312 (9.6)
5	134 (17.9)	78 (1.3)	140 (12.2)	109 (0.9)	156 (16.7)	158 (4.4)
6	182 (23.1)	302 (3)	234 (24.0)	380 (4.0)	186 (22.6)	317 (6.0)
Total	734 (15.1)	1870 (3.7)	777 (20.0)	1950 (4.9)	753 (20.9)	1883 (4.2)

**Table 2.** Clonal analysis of the study isolates

Hospital	Number of isolates	PFGE type							
		Ia	Ib	Ic	Id	Ie	II	III	
1	D	10	9	—	—	—	1	—	—
	ND	1	—	—	—	—	1	—	—
2	D	5	5	—	—	—	—	—	—
	ND	5	3	—	—	—	—	1	1
3	D	6	5	1	—	—	—	—	—
	ND	—	—	—	—	—	—	—	—
4	D	12	9	1	2	—	—	—	—
	ND	3	2	1	—	—	—	—	—
5	D	8	7	—	—	1	—	—	—
	ND	1	1	—	—	—	—	—	—
6	D	6	6	—	—	—	—	—	—
	ND	6	5	—	1	—	—	—	—
Total	D	47	41	2	2	1	1	—	—
	ND	16	11	1	1	—	1	1	1

D, linezolid-dependent *S. epidermidis* isolates; ND, linezolid-non-dependent *S. epidermidis* isolates.

(Hospitals 1, 4, 5 and 6;  $P > 0.05$ ), while the remaining two hospitals had relatively low rates that remained essentially unchanged.

The phenotypic and genotypic characteristics of the 63 study isolates are shown in Table 2. All LRSE isolates were classified as resistant to linezolid by routine susceptibility testing in each hospital laboratory. Linezolid MICs were  $> 256$  mg/L by both Etest and broth microdilution for all isolates. Of the 63 LRSE tested by growth analysis in the presence of 16 and 32 mg/L linezolid, 47 (74.6%) exhibited significantly increased growth rates in the presence of linezolid ( $P < 0.05$  at 24, 36 and 48 h for all isolates), with the significance being evident already at 16 mg/L linezolid, but even more pronounced at 32 mg/L. Interestingly, five of the six selected isolates that exhibited linezolid dependence in the presence of 16 and 32 mg/L linezolid clearly showed dependence also at 8 mg/L linezolid ( $P < 0.05$ ), while only one isolate was non-dependent at this linezolid concentration. The remaining 16 isolates grew with comparable rates, irrespective of the presence of linezolid at either 16 or 32 mg/L. Linezolid-dependent isolates predominated in four hospitals, while equal numbers of dependent and non-dependent LRSE were identified in two hospitals (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online). When six linezolid-dependent isolates were subcultured seven times without linezolid, dependence was retained in three isolates but was lost in the remaining three isolates. In contrast, of obvious interest, linezolid dependence emerged in five out of six linezolid-non-dependent isolates grown for seven successive days in broth containing linezolid, while only one isolate still remained linezolid-non-dependent despite linezolid exposure. These observations support the hypothesis that exposure to linezolid is a prerequisite for the development or maintenance of dependence in LRSE isolates. Interestingly, linezolid dependence was again apparent in five isolates grown for only one

night around a linezolid disc, indicating that even a single exposure to linezolid may trigger linezolid dependence.

PFGE analysis of the study isolates showed that 61 isolates (96.8%) exhibited a single macrorestriction pattern (PFGE type I) with five closely related subtypes (Ia–Ie), among which subtype Ia predominated with 52 isolates. All 47 isolates that exhibited linezolid dependence belonged to PFGE type I, representing 77% of the 61 PFGE type I isolates. The remaining two, linezolid-non-dependent, LRSE isolates belonged to two unique PFGE types (II and III). All 61 LRSE isolates of PFGE type I were shown by MLST to belong to ST22. The two isolates of PFGE types II and III, both recovered in Hospital 2, belonged to unique yet unassigned STs; one was a single locus variant (SLV) of ST9 and the other was an SLV of ST204.

## Discussion

Linezolid is important for the treatment of serious infections due to MDR Gram-positive bacteria and, despite its widespread use for more than a decade, it still exhibits excellent activity against *S. epidermidis*.<sup>3,4</sup> Currently, LRSE seem to be uncommon in most countries and have been mainly reported from Greece, Spain, Italy, France, Ireland, the USA, Mexico, Brazil and India.<sup>12,13,21,22</sup> However, resistance to linezolid is gradually increasing among *S. epidermidis* clinical isolates<sup>10,22</sup> and outbreaks of LRSE have also occurred mainly in ICUs.<sup>5–11</sup>

Linezolid was introduced into Greek hospitals in 2002 and has since been widely used. Resistance to linezolid was not apparent in Greece until 2008, when the first LRSE isolates were reported.<sup>13,23</sup> We have reported that LRSE may express partial dependence on linezolid, exhibiting significantly enhanced growth when linezolid is present in the medium,<sup>13</sup> and recently showed that this phenotype is mediated by accelerated protein synthesis when ribosomes are exposed to linezolid.<sup>24</sup> This mode of growth was considered to confer a selective advantage to the *S. epidermidis* strains when exposed to linezolid.

In the tertiary hospitals participating in the present study, which are located in distinct Greek regions and can be considered representative of hospitals in Greece, LRSE were evident in the six study hospitals by 2009–10. LRSE then rapidly expanded and have become quite prevalent during the last few years: in 2013 they represented 20.9% of *S. epidermidis* clinical isolates in the ICUs and 4.2% in the remaining units of these hospitals. Similarly high rates of LRSE have been reported from Spanish hospitals.<sup>10</sup> It is remarkable that most (96.8%) of the LRSE clinical isolates tested in the present multicentre study were clonal by PFGE and belonged to ST22, which is a common *S. epidermidis* lineage<sup>12,25</sup> and was recently shown to comprise almost all linezolid-non-susceptible *S. epidermidis* isolates from another Greek hospital.<sup>14</sup> Furthermore, the majority (74.6%) of the 63 LRSE tested, comprising 77.0% of the 61 ST22 LRSE was clearly dependent on linezolid. It should be noted that the five LRSE in which linezolid dependence was originally described<sup>13</sup> were tested in parallel with the 63 study isolates and were also found to belong to ST22. It can thus be rationally concluded that the expansion of linezolid resistance in Greek hospitals was paralleled and is apparently associated with the dissemination of linezolid-dependent LRSE. The fact that all linezolid-dependent isolates identified to date were clonal may imply that dependence on



linezolid emerged once or on a few occasions, with dependent LRSE disseminating subsequently. Alternatively, linezolid dependence might be an inherent characteristic of this *S. epidermidis* lineage, which probably contributed to its predominance. The latter hypothesis is supported by the observation that dependence readily emerged in five of six initially non-dependent ST22 LRSE isolates after exposure to linezolid. Nevertheless, the possibility that other LRSE clones may also exhibit dependence on linezolid cannot be excluded and needs to be investigated.

It is important that dependence on linezolid is evident even at the relatively low and clinically achievable linezolid concentration of 8 mg/L, to which commensal or clinical *S. epidermidis* isolates may be exposed in patients' tissues or fluids.<sup>18,19</sup> Actually, prolonged linezolid exposure was already documented for the patients harbouring the originally observed linezolid-dependent LRSE.<sup>13</sup> That preliminary study,<sup>13</sup> which first described linezolid dependence, suggested that the dissemination of linezolid-dependent LRSE needs to be substantiated in larger LRSE collections, prompting the present study.

The findings of the current study overall indicate that linezolid dependence may be the underlying mechanism supporting the dissemination of this ST22 clone under linezolid selective pressure and leading to the reported increasing emergence of LRSE in Greece,<sup>12-14</sup> although the contribution of other factors cannot be excluded.

Given that ST22 LRSE are identified not only in Greece but also elsewhere, such as Spain,<sup>25</sup> it would be of obvious interest to investigate the possible dependence on linezolid of ST22 LRSE from other countries. The emerging threat that the rapid expansion of LRSE poses to the activity of linezolid clearly implies that particular attention is necessary for the restriction of such isolates.

## Acknowledgements

The following members of the Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance contributed significantly to the study design, strain collection and data analysis: E. Kouskouni and G. Vriani, National and Kapodistrian University of Athens, Athens; V. Mamali, E. Kousouli and P. Papagiannakopoulou, Tzaneio General Hospital, Piraeus; I. Kristo, K. Dafopoulou and C. Hadjichristodoulou, University of Thessaly, Larissa; P. Carle and M. Kimouli, Saint Panteleimon Hospital, Nicea; E. Perivolioti, M. Nepka and K. Foudoulis, Evangelismos General Hospital, Athens; F. Stathouloupoulou and P. Papanikolaou, KAT General Hospital, Athens; A. Poulou, Serres General Hospital, Serres; and Eleni Tsorlini, George Papanikolaou General Hospital, Thessaloniki, Greece.

## Funding

This work was supported by internal funding.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T et al. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci including vancomycin-intermediate and -resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1062-6.
- Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V et al. In vitro activities of linezolid against important Gram-positive bacterial pathogens including vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2059-62.
- Mendes RE, Flamm RK, Hogan PA et al. Summary of linezolid activity and resistance mechanisms detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 1243-7.
- Mendes RE, Hogan PA, Streit JM et al. Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1582-8.
- Kelly S, Collins J, Maguire M et al. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 901-7.
- Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA et al. Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; **28**: 527-33.
- Seral C, Saenz Y, Algarate S et al. Nosocomial outbreak of methicillin and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care units. *Int J Med Microbiol* 2011; **301**: 354-8.
- Bonilla H, Huband MD, Seidel J et al. Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfr*-containing strain. *Clin Infect Dis* 2010; **51**: 796-800.
- de Almeida LM, Lincopan N, de Araújo MR et al. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 768-9.
- Baos E, Candel FJ, Merino P et al. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **76**: 325-9.
- Barros M, Branquinho R, Grosso F et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal, 2012. *Emerg Infect Dis* 2014; **20**: 903-5.
- Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A et al. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1070-1.
- Pournaras S, Ntokou E, Zarkotou O et al. Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg Infect Dis* 2013; **19**: 129-32.
- Papadimitriou-Olivgeris M, Giormezis N, Fligou F et al. Factors influencing linezolid-nonsusceptible coagulase-negative staphylococci dissemination among patients in the intensive care unit: a retrospective cohort study. *Chemotherapy* 2013; **59**: 420-6.
- Pournaras S, Karavassilis V, Panopoulou M et al. Predominance of a linezolid-dependent *Staphylococcus epidermidis* ST22 clone among linezolid-resistant *S. epidermidis* clinical isolates in Greek hospitals. In: *Posters of the Fifty-fourth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, 2014*. Poster C-1378. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- WHONET Greece (Greek Network for the Surveillance of Antimicrobial Resistance). *Cumulative Results*. <http://www.mednet.gr/whonet/top.htm>.

- 17 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
- 18 Dehghanyar P, Bürger C, Zeitlinger M et al. Penetration of linezolid into soft tissues of healthy volunteers after single and multiple doses. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2367–71.
- 19 Stalker DJ, Jungbluth GL, Hopkins NK et al. Pharmacokinetics and tolerance of single- and multiple-dose oral or intravenous linezolid, an oxazolidinone antibiotic, in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1239–46.
- 20 Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–9.
- 21 Mihaila L, Defrance G, Levesque E et al. A dual outbreak of bloodstream infections with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus pettenkoferi* in a liver intensive care unit. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **40**: 472–4.
- 22 Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 4–11.
- 23 Liakopoulos A, Neodeous C, Klapsa D et al. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 206–7.
- 24 Kokkari S, Apostolidi M, Tsakris A et al. Linezolid-dependent function and structure adaptation of ribosomes in a *Staphylococcus epidermidis* strain exhibiting linezolid dependence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 4651–6.
- 25 Lozano C, Ruiz-Garcia M, Gómez-Sanz E et al. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **73**: 380–2.